

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS PARA TRATAMENTO DE
FALÊNCIA OVARIANA CAUSADA POR QUIMIOTERAPIA EM
CAMUNDONGAS

Aluna: Paula Barros Terraciano

Porto Alegre, março de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Barros Terraciano, Paula
UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS PARA
TRATAMENTO DE FALÊNCIA OVARIANA CAUSADA POR
QUIMIOTERAPIA EM CAMUNDONGAS / Paula Barros
Terraciano. -- 2013.
47 f.

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.
Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. terapia celular. 2. células-tronco. 3.
falência ovariana. I. Obino Cirne-Lima, Elizabeth,
orient. II. da Rosa Paz, Ana Helena, coorient. III.
Título.

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

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS PARA TRATAMENTO DE
FALÊNCIA OVARIANA CAUSADA POR QUIMIOTERAPIA EM
CAMUNDONGAS

Aluna: Paula Barros Terraciano

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

Co- orientadora: Profa. Dra. Ana Helena Paz

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Biologia Celular e
Molecular

Porto Alegre, março de 2013

Paula Barros Terraciano

UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS PARA TRATAMENTO DE
FALÊNCIA OVARIANA CAUSADA POR QUIMIOTERAPIA EM
CAMUNDONGAS

APROVADO POR

Prof^ª. Dr^ª .Elizabeth Obino Cirne Lima
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. MELISSA MEDEIROS MARKOSKI
Membro da Comissão (IC/FUC)

Prof. Dr. EDUARDO PANDOLFI PASSOS
Membro da Comissão (HCPA/UFRGS)

Prof^º. Dr^º. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Membro da Comissão (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

- À minha mãe por me incentivar a aprender sempre mais
- Ao Diego pelo amor, compreensão e paciência
- Ao meu pai e meu irmão por entenderem minha ausência
- Às minhas orientadoras/amigas Profa. Elizabeth e Profa. Ana Helena, pelo companheirismo, incentivo e por dividirem comigo seus conhecimentos
- À médica veterinária Tuane Garcez pela disponibilidade total e completa sempre!
- À Dra. Cláudia Laurino pela ajuda crucial na citometria
- Ao Prof. Eduardo Passos pela confiança depositada em mim
- Aos colegas da Unidade de Experimentação Animal que me acolheram e me ajudaram na execução desta pesquisa
- À Flávia Giusti pela disponibilidade no preparo das amostras
- Aos colegas da Equipe de Reprodução Assistida pelo incentivo e compreensão
- Às minhas queridas amigas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular por serem as melhores colegas que alguém pode querer e por me ajudarem como se fossem minhas irmãs. Cada uma de vocês contribuiu muito para esta conquista

O importante não é O QUE eu tenho na vida,
mas QUEM eu tenho na vida...

Por isso...

Guardo todas essas pessoas dentro
do meu coração...

“O sorriso enriquece os recebedores sem empobrecer os doadores.”

Mário Quintana

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	4
1.1 Quimioterapia e infertilidade.....	4
1.2 Técnicas para a preservação da fertilidade.....	7
1.3 Células-tronco.....	11
1.4 Terapia celular e infertilidade.....	14
CAPÍTULO 2-ARTIGO.....	16
CAPÍTULO 3- DISCUSSÃO GERAL.....	37
CAPÍTULO 4 - REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

Uma das consequências mais devastadoras do tratamento do câncer na população jovem do sexo feminino é a falência ovariana, que resulta na diminuição do potencial de fertilidade. Nenhum tratamento curativo para a falência ovariana primária é conhecido, no entanto, as células-tronco mesenquimais, através de seu potencial de auto-renovação e de regeneração, vem sendo utilizadas com o intuito de avaliar o seu papel no tratamento da falência ovariana. O objetivo deste estudo foi explorar o impacto das células-tronco adiposo derivadas (ADSC), células de macerado de ovário e células - tronco femininas germinativas mouse vasa homologue positivas (MVH+) na falência ovariana induzida pela cisplatina em camundongos e esclarecer quais tipos celulares promovem melhor recuperação neste modelo. Quarenta e oito camundongas adultas foram injetadas com 7,5 mg/kg de cisplatina para induzir a falência ovariana. Como doadores de células foram utilizadas fêmeas C57BL6 transgênicas para a proteína verde fluorescente (GFP +) . Os animais foram subdivididos em três grupos: grupo controle (que recebeu somente solução salina) grupo ADSC- animais que receberam injeção intra ovariana de células-tronco mesenquimais adiposo derivadas (1×10^4), grupo ovário - animais que receberam injeção intra ovariana de células obtidas a partir de macerado de ovário (1×10^4) e grupo FGSC- animais que receberam injeção de células tronco germinativas MVH positivas(1×10^4). Todos os grupos foram avaliados em dois tempos de eutanásia: 7 e 14 dias após o transplante das células. A partir das análises histológicas, pode-se perceber um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na probabilidade de obtenção de folículos viáveis nos grupos ADSC (43%) e suspensão de células de ovário (48%) quando comparados ao grupo controle (24%) no dia 7 e um aumento significativo na probabilidade de obtenção de folículos viáveis no número no grupo FGSC (71%) quando

comparado aos outros grupos. Nos grupos eutanasiados 14 dias pós transplante os animais do grupo MVH apresentaram 72% de probabilidade de folículos viáveis em comparação aos grupos: controle (50%), ADSC (58%) e suspensão de ovário (52%) diferença não foi estatisticamente significativa. A dosagem de estradiol não mostrou diferença estatística entre os grupos, nos diferentes tempos de eutanásia.

Palavras chave: células-tronco, terapia células, quimioterapia, falência ovariana

ABSTRACT

One of the most devastating consequences of cancer treatment in the young female population is ovarian damage, resulting in diminished fertility potential. No curative treatment is known for primary ovarian failure; however, mesenchymal stem cells, through self-renewal and regeneration, was tested to evaluate their role in the treatment of ovarian failure. The aim of this study was to explore the impact of adipose derived stem cells (ADSC), ovarian cells macerated and female germline stem cells MVH + (FGSC) in ovarian failure induced by cisplatin in mice and to clarify the mechanism (s) by which the ADSCs exert their action. Methods: Thirty-six adult female mice were injected with 7.5 mg / kg of cisplatin to induce ovarian failure. As donor cells used C57BL6 females GFP +. Animals were divided into three groups: control group (which received only saline), ADSC-group: animals received intra ovarian 1×10^4 adipose derived stem cells; Ovarian cell group - animals received intra ovarian 1×10^4 cells obtained from macerated ovarian tissue and FGSC-group: animals received 1×10^4 female germline stem cells MVH positive. All groups were assessed at two times of euthanasia: 7 and 14 days after cell transplantation. Results: From the histological analysis, one can see a significant increase in the number of viable follicles in groups and MVH ADSC compared to the control group at day 7. On day 14 we also observed a tendency to better recovery in group MVH compared to the control group and the other groups, although this difference was not statistically significant. There was no difference in estradiol serum levels between all groups

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 QUIMIOTERAPIA E INFERTILIDADE

Os recentes avanços na área da oncologia, referentes ao diagnóstico precoce e à eficácia dos tratamentos de pacientes com câncer, permitiram que mais doentes alcançassem a idade reprodutiva, evidenciando a importância de se investir na sua qualidade de vida (1-4)(FORMAN, 2009, CHANG, 2008, ELIZUR,2009,CASTELOTTI, 2008). As taxas de sobrevivência começaram a aumentar na década de 60, quando apenas 30% dos pacientes sobreviviam aos tratamentos antineoplásicos. Nos últimos 50 anos, estes números cresceram consideravelmente e a taxa de sobrevida por 5 ou mais anos após o tratamento já chega a 80% (STILLER, 2007 E ROBISON et al, 2009). Esta taxa é de 83%, se considerarmos pacientes mulheres com menos de 45 anos (HOWLADER, 2012). Por este motivo a comunidade científica vem realizando pesquisas que tratam especificamente deste tópico. Em estudo recente, realizado em adultos jovens, foi relatado que 74% das mulheres e 71% dos homens consideraram a possível infertilidade como um fator importante a ser discutido com o médico (MIEDEMA, 2013).

Os tratamentos anti-neoplásicos são altamente citotóxicos e afetam diretamente as funções gonadais, causando danos irreversíveis em ovários e testículos e afetando as funções do eixo hipotálamo-hipófise (SKLAR,1999;ZIVANOVIC,2009; MALTARIS,2009). O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica,interrompendo o ciclo

de proliferação celular e lesando tanto células malignas quanto normais (MALTARIS, 2009;LARSEN,2004;MORITA, 2000 LITTLEY, 1991).Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: susceptibilidade maior às infecções náuseas, perda de cabelo e falência ovariana (MEIROW,2001; CHAPMAN,1981).

