



REVISÃO DE LITERATURA

REPRODUÇÃO ANIMAL

MÉTODOS DE OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE TECIDO REPRODUTIVO EM FÊMEAS

Methods of obtaining and preserving reproductive tissue in females

Msc. Kayan C. Rossey^{1*}, Msc. Rodrigo D. S. Albuquerque¹, Dr. Pedro Paulo M. Teixeira¹

¹Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina Veterinária, PA, Brasil.

RESUMO

Muitas técnicas foram aprimoradas com o objetivo de conservar a fertilidade em animais e humanos. Hoje temos opções viáveis e cada vez menos invasivas em seus métodos de obtenção. Criopreservação e transplantes de células ou órgãos são as opções mais utilizadas na tentativa de preservar tecidos reprodutivos em fêmeas. Congelamento lento e vitrificação são comumente utilizados como técnica de criopreservação, enquanto os xenotransplantes têm se mostrado uma excelente opção dentro das técnicas de recuperação de fertilidade por transplantes. Apesar da maioria dos métodos apresentarem protocolos estabelecidos, ainda há muito estudo a ser feito para melhorar a eficiência dessas técnicas.

PALAVRAS-CHAVE: criopreservação, xenotransplante, videolaparoscopia.

ABSTRACT

Many techniques have been improved with the aim of preserving fertility in animals and humans. Today we have viable and less invasive options in their methods of obtaining. Cryopreservation and transplantation of cells or organs are the most commonly used options in the attempt to preserve reproductive tissues in females. Slow freezing and vitrification are commonly used as a cryopreservation technique, while xenotransplants have proven to be an excellent option within transplant fertility recovery techniques. Although most methods have established protocols, there is still much work to be done to improve the efficiency of these techniques.

KEY-WORDS: cryopreservation, xenografting, videolaparoscopy

INTRODUÇÃO

Alguns procedimentos cirúrgicos ou terapêuticos podem afetar diretamente o funcionamento dos ovários quando necessitam ser realizados. Quimioterapias, radioterapias ou até mesmo transplante de medula óssea, por exemplo, em casos de pacientes com neoplasias ovarianas, leucemia ou linfoma, são grandes causadores de falha ovariana prematura total ou parcial (JADOUL e DONNEZ, 2012; DONNEZ et al. 2013; DITTRICH et al. 2014). Com isso, há constantes buscas a fim de preservar a fertilidade de fêmeas, seja em humanos ou em outros animais. Para tal, alguns procedimentos cirúrgicos e técnicas para promover esse avanço foram desenvolvidas.

Atualmente há, também, pesquisas em busca de procedimentos cada vez menos invasivos em animais para a realização de técnicas de conservação de gametas, pois a dor é um dos principais fatores contra o bem-estar animal. (FITZPATRICK et al. 2006). Os procedimentos cirúrgicos convencionais causam danos aos animais, como aderências e fibroses (PIATEK et al. 2015), além de requerer maior tempo cirúrgico e ocasionar mais dores (TEIXEIRA et al. 2011a) e, com isso, essas técnicas não são a melhor opção para obtenção de tecidos reprodutivos.

Em contraponto, procedimentos videolaparoscópicos têm se mostrado eficientes na amenização dos traumas cirúrgicos, pois, além de serem realizados em menor tempo de procedimento, causam menos dores, minimizam o estresse pós-cirúrgico e proporcionam uma melhor recuperação (TEIXEIRA et al. 2011a).

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico realizado em diversos animais e é feita muitas vezes para a retirada de tumores, mas pode ser também realizada para fins de produção em caso de fêmeas criadas para abate (SILVA et al. 2006; CARVALHO et al. 2010), conservação de tecido reprodutivo (DITTRICH et al. 2014; BARROS et al. 2015b; COURBIERE et al. 2016) ou terapêutica, em casos de transplante de tecido como terapia para pacientes com câncer (DITTRICH et al. 2015; SECRETO et al. 2017). Com isso essa revisão tem como objetivo reunir as técnicas para obtenção dos ovários de forma menos invasiva e os métodos de conservação de tecidos mais utilizados.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Laparoscopia como método menos invasivo

A laparoscopia é um procedimento de videocirurgia alternativo para contornar cirurgias abertas. Segundo Teixeira et al. (2011a) a laparoscopia pode ser realizada para auxiliar cirurgias ou até mesmo para executá-las. As videocirurgias podem ser feitas de forma videoassistida, na qual são realizados dois pontos de acesso, um para o equipamento de vídeo e outro para pinça de manipulação. Neste tipo de procedimento há a visualização da cavidade abdominal

através do equipamento de vídeo para localizar o órgão a ser realizado a cirurgia, porém o mesmo é tracionado para fora do corpo pelo mesmo ponto de acesso da pinça para realização do procedimento. Já os procedimentos chamados laparoscópicos totais são realizados totalmente no interior da cavidade abdominal utilizando o endoscópio para visualização da cavidade e pontos de acessos variados para pinças de manipulação.