Uma variedade de antineoplásicos é capaz de induzir danos no material genético e estimular respostas como o bloqueio do ciclo celular, reparo no DNA ou apoptose. A resposta inicial das células é o bloqueio no ciclo em uma tentativa de reparar o dano, no entanto, se esse dano for muito extenso ou comprometer o metabolismo celular, cascatas de sinalização aciona mecanismos alternativos que inibem a proliferação das células e acionam vias de morte celular (FUERTES,2003, ALMEIDA, 2005).

A cisplatina é um agente genotóxico largamente empregado no tratamento do câncer e a quimioterapia baseada nesta droga mostrou-se efetiva contra diversos tipos de carcinomas, entre eles: testículo, ovário, esôfago, bexiga, mama, cabeça,pescoço e pulmão (KARTALOU & ESSIGMANN, 2001; CHANEY et. Al.,2004; BRABEC E & KASPARKOVA,2005; KIM et al.,2005. Essa droga liga-se ao DNA formando aductos intra e intercadeias, os quais levam a um bloqueio na duplicação e na transcrição podendo induzir apoptose nas células dependendo da extensão do dano causado (FUERTES, 2003).

Estes tratamentos, em sua maioria, causam destruição das células reprodutivas, menopausa precoce, produção de óvulos imaturos e perda quase total da atividade ovariana (MALTARIS, 2007;JERUSS, 2009). Os efeitos da quimioterapia sobre a fertilidade da idade da paciente, do tipo de agentes e da dose e protocolos empregues (DONNEZ, 2009; FONG, 2009), porém pelo menos uma fração da reserva ovariana será perdida em pacientes que estejam em tratamento com gonadotóxicos (ROBERTS, 2005).

A capacidade reprodutiva dos pacientes que sobrevivem aos tratamentos quimioterápicos torna-se diminuída, principalmente em

indivíduos com idade entre 15 e 44 anos. Pacientes diagnosticados entre zero e quatro anos são mais aptos a procriar do que os indivíduos que são diagnosticados na adolescência (GREEN, 2010; DONNEZ, 2009; SHERINS, 1978; RIVKEES, 1988). Estas informações são extremamente relevantes e devem ser ressaltadas no início dos tratamentos oncológicos, quando realizados na infância ou adolescência, para alertar os pacientes e sua família da possível diminuição da capacidade reprodutiva (GEENS, 2008).

Embora nem todos os tratamentos oncológicos afetem a fertilidade, um número significativo de crianças que sobrevivem à ação destes agentes correm risco de se tornarem inférteis. Após os tratamentos quimioterápicos, a maioria das células germinativas, responsáveis pelo processo reprodutivo é eliminada ocasionando a incapacidade total ou parcial em procriar (9,10)(GEENS, 2008; WARING, 2000).

Mais de 600.000 pessoas por ano são diagnosticadas com algum tipo de câncer invasivo nos Estados Unidos, sendo que 269.800 dos pacientes afetados são mulheres, 8% dos quais com menos de 40 anos (American Cancer Society, 2009). Estima-se que uma a cada 52 mulheres deverá ter câncer antes dos 39 anos (JEMAL *et al*, 2003; OKTAY, 2002) e a cada ano mais mulheres jovens têm câncer. Por outro lado, o índice de cura vem aumentando 0,6% ao ano, o que gera preocupação em preservar a fertilidade destas pacientes (11) (BLEYER, 2002). A função ovariana é caracterizada por células com rápida multiplicação, apresentando uma similaridade com as células tumorais o que as torna alvos potenciais para os agentes quimioterapêuticos.

TÉCNICAS PARA A PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

A radioterapia, quando utilizada no baixo abdômen, poderá danificar ou até destruir os ovários, dependendo do tamanho e localização do tumor e da intensidade de radiação necessária para a cura (LARSEN

et al, 2004). As pacientes jovens acometidas por câncer dispõem de algumas técnicas para a preservação da fertilidade, que consistem em criopreservar embriões, gametas e tecido ovariano ou ainda realocar os ovários na cavidade abdominal para evitar radiação direta (MORAES, 2010). A utilização destas técnicas apresenta restrições, conforme as características de cada paciente, e por conta disto, a comunidade científica ainda busca novas terapias para as pessoas que não possam usufruir de nenhuma das técnicas disponíveis.

A criopreservação é uma técnica laboratorial que permite a manutenção da viabilidade dos tecidos ou órgãos pelo seu armazenamento a temperaturas muito baixas. Esta técnica, quando combinada com a fertilização *in vitro* (FIV) ou técnicas cirúrgicas, oferece possibilidades para preservação da fertilidade das pacientes que, após a cura do câncer, desejem ter filhos (GEORGESCU, 2008).

O método estabelecido e rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução assistida é a criopreservação de embriões: uma técnica em uso corrente e com boas taxas de sucesso (CHANG, 2008; DONNEZ 2009). Os embriões humanos são muito resistentes à crioinjúria, com taxas de sobrevivência pós-descongelamento que variam entre 35 e 90 %, taxas de implantação entre oito e 30% e taxas de gravidez cumulativas maiores que 60% (2,8) (CHANG,2008; MALTARIS, 2009).

No entanto, esta opção requer a estimulação do ovário, a coleta de oócitos, e o uso de técnicas de reprodução assistida, que pode tomar de 2 a 5 semanas (OKTAY, 2008; AZIM, 2008). Sendo que o atraso do início da quimioterapia para congelamento de embriões não é viável para algumas pacientes e pode levar a um pior prognóstico para alguns tipos de câncer. Contudo, Leblanc e colaboradores (2009) não encontraram diferenças estatisticamente significativas no tempo entre o diagnóstico e início da quimioterapia num grupo de mulheres com carcinoma da mama que recorreram ou não a coleta de oócitos para FIV e criopreservação de embriões. O

congelamento de embriões também não se aplica a pacientes sem parceiro fixo com quem desejam produzir descendentes no futuro, como é o caso de adolescentes. Uma alternativa é o uso de sêmen de um banco de doadores, embora esta opção envolva questões religiosas e éticas (CHIAN, 2009;REVEL, 2008). Além disso, a estimulação não deve ser realizada em mulheres com tumores dependentes de hormônios, tais como o câncer da mama, embora alguns protocolos de estimulação utilizando o tamoxifeno e letrozole mostrem resultados encorajadores (OKTAY, 2005). O congelamento de embriões é considerado como a primeira opção para a preservação da fertilidade em mulheres com parceiro fixo, que estão em condições de serem submetidas a pelo menos um ciclo de FIV e é a técnica indicada oficialmente pela American Society of Clinical Oncology para a preservação da fertilidade (LEE, 2006).

Para o congelamento de embriões, o ovário é estimulado com hormônios, os óvulos retirados, fertilizados e posteriormente congelados em nitrogênio líquido, permanecendo assim até a paciente manifestar seu desejo de engravidar. É considerada uma técnica eficiente por proporcionar taxas de gravidez ao redor de 30% por ciclo (KUWAYAMA *et al*, 2005).

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica experimental e promissora que poderá ser aplicada em vários contextos neoplásicos e não-neoplásicos^{7,40}. É uma alternativa a ser aplicada em pacientes pré-púberes, sem companheiro do sexo masculino ou que rejeitam espermatozoides de doador^{2,7,21,40}, também podem ser submetidas à indução da ovulação também não necessita de estimulação ovariana, sem condicionar atrasos no tratamento anti-neoplásico^{2,7,8,21}. Outra vantagem em relação à criopreservação de embriões ou oócitos é a possibilidade de recuperação da função ovariana, com os benefícios da normalização dos níveis de estrogênio⁴⁰.

Na aplicação desta técnica, deverá considerar-se a idade da paciente, dada a diminuição da reserva folicular com o aumento da idade². Comparativamente às outras técnicas de criopreservação, esta apresenta um maior potencial de fertilidade, devido à obtenção de centenas de folículos primordiais com oócitos imaturos². A técnica mais comumente aplicada consiste na coleta de córtex ovariano (local onde se encontra o maior número de folículos primordiais) por laparoscopia ou laparotomia, sendo este, posteriormente, cortado em bandas de tecido com 1 a 3mm de espessura e cerca de 1cm³ de volume total, de modo a assegurar uma boa penetração dos agentes crioprotetores ⁴.A grande plasticidade natural do tecido ovariano facilita seu transplante para diferentes locais, onde podem ser revascularizados com restabelecimento da sua secreção e ovulação². Além disso, trata-se de um procedimento facilmente reversível e reprodutível^{2,4}. Contudo, as alterações de temperatura e de pressão acarretam risco de lesão dos oócitos, alterando a sua qualidade^{2,8}... Desde o primeiro caso relatado por Donnez et al. em 2004 existem aproximadamente 22 casos documentados de nascidos vivos após o transplante de tecido ovariano criopreservado (DEMEESTERE et al.,2010, DONNEZ et al, 2012;. MULLER et al, 2012). Apesar do sucesso alcançado pela criopreservação e transplante de todo o ovário em várias espécies animais, a sua aplicação em humanos permanece inviável, com ocorrência de fibrose, dificuldade na difusão dos crioprotetores em grandes fragmentos de tecidos e lesão vascular causada pela formação de cristais de gelo a nível intra-vascular^{2,8}.

É considerada uma técnica promissora por promover importante retorno de funções endócrinas em quase todos os casos relatados (ROSENDAHL et al, 2011; SILBER, 2012; POIROT et al., 2012). Porém, vale ressaltar a grande preocupação quanto ao reimplante de células malignas, eventualmente presentes nesse tecido, ou a possibilidade dessas células recolocadas se comportarem

como células de um possível tumor (12,13) (VARGHESE, 2008; SHIOZAWA, 2013).

Outra técnica utilizada para a preservação da fertilidade é a criopreservação de oócitos: esta é uma opção válida para as pacientes sem parceiro, que não querem utilizar um banco de sêmen para produzir seus embriões. Além disso, também é utilizada em países onde o congelamento de embriões é restrito pela legislação.

O primeiro relato de nascimento de uma criança após o descongelamento de oócito e posterior FIV, foi publicado em 1986 por Chen e colaboradores, mas as taxas de sobrevivência oocitária, fertilização e gestação eram mínimas. Com o avanço das tecnologias as técnicas foram aperfeiçoadas e em 2008, Cobo e colaboradores publicaram um estudo relatando taxas de sobrevida oocitária pós-descongelamento de até 96%, com 73% de taxa de fertilização, 38% de taxa de implantação uterina por embrião e até 63% de gestação. Essa viabilidade pode ser tão grande a ponto de a taxa de gestação com oócitos a fresco ser a mesma se a compararmos com a obtida com oócitos vitrificados em programas de ovodoação (COBO, 2010). Apesar destes resultados a criopreservação de oócitos é um processo restrito a pacientes que podem esperar de 3 a 5 semanas para dar início à quimioterapia e a tumores que não sejam afetados pela ação do estrogênio. Em alguns casos específicos os óvulos poderão ser maturados *in vitro*, para posteriormente serem congelados, diminuindo a ação do estrogênio (TAN *et al*, 2002; BOLSO *et al*, 2002).

Nas situações em que for necessária radioterapia na região pélvica, os ovários poderão ser atingidos diretamente e ter sua reserva ovariana prejudicada. Para minimizar este efeito realiza-se a oofaropexia (MORICE, 2000; TULANDI, 1998). A oofaropexia consiste na transposição dos ovários para um local fora do campo da radiação. Esta técnica é indicada quando a paciente necessita de radioterapia em linfonodos da região pélvica, não sendo possível em tumores nesta região, como câncer de colo de útero, câncer vaginal e

sarcomas pélvicos (MALTARIS, 2007; SILVA, 2006; CASTELOTTI, 2008). Este procedimento pode ser feito através da laparoscopia, sendo uma cirurgia minimamente invasiva, onde o ovário direito é liberado de seus ligamentos pélvicos mantendo seu pedículo vascular e, então, é fixado em uma posição mais cranial e lateral. O ovário direito é o escolhido, pois evita interferência do cólon sigmoide (14)(GERSHENSON, 2005). Após o término do tratamento, os ovários são realocados em sua posição original.

Um método efetivo e não invasivo para preservar a fertilidade masculina está disponível na utilização da criopreservação de sêmen, em contrapartida não há um método de rotina que seja utilizado para preservar a fertilidade feminina, após os tratamentos para a cura do câncer (15)(JERUSS, 2009). Assim as pesquisas se voltam para a busca de novas terapias, como o transplante de células- tronco, em busca de resultados mais efetivos.

CÉLULAS-TRONCO

A crescente abordagem das células-tronco na área científica se dá devido à plasticidade que estas células possuem característica que permite que elas se diferenciem em diversos tipos de tecidos tais como: coração, fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrintestinal, músculo esquelético e endométrio (DOHMANN, 2004; YOSHIMOTO 2006; MORIGI, 2012; NAKAGE e SANTANA, 2006; SAMPER, 2012; GARGETT, 2012). A realização de pesquisas que utilizam fontes de células-tronco adultas em detrimento das embrionárias é cada vez mais abundante, visto que a utilização de células-tronco embrionárias humanas é proibida em vários países e envolve uma série de questões éticas (ACERO 2010; TAKEUCHI & TANURI, 2006).

As células-tronco adultas são células indiferenciadas que tem como principais características a sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado

indiferenciado, proporcionando uma população ativa de maneira constante nos tecidos; e também a capacidade destas células de se diferenciar em diversos tipos de tecidos (16)(BYDLOWSKI et al., 2009). Quanto ao potencial de diferenciação, as células-tronco se classificam em: a) totipotentes: células capazes de se diferenciarem em todos os tecidos que formam o corpo humano, incluindo a placenta e membranas embrionárias (derivadas do zigoto); b) pluripotentes: células presentes na massa celular interna do blastocisto e capazes de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos humanos (ectoderma, mesoderma e endoderma); c) multipotentes: células que se diferenciam em vários tipos de células de um mesmo folheto embrionário (VERFAILLIE, 2002; OKAMOTO & SANTOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; MORSCZECK et al., 2008). A diferença básica quanto à natureza das células-tronco está na existência de células-tronco derivadas de embriões, as CT embrionárias (totipotentes ou pluripotentes) e células precursoras do organismo já desenvolvido, chamadas células-tronco adultas ou somáticas (SLACK, 2000; CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009).

As células-tronco mesenquimais (MSC) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009; ZUCCONI et al., 2009). Diversos órgãos e tecidos têm o seu compartimento de MSC, podendo ser isoladas da medula óssea, do tecido adiposo, rim, fígado, baço, pulmão, pâncreas, tendões, membrana sinovial, fluido amniótico, placenta, cordão umbilical e polpa dentária (NARDI & MEIRELLES, 2006; SEONG et al., 2010).

Estas células foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et al., em 1966, que observaram a presença de uma população celular peculiar em células mononucleares da medula óssea de

camundongos. Essa população era representada por células com formato fibroblastóide e apresentava a propriedade de formar colônias *in vitro*, sendo dessa forma denominadas de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) (NARDI & MEIRELLES, 2006; ZAGO & COVAS, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; HWANG & CHOIN, 2010).

Quando mantidas sob condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastóide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos (MENDELOW et al., 1980; PITTENGER et al., 1999; NARDI & MEIRELLES, 2006). Podem ser expandidas por mais de 40 passagens mantendo capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições (DEANS & MOSELEY, 2000).

As MSC expressam um grande número de moléculas bioativas como moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (HUSS, 2000; BOBIS ET al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; CAPLAN, 2009). Apesar de ser a medula óssea a fonte rotineiramente usada, esta possui limitações como a quantidade de células colhidas do paciente, além da ocorrência de dor e morbidade decorrentes do procedimento de coleta, enquanto que, as MSC derivadas do tecido adiposo são mais facilmente obtidas (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; YARAK & OKAMOTO, 2010).

Além do potencial de diferenciação, o potencial regenerativo das MSC deve-se à secreção de um amplo espectro de moléculas bioativas, como fatores de crescimento, que podem estruturar o microambiente de regiões lesadas (CAPLAN, 2007). Outra característica importante para o processo de regeneração

tecidual é a propriedade imunomoduladora apresentada por estas células, que são capazes de modular a função imunológica de várias populações celulares tais como células apresentadoras de antígenos, células T, células B e células NK (RAMUSSON, 2006; CASTELO-BRANCO,2012). Ademais, por não expressarem moléculas coestimulatórias, as MSC apresentam baixa imunogenicidade (UCELLI & PISTOIA, 2006).

Dessa forma, características como o fácil isolamento, multipotencialidade, potencial regenerativo e imunomodulador favorecem o uso das MSC para terapia celular de várias patologias o que é especialmente interessante para a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos (ZAGO & COVAS, 2006; KOLF et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009).

TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO E INFERTILIDADE

Estudos postulam a existência de células-tronco nos testículos e ovários, e a utilização destas tem efeito não só na restauração dos tecidos, mas também na geração de prole em modelos animais (ZOU, 2009; GOOSENS, 2013). Algumas décadas atrás se acreditava que a produção de oócitos nos ovários cessava antes do nascimento na maior parte das espécies de mamíferos (17)(ANDERSON,1992). Em 2004, estudos com ratas indicaram que a gônada feminina pode ter uma atividade regenerativa em animais jovens e adultos *in vivo* (18)(JOHNSON et al., 2004). Outros estudos relataram o isolamento, cultura e proliferação das células-tronco germinativas femininas (FGSC) *in vitro*, de forma estável durante meses. Estas células produzem mouse vasa homologue (MVH) (CASTRILLON, 2000) proteína expressa exclusivamente em células germinativas e também a capacidade de gerar espontaneamente oócito imaturos em cultura. (19,20)(ZOU et al. 2009; PACCHIAROTTI et al., 2010). Estudos *in vivo* mostraram que as FGSC injetadas em ovários de camundongas, pós - quimioterapia, foram capazes de produzir prole viável (19)

(ZOU et al. 2009). Estas descobertas, juntamente com outros estudos realizados (JOHNSON et al., 2005; NIIKURA et al., 2010), abriram a possibilidade de utilizar as FGSC para transplante em terapias destinadas a recuperar a função ovariana e fertilidade em fêmeas (TILLY et al. 2009 ; TILLY & TELFER, 2010).

CAPÍTULO 2

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO CYTOTHERAPY

CELL THERAPY FOR CHEMICALLY INDUCED OVARIAN FAILURE IN MICE

Abstract

No curative treatment is known for primary ovarian failure; however, mesenchymal stem cells (MSCs), through self-renewal and regeneration, were used to evaluate their role in the treatment of ovarian failure. Cell therapy has been linked to an unexplained return of ovarian function and fertility in some cancer survivors. Studies modeling this in mice have shown that cells transplantation generates donor-derived oocytes in chemotherapy -treated recipients. This study was conducted to further clarify the impact of cell transplantation from different sources on female reproductive function after chemotherapy using a preclinical mouse model. Methods: Female mice were administered 7,5 mg/kg cisplatin followed by cell transplantation (one week later) using GFP+ female cell donors. For cell tracking, adipose derived stem cell GFP+ (ADSC), female germline stem cell GFP+/ MVH+ (FGSC) or ovary cell suspension GFP+ mice was transplanted into cisplatin-treated wild-type recipients. After 7 or 14 days animals were killed and histological analysis, IHQ for GFP cells and ELISA for estradiol were performed. Results: Histological examinations showed that ADSC, ovary cell suspension and FGSC transplant increases the number of follicle with apparent normal structure in the cells recipient group euthanized in day 7. Cell tracking showed GFP + samples 7 days post transplant.

Conclusion: These data suggests that intra-ovarian injection of ADSCs and FGSC into mice with chemotherapy-induced ovarian failure diminished the damage caused by cisplatin.

Introduction

Premature ovarian failure is a syndrome characterized by lack of folliculogenesis and ovarian estrogen production, associated with amenorrhea and infertility in women under the age of 40 years (TIMRECK,2003). The syndrome is represented in 1% of menopausal women (21)(GOSDEN,2007) and in 0.1% under the age of 30 years (BECK-PECOZ,2006). One of the most devastating consequences of cancer treatment in the young female population is ovarian damage, resulting in diminished fertility potential (22)(MEIROW,2010). Sterilization and early menopause in young female adults have a high-level impact on patient self-esteem and quality of life. Adult stem cells have attracted considerable attention as tools for differentiation into several mesodermal lineages including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, cardiocytes, neural cells andhematopoietic-supporting stroma and may therefore partly replace the impaired cells (23) (Abdel-Latif, 2007)(DAWN,2005). The clinical application of adipose-derived stem cells (ADSC) as treatment for intractable diseases or traumatic tissue damage has attracted attention. Another kind of adult stem cell, named female germline stem cells (FGSC), that produce oocytes in vitro and fertilization-competent eggs in vivo have been identified in and isolated from adult mouse ovaries and has been tested in several researches (18,19)(JOHNSON, 2004, ZOU, 2009). Therefore, the aim of this study was to explore the therapeutic potency of intraovarian cell injection on ovarian function and structure in animal model of ovarian failure. We also investigated the restorative effects of ADSC, FGSC or ovary cell suspension on ovarian function.

METHODS

Animal model

Healthy C57BL/6 female mice was provided from FEPPS (Rio Grande do Sul Foundation of Production and Health Research) and used in the study. Animals between 7-8 weeks were used. C57BL/6 wild-type were used as recipients and C57BL/6 GFP+ mice were used as donor cells. Eighth-week-old C57BL/6 females used as recipients was failure ovarian induced by intraperitoneal injection of cisplatin (7,5mg/kg in phosphate buffered saline(PBS)). Controls were injected with PBS. All procedures involving animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and were conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press,1996).

Preparation of ovarian tissue for analysis.

Ovaries were fixed in 10% buffered formalin and processed to prepare paraffin blocks, and serial sections of 5-mm were obtained and stained for H&E. Immunohistochemical staining for GFP cell tracking were performed.

Isolation and characterization of Adipose Derived Stem Cells (ADSC)

ADSC were isolated from abdominal adipose tissue of C57Bl/6 GFP+ mice. Adipose tissue collected was degraded enzymatically in collagenase solution (1 mg/ ml) and the cell suspension obtained was centrifuged, resuspended in DMEM with 1% antibiotic-antimycotic, and 20% fetal bovine serum. Cells were plated and maintained in culture at 37 ° C with 5% CO₂. The isolated cells developed to visible

systematic colonies of adherent fibroblast-like cells at about 7-10 days after initial plating (ZUK et al., 2001). The ADSC differentiation potency was performed using specific protocols to induce differentiation into chondrocytes, adipocytes and osteocytes according to (24)(MEIRELLES & NARDI, 2003) and flow cytometry assays was performed for CD29, CD11b and CD34 markers.

Isolation of Female Germline Stem Cells (FGSC).

Between 12 and 16 ovaries was collected for each experiment. FGSCs were isolated using the two-step enzymatic digestion method described previously (NAGANO,1998; WU, 2005). Briefly dissected ovaries were placed in PBS solution without calcium or magnesium and containing collagenase (1 mg ml⁻¹, Type IV; Sigma), then incubated at 37 °C with gentle agitation for 15 min. The ovarian tissue was then washed 2 to 4 times in PBS, placed in 0.05% trypsin EDTA, and incubated at 37 °C for 10 min. When most of the cells were dispersed, trypsin was neutralized by adding 10% fetal bovine serum (FBS). The suspension was centrifuged at 300g for 5 min and the supernatant was carefully removed from the pellet. The pellet was resuspended and passed through a 70µm nylon cell strainer. These cells enriched for FGSCs were prepared by immunomagnetic isolation of MVH+ cells (18,19) (JOHNSON,2004;ZOU,2009). For that goat anti rabbit IgG microbeads (Miltenyi Biotec) were pre-coated with rabbit polyclonal MVH antibody (Abcam). MVH+ cells were separated by magnetic separation, according to the manufacturer's instructions.

Ovary Cell suspension

Between 8-12 ovaries was collected for each experiment. Ovary tissues were disaggregated using the two-step enzymatic digestion method described previously (NAGANO,1998; WU 2005). The suspension was centrifuged at 300g for 5 min and the supernatant

was carefully removed from the pellet. The pellet was resuspended and cell clumps were avoided by passing the suspension through a 70 μ m nylon cell strainer.

Anesthetic and surgical

Anesthesia was induced and maintained with isoflurane vaporized oxygen administered by a mask. Analgesia was performed with premedication single dose of tramadol hydrochloride (10mg.kg⁻¹) intramuscularly (IM). The animals were placed in the left lateral position. Trichotomy and antiseptis (chlorhexidine gluconate 2%) was performed on the right flank from the last rib to the pelvic region. Proceeded to skin incision approximately 0.5 cm caudal to the last rib. The approach of the abdomen was performed by planes until the abdominal cavity. The right ovary was located and exposed using delicate surgical material. After exposure, the ovary was suspended for his capsule and a single cell suspension containing 1x10⁴ cell was injected (5 μ L). Cell injection was performed using a 30G gingival needle attached to a microinjection device (see figure 3) (modified 17)(modified Zou et al., 2009) in a surgical microscope. Immediately after repositioned the ovary and proceeded to closing musculature. After procedure animals were kept under observation in an incubator with oxygen supply and heating until complete recovery from anesthesia.