Outros avanços em técnicas videolaparoscópicas são com relação ao número de acessos (portais) necessários para a realização do procedimento. Comumente esses procedimentos são realizados utilizando três portais, por um será introduzida a câmera e os demais para pinças de manipulação (TEIXEIRA et al. 2011b). Porém, atualmente com o avanço da técnica alguns procedimentos cirúrgicos podem ser realizados somente por dois portais (GAUTHIER et al. 2015), ou até mesmo utilizando um único ponto de acesso (BARROS et al. 2015a; COURBIERE et al. 2016).

Em comparação ao tempo cirúrgico testados em cães em cirurgias ovarianas, como ovariectomias, não há diferença significativa entre as técnicas de um ou dois portais (DUPRE et al. 2009). Contudo, Case et al. (2011) constataram que em cirurgias de ovariectomia em cadelas a comparação de técnicas com um, dois ou três portais, o tempo cirúrgico e dores no pós-operatório são menores em cirurgias realizadas utilizando dois portais.

Com o sucesso das cirurgias realizadas por vídeo, a técnica se expandiu e hoje é utilizada em diversos tipos de procedimentos cirúrgicos, como citostomias (KANNO et al. 2017), biópsias (MELO et al. 2015) e outros diagnósticos (PIATEK et al. 2015) ou ovariectomias (BARROS et al. 2015a).

Ovariectomias são procedimentos cirúrgicos de retirada dos ovários para conservação de gametas que podem ser realizadas por laparoscopia ou laparotomia (CASSATA et al. 2017), contudo, Teixeira et al (2011a) encontraram vantagens no tempo cirúrgico e na recuperação e bem-estar de ovelhas nos procedimentos realizados por laparoscopia. Esse procedimento pode ser realizado de forma pouco invasiva por laparoscopia utilizando até mesmo um único portal (BARROS et al. 2015a; COURBIERE et al. 2016).

CONSERVAÇÃO DE GAMETAS

Criopreservação

Criopreservação pode ser utilizada para preservação de uma única célula, como oócito (TORRE et al. 2016), um tecido inteiro, como a região cortical ovariana (BARROS et al. 2015c), ou até mesmo embrião (KAYE et al. 2017).

A criopreservação é uma técnica de extrema importância na conservação de tecidos reprodutivos. Segundo Donnez et al. (2006), a criopreservação de tecido ovariano é a única opção para fêmeas

que apresentam doenças no período pré-púbere e não podem adiar o tratamento, como por exemplo, quimioterapia ou radioterapia onde causam falha prematura do ovário em quase 100% dos casos (DONNEZ et al. 2013).

Existem algumas técnicas descritas para o processo de criopreservação, dentre elas temos o congelamento lento, ou método convencional, e a vitrificação, que basicamente se diferem na velocidade da diminuição de temperatura, a concentração e o tipo de crioprotetores (ONIONS et al. 2009; ZENG et al. 2009).

O método convencional consiste na utilização de baixa concentração de crioprotetores, que podem variar entre intracelular e extracelular, e uma curva de congelamento programada através de um aparelho com resfriamento regulável, em uma velocidade de aproximadamente 1°C/min. Por último, quando os embriões se encontram em uma temperatura média de aproximadamente -35°C, os embriões são imersos em nitrogênio líquido (WHITTINGHAM et al. 1972). Algumas alternativas a essa técnica foram testadas aumentando a velocidade de resfriamento programada e tempo de exposição aos crioprotetores. Esta técnica é conhecida também como “congelamento rápido” (CHUPIN E DE REVIERS, 1986), porém é pouco utilizada atualmente.

Devido a sensibilidade ao choque térmico e químico (PINCTON et al. 2000), o método convencional de criopreservação apresentava obstáculos em seus testes pela formação de cristais de gelo intra e extracelular, que muitas vezes causavam injúrias (MULLEN e CRITSER, 2007).

Com isso foi desenvolvida a técnica de vitrificação, que apresenta cada vez mais resultados com melhores desempenhos em testes experimentais (AMORIM et al. 2011). O processo de vitrificação consiste na alta concentração de crioprotetores associada com resfriamento a uma velocidade extremamente alta, não permitindo formar cristais de gelo na célula ou tecido criopreservado, passando do estado líquido diretamente para o estado vítreo (KASAI et al. 1990).

Em caso de criopreservação de tecido ovariano por vitrificação, Gorricho et al. (2018) comprovou que o tamanho do fragmento influencia no sucesso da técnica em gatos, onde os menores fragmentos obtiveram taxa superiores a 72% de conservação de folículos em comparação com 48% dos fragmentos maiores, além de menores taxas de apoptose.

Em contrapartida Arav et al. (2005), Arev et al. (2010) e Campbell et al. (2014) conseguiram realizar o transplante de ovário inteiro em ovelhas após criopreservação por congelamento lento, apresentando após 24 meses atividade hormonal e oócitos capazes de se desenvolverem em embriões por partenogênese.

Alguns trabalhos apontam o congelamento lento como melhor método para preservação de gametas e embriões (VATANPARAST et al. 2018), porém é um método lento, que requer mais tempo e custo (ABEDELALI et

al. 2013; ZHOU et al. 2010), enquanto que o método de vitrificação requer menos custo e tempo, porém utiliza altas concentração de crioprotetores tóxicos. Todas as técnicas apresentam, além de vantagens, desvantagens, com isso é necessário avaliar o objetivo do experimento a ser executado e realizar testes para elencar a técnica mais adequada.

As técnicas de criopreservação já são realizadas em gatos (GORRICHIO et al. 2018), ovelhas (AREV et al. 2005; BORDES et al. 2005), porcos (MARTZ & WHITAKER 2018), cães (JIVAGO et al. 2018) e até humanos (DONNEZ et al. 2013) e se mostram eficazes e aplicáveis para conservação de fertilidade.

Transplantes

As técnicas de transplantes podem variar de acordo com a origem do tecido e o animal receptor. De acordo com Millis e Martinez (2007), um transplante pode ser feito em um mesmo indivíduo de uma região do corpo pra outra (autotransplante), entre indivíduos da mesma espécie mas não geneticamente idênticos (alotransplante), para indivíduos idênticos geneticamente (isotransplante) e Honaramooz et al. (2002) descreveram pela primeira vez com sucesso um protocolo envolvendo outro tipo de transplante, o xenoenxerto ou xenotransplante, que envolve um tecido de um animal doador inserido em um animal receptor de uma outra espécie para cultivo (AUBARD, 2003). Por envolver dois animais de espécies diferentes, há grandes chances de rejeição do tecido em animais xenotransplantados (AUBARD, 2003), para isso, a técnica de transplante passou a ser realizada em animais receptores imunossuprimidos (BARROS et al. 2015c).

Esta técnica se resume na seleção de um doador para a retirada do tecido, castração do animal receptor e aplicação do tecido na linha média das costas do animal receptor por incisão subcutânea para o cultivo (TANG et al. 2012). Os camundongos são os animais receptores mais utilizados. Com relação ao sítio de implantação, o transplante pode ser ortotópico, quando o tecido é transplantado no receptor na mesma região da qual foi retirado no doador, ou heterotópico, quando é transplantado para qualquer região diferente da de origem (DEMEESTERE et al. 2009).

Atualmente, trabalhos já são realizados utilizando xenotransplantes em fêmeas apresentando sucesso em seus resultados, cultivando tecido ovariano em porcas (KIKUCHI et al. 2011), onde obtiveram oócitos a partir de tecido ovariano xenotransplantado e cultivado em camundongo, com capacidade de serem fertilizados e se desenvolverem até estágios iniciais embrionários. Resultados semelhantes foram encontrados também em ovelhas (BARROS et al. 2015c), onde esta técnica também se mostrou aplicável nessa espécie, não apresentando rejeição ou necrose de tecido. O xenotransplante já tem sido

testado até mesmo em humanos (DITTRICH et al. 2015), onde trabalhos já provaram esta técnica ser útil pois apresentam sucesso na maturação oocitária e produção de folículos antrais provenientes de tecidos xenotransplantados, se mostrando como uma real alternativa para pacientes com câncer.

Os avanços dessa técnica em fêmeas já apresentam resultados significativos em restauração de função ovariana (CAMPBELL et al. 2014), criopreservação de tecido reprodutivo (DITTRICH et al. 2015) e preservação de material genético (ARREGUI et al. 2008).

Com isso, notamos que ainda que existam avanços a serem feitos, muitos métodos já são considerados viáveis de aplicação para pacientes que precisam passar por procedimentos que comprometam a fisiologia da sua reprodução. As técnicas de criopreservação e transplantes apresentam variações de protocolos, porém ambos com metodologias adaptadas para procedimentos com diversos grupos animais e taxas satisfatórias de recuperação de folículos ovarianos. Todavia, muitos estudos ainda precisam ser realizados para melhorar a eficiência desses métodos, visto que alguns ainda possam alcançar taxa de sucesso ainda maior.