No deformities, tumor formation or deaths were observed in the injection local injection into the ovary did not have any obvious side effects.

Figure 1

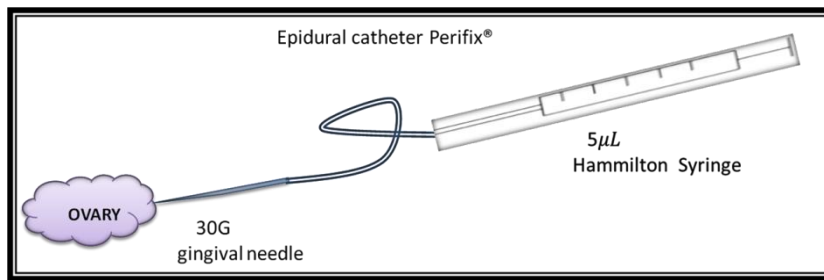


Figure 1: Schematic drawing: device for microinjection

Estradiol levels

Blood sample was collected from retro orbital plexus during euthanasia procedure. Serum was separated by centrifugation and stored at -80°C . Estradiol (E2) serum levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Uscn Life Science Inc., Houston, Texas, EUA).

Experimental design

48 female mice C57Bl/6 wild type were divided into 8 groups (n=6) and euthanasia was performed in 7 or 14 days after cell transplantation. ADSC 7 or 14 days (A7, A14), FGSC 7 and 14 days (F7, F14), ovary suspension 7 or 14 days (O7, O14) and control 7 or 14 days (C7, C14). One week after ovarian failure induced by intraperitoneal injection of cisplatin (7,5 mg/kg) animals were intraovarian injected with 5 ul volume containing 1×10^4 ADSC, FGSC, ovary cell suspension or PBS (control group).

Statistical analysis

We performed logistic regression to derive estimates of the probability of viable follicles in that sections of the ovaries.

RESULTS

Animal model

To verify the follicle depletion we performed histological analysis of the ovaries. H&E-stained sections of ovaries showed a lower number of viable follicles in chemotherapy-treated ovaries (Figure 4.a)

Isolation and characterization of cells

The ADSC cell population in culture was characterized by their adhesiveness and fibroblastoid shape and showed ability to *in vitro* differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes (Figure 2). Cells were evaluated for expression of CD29, CD34 and CB11b by flow cytometer. The majority of cells were negative for CD34 and CD11b and positive for CD29 (Figure 3).

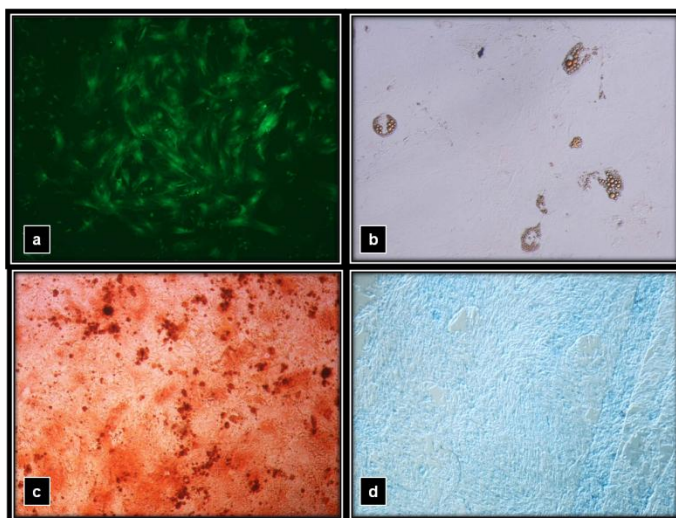


Figure 2: (a) Epifluorescence microscopy photomicrograph ADSC GFP+ positive cells culture 40x (b) Adipocyte differentiation Oil Red staining 20x (c)Osteocyte differentiation Alizarin Red staining 40x (d)Chondrocyte differentiation Alcian Blue staining 40x

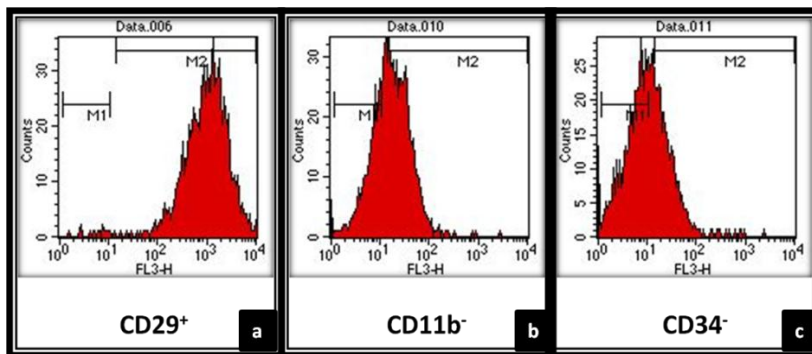


Figure 3: Flow cytometry assay, cells stained with MSCs cell surface antigen markers (a) CD29+ (b) CD11b- (c) CD34-.

Histological Analysis

ADSC, FGSC, Ovary cell suspension groups euthanized on day 7 after transplantation had a significant improvement compared to control. There was higher probability of follicles viable cells (71%) in FGSC group followed by OS (48%) and ADSC (43%) (Figure 4 and Figure 5). We also observed a tendency to better recovery in group FGSC compared to the other groups 14 days after transplantation, although this difference was not statistically significant. (Figure 4 and 6). There

was no difference in estradiol serum levels between all groups (data not shown).

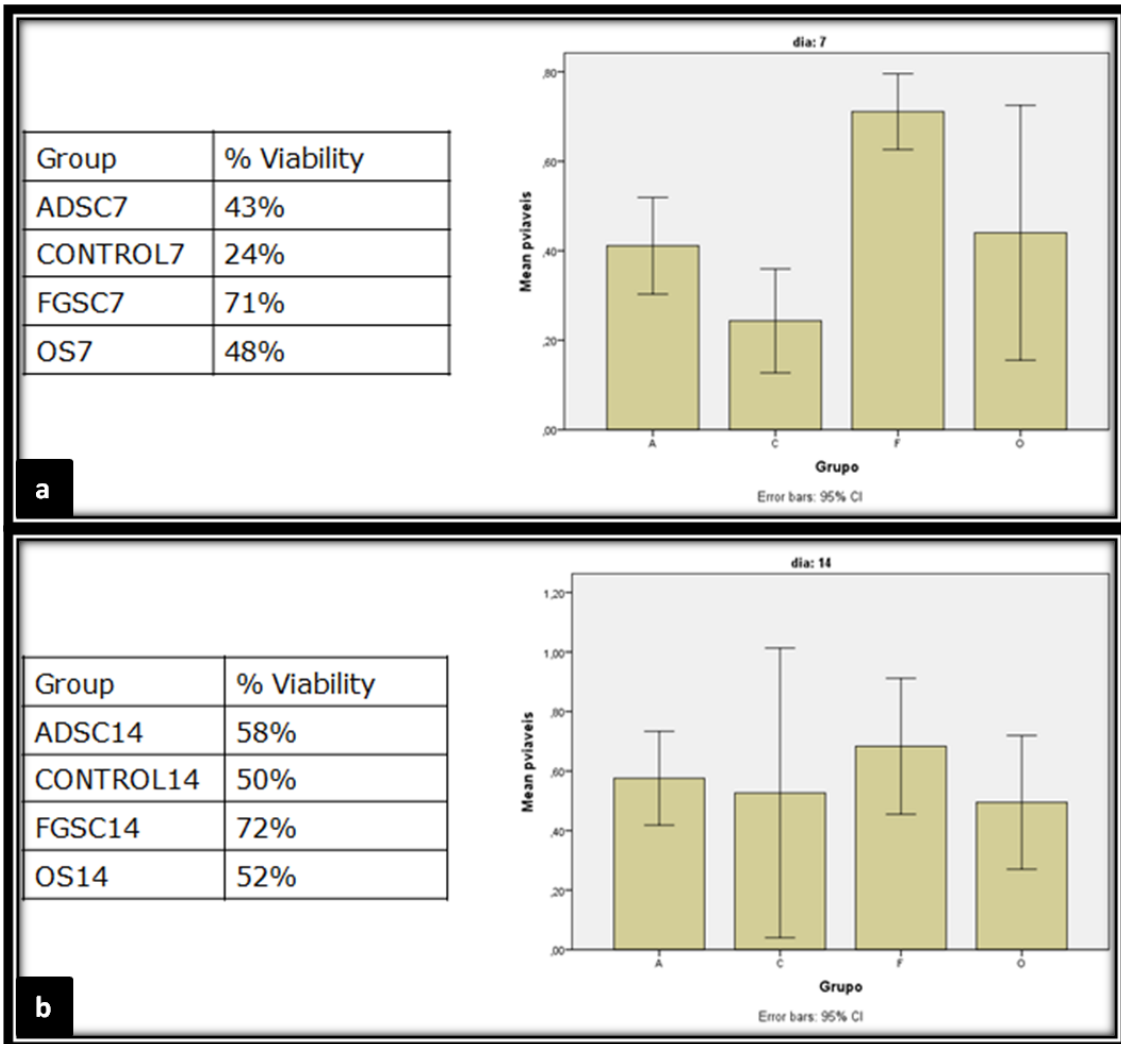


Figure 4: (a) Probability of viable cells in groups euthanized on day 7
 (b) Probability of viable cells in groups euthanized on day 14.

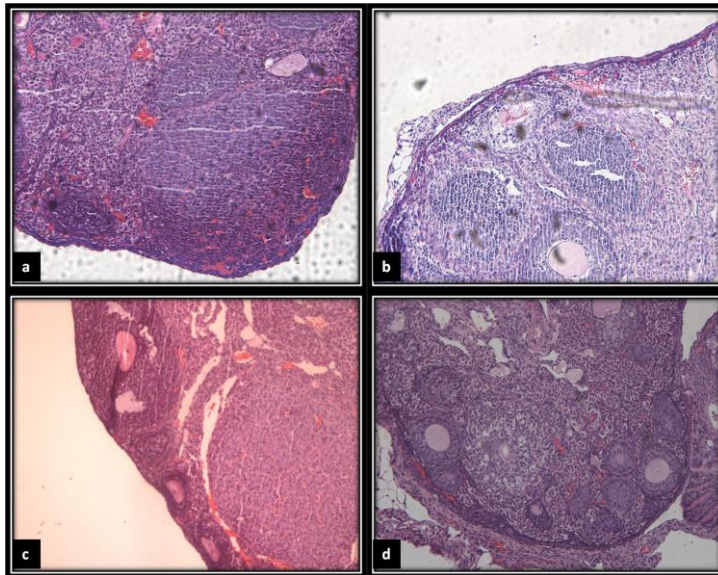


Figure 5: Photomicrograph H&E stained from histological ovaries sections: Experimental groups euthanized in day 7 (a) CONTROL 40x (b) Ovary suspension transplant 100x (c) ADSC transplant 100x (d) FGSC transplant 40x.

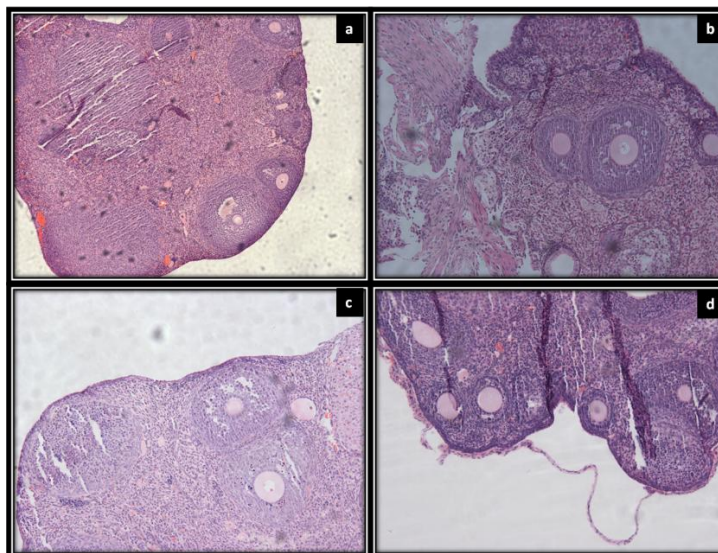


Figure 6: Photomicrograph H&E stained from histological ovaries sections: Experimental groups euthanized in day 14 (a) CONTROL 40 x (b) Ovary suspension transplant 200x (c) ADSC transplant 200x (d) FGSC transplant 100x.

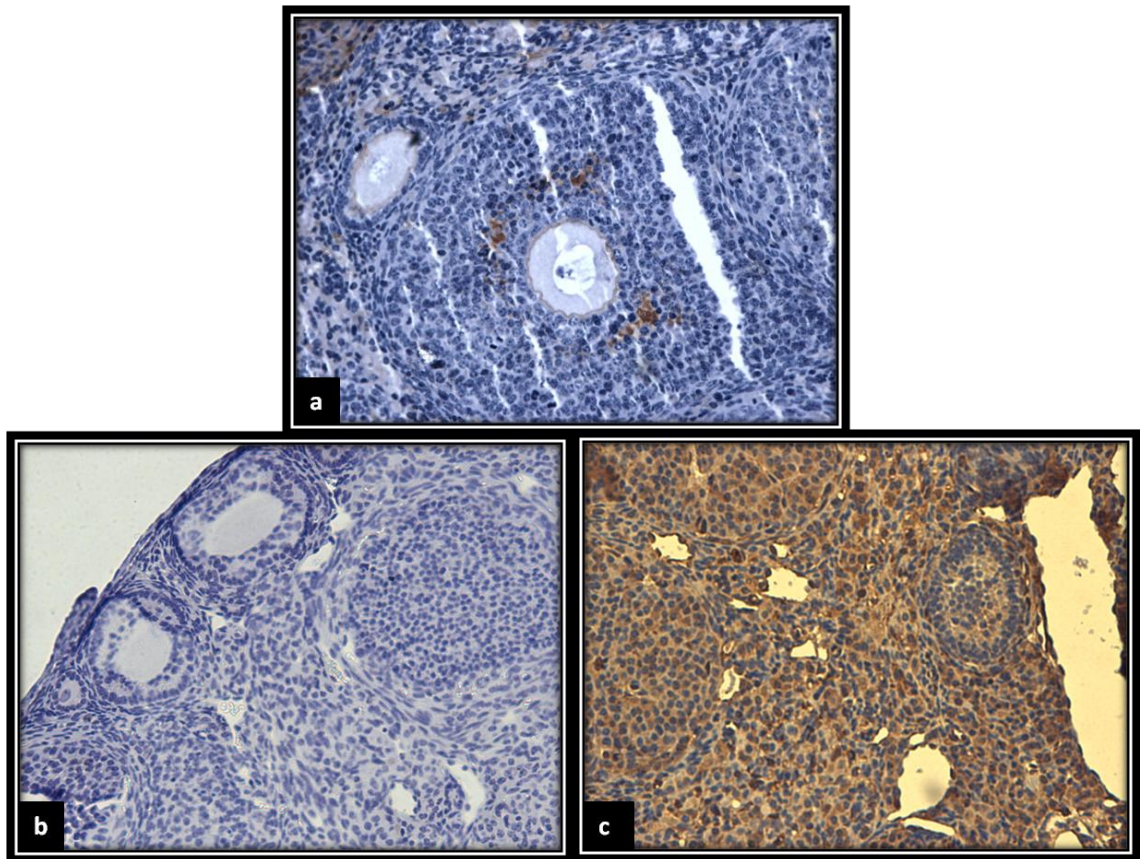


Figure 7: IHC for GFP cell tracking (a) GFP cells in ovary 7 days post transplant (b) Negative control (c) Positive control.

Discussion

Fu et al. 2008, using bone marrow derived stem cells, demonstrated that MSC secrete cytokines in vitro, including VEGF, IGF-1 and HGF; inhibits chemotherapy-induced apoptosis of GC in vitro by up-regulating Bcl-2 protein and cytokines and in a rat model of chemotherapy-induced ovarian damage, MSC transplantation reduces cell apoptosis and improves ovarian function.

Takehara et al. 2013 investigated the restorative effects on ovarian function and the safety of adipose-derived stem cells (ADSC). ADSC were shown to be capable of inducing angiogenesis and restoring the number of ovarian follicles and corpus lutea in ovaries. In addition, the localization of the Y chromosome was investigated using the fluorescent in situ hybridization method by injecting male ADSC into the ovaries; as a result, the Y chromosomes were localized not in the follicles, but in the thecal layers. The same way as Takehara, 2013 immunohistochemistry assay for GFP cell tracking, in our study, found the GFP cells distributed in thecal layer area (Figure 7a), which indicates that ADSC transplanted into the ovary may not differentiate directly into oocytes or granulosa cells, but may survive in the interstitium, playing important accessory roles in the microenvironment surrounding the oocytes in the ovary.

These findings suggest that MSCs may have a role in restoring damaged ovarian function and could be useful for regenerative medicine. Although ADSC transplantation have shown an improvement in viable follicles, in this study, FGSC transplantation showed better results on days 7 and 14 of euthanasia. Despite the concept of the finite and non-renewable stock of germ cells be considered a basic premise of reproductive physiology for over 150 years (BUKOVSKY et al., 2005), Johnson et al. (2004, 2005)

presented evidence to propose a revision of this paradigm, showing indications of oogenesis and folliculogenesis in the postnatal period, due stem cells characteristics, like the ability to generate cells of other tissues.

This potential stem cell plasticity appears to favor the hypothesis neo-oogenesis/folliculogenesis formulated by Johnson et al. (2004). These authors demonstrated the presence of specific proteins of meiosis in ovaries of adult mice, which would occur only during the fetal stage, according to the current concept. In the same study, the authors mention the reduction of atretic follicles as indicative of a significant hemodynamic activity in the female gonad, suggesting a more dynamic mobile traffic in the ovaries. The contrast of these findings and conclusions to previous concepts in the field resulted in considerable skepticism by some members of the scientific and medical communities (GOSDEN,2004; TELFER,2004;POWELL,2007; TILLY,2009).Nonetheless, a rapidly growing number of studies have subsequently confirmed that ovaries of adult mice contain a rare population of mitotically active germ cells that can be isolated and propagated in culture for months, and that give rise to oocytes in vitro and upon transplantation into ovaries of recipient mice in vivo (KERR,2006;ZHANG,2011;WHITE,2012). In your study we also isolate germ cells, by immunomagnetic separation, and transplanted to the ovary. Our results are consistent to several researches that use these stem cell type and showed better results in folliculogenesis (HO, 2011; WHITE, 2012). Although our analysis have focused on the evaluation of follicular viability, we can speculate that the group treated with MVH cells showed better results in comparison to groups ADSC and OS because the ability of folliculogenesis MVH demonstrated in the studies mentioned above. As opposed Abd-Allah et al. 2013 we found no statistical difference in serum estradiol levels. We attribute this discrepancy the use of a different animal models and different analysis times.

In addition to opening a new research field in human reproductive biology, that was inconceivable less than ten years ago, clear evidence for the existence of these cells in women may offer new opportunities to enhance current fertility preservation strategies. For example, with assisted reproductive technologies involving cryopreservation of ovarian cortical tissue already in development for female cancer patients (OKTAY,2000;SONMEZER,2010) isolation and expansion of FGSC from this tissue, before or after cryopreservation, might be useful for new fertility applications. In addition, the availability of a detailed protocol for purification of these newly discovered cells from human ovary tissue provides us a much more physiologically relevant *in-vitro* model system to study human female germ cell development instead embryonic stem cell- currently used as models for human female gametogenesis (NICHOLAS, 2009; KO, 2006).

Acknowledgments

We are grateful to FIPE/HCPA, FAPERGS and Pronex that supported this work.

CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO GERAL

Estratégias baseadas na utilização de células-tronco de ovário para a regeneração e produção de oócitos estão sendo propostas como terapias para o tratamento da infertilidade em mulheres (ABD-ALLAH et al , 2013 ; ZOU et al, 2009). As células tronco mesenquimais têm atraído interesse para sua possível utilização , tanto para terapia celular ar e terapias gênica por conta de sua capacidade de auto-renovação e multipotencialidade (Prockop,1997). Os nossos resultados demonstram que o transplante de células -tronco promove melhora em termos de recuperação de oócitos viáveis nos grupos que receberam células tronco adiposo derivadas (ADSC) e suspensão de ovário (OS) em comparação com o grupo de controle. Acreditamos que ambos os tipos de células , ADSC e OS, têm resultados semelhantes com base na teoria postulada por Meirelles e Nardi , em 2006, que propõe que as células-tronco mesenquimais residem em todos os órgãos e tecidos pós-natais em um nicho perivascular. Portanto, cremos que a suspensão de células de ovário possui as mesmas características anti-apoptóticas , imunomoduladoras , quimiotáticas e angiogênicas que as ADSC (Meirelles et al 2009). Um dos mecanismos envolvidos nesse reparo é a ação parácrina das células-tronco, que secreta mediadores envolvidos na reparação tecidual , impedindo a apoptose de células e promovendo uma recuperação funcional dos tecidos lesados (XU , 2007) . No entanto, atualmente existem poucas pesquisas disponíveis sobre o potencial terapêutico das células tronco mesenquimais no reparo do dano ovariano induzido por quimioterapia. Neste estudo demonstramos que o transplante intra ovariano melhora a função ovariana , sugerindo que este procedimento pode ser útil em pacientes com falência ovariana induzida por quimioterapia. Estes resultados estão de acordo com Abbasy et al. (2010) e Abd- Alla et al. (2013), que sugerem que o transplante de células tronco pode melhorar a função

ovariana, hormonal e de desenvolvimento folicular em ratas com falência ovariana . Fu et al . 2008, a partir da células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSC), demonstraram que as células-tronco são capazes de secretar citocinas in vitro , incluindo o VEGF , IGF - 1 e HGF ; inibindo a apoptose induzida por quimioterapia nos ovários das ratas , concluindo que o transplante de BMSC reduz a apoptose das células e melhora a função ovariana. Takehara et al . 2013 investigou os efeitos sobre a função ovariana e a segurança do transplante de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC). As ADSC mostraram ser capazes de induzir a angiogênese e restabelecer o número de folículos nos ovário. Além disso , a localização do cromossoma Y foi investigada usando o método de hibridação fluorescente in situ (FISH) por injeção de ADSC oriundas de machos nos ovários , e como resultado , os cromossomas Y não foram localizados nos folículos , mas nas camadas da teca . Da mesma forma , em nosso trabalho, a imunohistoquímica para o rastreamento de células GFP , encontrou as células GFP distribuídas pela camada da teca, o que indica que células transplantadas para os ovários podem não se diferenciar diretamente em oócitos e células da granulosa , mas podem sobreviver no interstício , desempenhando papéis importantes no microambiente que envolve os oócitos no córtex ovariano. Estes resultados sugerem que o transplante de células-tronco mesenquimais pode ter um papel na restauração da função do ovário danificado podendo ser útil na medicina regenerativa . Embora o transplante de ADSC tenha mostrado uma melhora nos folículos viáveis , neste estudo , o transplante células-tronco germinativas de ovário (FGSC) apresentou melhores resultados nos grupos eutanasiados 7 e 14 dias após o transplante de células. Apesar de o conceito de estoque finito e não renovável de células germinativas ser considerado uma premissa básica da fisiologia reprodutiva há mais de 150 anos (Bukovsky et al. , 2005) ,

Johnson et al. (2004) apresentaram evidências para propor uma revisão deste paradigma , mostrando indícios de oogênese e foliculogênese no período pós-natal. Esses autores demonstraram a presença de proteínas específicas da meiose nos ovários de ratas adultas , o que iria ocorrer somente durante o período de gestação, de acordo com o conceito vigente. No mesmo estudo , os autores citam a redução de folículos atrésicos como indicativos de uma atividade hemodinâmica significativa na gônada feminina , sugerindo um tráfego móvel mais dinâmico nos ovários. O contraste desses resultados e conclusões a conceitos anteriores no domínio resultou em considerável ceticismo por parte de alguns membros das comunidades científicas e médicas (GOSDEN , 2004; TELFER , 2004; POWELL , 2007; TILLY , 2009) . No entanto, outros estudos confirmaram posteriormente que os ovários de ratas adultas contêm uma população rara de células germinais mitoticamente ativas que podem ser isoladas e expandidas em cultura durante meses , e que dão origem aos oócitos *in vitro* e *in vivo* após serem transplantadas em ovários de ratas receptoras (KERR , 2006; ZHANG , 2011; WHITE, 2012). Em nossos estudos, também isolamos as células germinativas , pela técnica de separação imunomagnética , e realizamos transplante intra ovariano. Nossos resultados estão de acordo com as pesquisas que fazem uso de células-tronco germinativas e apresentam melhores resultados na recuperação da foliculogênese foliculogênese (HO , 2011; WHITE, 2012). Apesar de nossa análise ter sido concentrada na avaliação da viabilidade folicular, podemos especular que os grupos tratados com células-tronco germinativas apresentaram melhores resultados em comparação com os grupos ADSC e OS , pois este tipo de células-tronco tem capacidade de promover foliculogênese. Ao contrário do trabalho realizado por Abd -Allah et al. 2013 não encontramos diferença estatística nos níveis de estradiol no soro dos animais transplantados . Atribuímos essa discrepância ao uso de um modelo

animal diferente e aos diferentes tempos de análise . Além de abrir um novo campo de pesquisa em biologia reprodutiva humana, que era inconcebível menos de dez anos atrás, uma clara evidência para a existência destas células em mulheres podem oferecer novas oportunidades para melhorar as estratégias de preservação de fertilidade atuais. Por exemplo , com tecnologias de reprodução assistida envolvendo a criopreservação de tecido cortical do ovário, já em desenvolvimento para doentes com cancer (OKTAY , 2000 ; SONMEZER , 2010) o isolamento e a expansão das células-tronco germinativas deste tecido , antes ou após a criopreservação , pode ser útil para as novas aplicações da fertilidade . Além disso , a disponibilidade de um protocolo detalhado para a purificação dessas células recentemente descobertas a partir de tecidos de ovário de humano nos proporciona um sistema muito mais fisiologicamente relevante de modelo in vitro para estudar o desenvolvimento da célula germinativa feminina humana , em vez de células estaminais embrionárias , actualmente utilizados como modelos para o homem gametogênese feminina (NICHOLAS, 2009; KO , 2006).

REFERÊNCIAS

Abd-Allah S; Shalaby S M, Pasha HF, Raafat N, Shabrawy S, Amer M, Gharib, M ,El Kelawy H M Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. 2013 *Cytotherapy*; 15: 64e75

Beck-Peccoz P, Persani L. Premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:9.

Fu X, Fang L, Li X, Cheng B, Sheng Z. Enhanced woundhealing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen*. 2006;14: 325e35.ar

Gosden RG, Treloar SA, Martin NG, Cherkas LF, Spector TD, Faddy MJ, et al. Prevalence of premature ovarian failure in monozygotic and dizygotic twins. *Hum Reprod*. 2007;22:610e5.

Gosden RG. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Hum Reprod Update* 2004;10:193–5.

Hubner K, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003; 300:1251–1256.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J K & Tilly, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004 428, 145–150.

Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*. 2009; 462:222–225.

Kerr JB, Myers M, Britt KL, Mladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 2006;132:95–109.

Ko K, Scholer HR. Embryonic stem cells as a potential source of gametes. *Semin. Reprod. Med*. 2006; 24:322–329.

Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardik immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009;11:377e91.

Meirelles L S, Nardi N B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology*. 2003, 123, 702–711

Meirelles L S, Chagastelles P C, Nardi N B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006; 119, 2204-2213

Meirelles L S, Fontes A M, Covas D T, Caplan A I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009; 20, 419-427

Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol*. 2010;53:727e39.

Nicholas CR, Chavez SL, Baker VL, Reijo Pera RA. Instructing an embryonic stem cell-derived oocyte fate: lessons from endogenous oogenesis. *Endocr. Rev*. 2009; 30:264–283.

Nicholas CR, Haston KM, Grewall AK, Longacre TA, Reijo Pera RA. Transplantation directs oocyte maturation from embryonic stem cells and provides a therapeutic strategy for female infertility. *Hum. Mol. Genet*. 2009; 18:4376–4389.

Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N. Engl. J. Med*. 2000; 342:1919.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*. 2007;25: 896e902.

Powell K. Going against the grain. *PLoS Biol* 2007;5:e338.

Sonmezer M, Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2010; 24:113–126.

Telfer EE. Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary: a phenomenon of prosimian primates and mice? *Reprod Biol Endocrinol* 2004;18:24.

Tilly JL, Niikura Y, Rueda BR. The current status of evidence for and against postnatal oogenesis in mammals: a case of ovarian optimism versus pessimism? *Biol Reprod* 2009;80:2–12.

Timmreck LS, Reindollar RH. Contemporary issues in primary amenorrhea. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2003; 30:287e302.

White YAR, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012;18:413–21.

Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:441e8.

Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3742e8.

Zuk, P. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the cell*, v. 13, p. 4279–4295, 2002.

Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009;11:631–6.

.Forman EJ, Anders CK, Behera MA. A nationwide survey of oncologists regarding treatment-related infertility and fertility preservation in female cancer patients. *Fertil Steril.* 2009

Chang HJ, Suh CS. Fertility preservation for women with malignancies: current developments of cryopreservation. *J Gynecol Oncol.* 2008; 19(2): 99-107.

Elizur SE, Tulandi T, Meterissian S, Huang JYJ, Levin D, Tan SL. Fertility Preservation for Young Women with Rectal Cancer - A Combined Approach from One Referral Center. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13; 1111-1115.

Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril.* 2003;80(1); 193-198.

Maltaris T, Beckman MW, Dittrich R. Fertility Preservation for Young Female Cancer Patients. *in vivo.* 2009; 23; 123-130.

6. Zivanovic O, Carter J, Kauff ND, Barakat RR. A review of the challenges faced in the conservative treatment of young women with endometrial carcinoma and risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009; **115**; 504-509

Anderson, L.D. and A.N. Hirshfield, *An overview of follicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum in vitro*. *Md Med J*, 1992. **41**(7): p. 614-20.

Bassi, G., et al., *Adipose-derived stromal cells (ASCs)*. *Transfus Apher Sci*, 2012. **47**(2): p. 193-8.

Bleyer, W.A., *Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials*. *Med Pediatr Oncol*, 2002. **38**(1): p. 1-10.

Boiso, I., et al., *A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage*. *Hum Reprod*, 2002. **17**(7): p. 1885-91.

Bydlowski S P, Debes A A, Maselli L M F, Janz F L. *Características biológicas das células-tronco mesenquimais* *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;**31**(Supl. 1):25-35

Castellotti D S et al; *Preservação da Fertilidade em pacientes com câncer*. *Rev Bras Hematol Hemoter* v30 n5:406-10 2008.

Gershenson, D.M., *Fertility-sparing surgery for malignancies in women*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2005(34): p. 43-7.

Gentile, P., et al., *Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery*. *Stem Cells Transl Med*, 2012. **1**(3): p. 230-6.

Geens, M., et al., *Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application*. *Hum Reprod Update*, 2008. **14**(2): p. 121-30.

Jeruss, J.S. and T.K. Woodruff, *Preservation of fertility in patients with cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(9): p. 902-11.

Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2003*. CA Cancer J Clin, 2003. **53**(1): p. 5-26.

Johnson, J., et al., *Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary*. Nature, 2004. **428**(6979): p. 145-50.

Johnson, J., et al., *Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood*. Cell, 2005. **122**(2): p. 303-15.

Konno, M., et al., *Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine*. Dev Growth Differ, 2013

Li, Q., et al., *CD73 adipose-derived mesenchymal stem cells possess higher potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro*. J Mol Histol, 2013.

Maltaris, T., M.W. Beckmann, and R. Dittrich, *Review. Fertility preservation for young female cancer patients*. In Vivo, 2009. **23**(1): p. 123-30.

Miedema, B., J. Easley, and L.M. Robinson, *Do current cancer follow-up care practices meet the needs of young adult cancer survivors in Canada? A qualitative inquiry*. Curr Oncol, 2013. **20**(1): p. 14-22.

Pacchiarotti J, et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. Differentiation. 2010; 79:159–170.

Rivkees, S.A. and J.D. Crawford, *The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage*. JAMA, 1988. **259**(14): p. 2123-5.

Sklar, C., *Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production*. Med Pediatr Oncol, 1999. **33**(1): p. 2-8.

Sherins, R.J., C.L. Olweny, and J.L. Ziegler, *Gynecomastia and gonadal dysfunction in adolescent boys treated with combination chemotherapy for Hodgkin's disease*. N Engl J Med, 1978. **299**(1): p. 12-6.

Shiozawa, Y., et al., *Cancer stem cells and their role in metastasis*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(2): p. 285-93.

Tan, S.L., T.J. Child, and B. Gulekli, *In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**(4): p. 684-9.

Takehara, Y., et al., *The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function*. Lab Invest, 2013. **93**(2): p. 181-93.

Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.

Varghese, A.C., et al., *Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: challenges for fertility preservation*. Reprod Biol Endocrinol, 2008. **6**: p. 47.

Verfaillie, C.M., *Adult stem cells: assessing the case for pluripotency*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(11): p. 502-8.

Waring, A.B. and W.H. Wallace, *Subfertility following treatment for childhood cancer*. Hosp Med, 2000. **61**(8): p. 550-7.

Williams, R.S., R.D. Littell, and N.P. Mendenhall, *Laparoscopic oophoropexy and ovarian function in the treatment of Hodgkin disease*. Cancer, 1999. **86**(10): p. 2138-42.

Zago, A. & Covas, T. *Células-tronco – A fronteira da Medicina*. Atheneu, São Paulo. 245p., 2006.