REFERÊNCIAS

- Abedelahi A, Rezaei-Tavirani M, Mohammadnejad D. 2013. Fertility preservation among the cancer patients by ovarian tissue cryopreservation, transplantation, and follicular development. *Iranian journal of cancer prevention*. 6(3), 123.
- Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A. et al. 2011. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*. 23(2):160-186.
- Arav A, Gavish Z, Elami A. et al. 2010. Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries. *Reproductive biomedicine online*. 20(1):48-52.
- Arav A, Revel A, Nathan Y. et al. 2005. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Human Reproduction*, 20(12):3554-3559.
- Arregui L, Rathi R, Megee SO. et al. 2008. Xenografting of sheep testis tissue and isolated cells as a model for preservation of genetic material from endangered ungulates. *Reproduction*. 136(1):85-93.
- Aubard Y. 2003. Ovarian tissue xenografting. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 108(1):14-18.
- Barros FFPC, Teixeira PPM, Silva MAM. et al. 2015a. Single-port laparoscopic ovariectomy using a pre-tied loop ligature in Santa Ines ewes. *Ciência Rural*. 45(11):2033-2038.
- Barros FFPC, Teixeira PPM, Vrisman DP. et al. 2015b. Xenotransplantedetecidoreprodutivoparaconservação de gametas – revisão de literatura. *Agropecuária Científica no Semiárido*. 10(4):49-54.
- Barros FFPC, Teixeira PPM, Silva MAM. et al. 2015c. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(2):121-126.
- Bordes A, Lornage J, Demirci B. et al. 2005. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction*. 20(10):2745-2748.
- Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V. et al. 2014. Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Human Reproduction*. 29(8):1749-1763.
- Carvalho CRP, Marcon CC, Kozicki LE. et al. 2010. Ovariectomia visando à engorda de vacas de corte em confinamento. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*. 8(4):405-408.
- Case JB, Marvel SJ, Boscan P. et al. 2011. Surgical time and severity of postoperative pain in dogs undergoing laparoscopic ovariectomy with one, two, or three instrument cannulas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 239(2):203-208.
- Cassata G, Palumbo VD, Cicero L. et al. 2017. Laparotomic vs laparoscopic ovariectomy: comparing the two methods. The ovariectomy in the bitch in laparoscopic era. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis*. 87(3):271-274.
- Chupin D, De Reviers, MM. 1986. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*. 26(2):157-166.
- Courbiere B, Crochet P, Marcelli M. et al. 2016. Laparoscopic ovariectomy by single-port access for ovarian cryopreservation. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 293(3):591-594.
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S. et al. 2009. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Human reproduction update*. 15(6):649-665.
- Dittrich R, Lotz L, Fehm T. et al. 2015. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue - a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertility and Sterility*. 103(6):1557-1565.
- Dittrich R, Lotz L, Hackl J. et al. 2014. Options for Fertility Preservation in Cancer Patients. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 11(5):274-279.
- Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A. et al. 2013. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and sterility*. 99(6):1503-1513.
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul PMM. 2006. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproduction Update*. 12(5):519-535.
- DuprE G, Fiorbianco V, Skalicky M. et al. 2009. Laparoscopic ovariectomy in dogs: comparison between single portal and two-portal access. *Veterinary Surgery*. 38(7):818-824.
- Fitzpatrick J, Scott M, Nolan A. 2006. Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Ruminant Research*. 62(1):55-61.
- Gauthier O, Holopherne-Doran D, Gendarme T. et al. 2015. Assessment of postoperative pain in cats after ovariectomy by laparoscopy, median celiotomy, or flank laparotomy. *Veterinary Surgery*. 44(1):23-30.
- Gorricho CM, Tavares MR, Apparício M, Fonseca-Alves CE, Macente BI, Mansano CF, Toniollo GH. 2018. Vitrification of cat ovarian tissue: Does fragment size matters? *Reproduction in Domestic Animals*. 53:125-132.
- Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M. et al. 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*. 418(6899):778-781.

- Jadoul P, Donnez J. 2012. How does bone marrow transplantation affect ovarian function and fertility?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 24(3):164-171.
- Jivago JLPR, Paulini F, Silva RC. et al. 2018. Cryopreservation and characterization of canine preantral follicles. *Cryobiology*. 81:34-42.
- Kanno K, Andou M, Yanai S. et al. 2017. Total Laparoscopic Treatment With Cystotomy for Intramural Bladder Leiomyoma. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 25(1):14-15
- Kasai M, Niwa K, Iritani A. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *Journal of reproduction and fertility*. 63(1):175-180.
- Kaye L, Will EA, Bartolucci A. et al. 2017. Pregnancy rates for single embryo transfer (SET) of day 5 and day 6 blastocysts after cryopreservation by vitrification and slow freeze. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 34(7):913-919.
- Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N. et al. 2011. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. *Animal Science Journal*. 82(4):495-503.
- Martz M, Whitaker BD. 2018. Zinc Chloride Supplementation during Ovarian Cortex Vitrification Improves in Vitro Follicular Development in Pigs. *Journal of Animal Science*. 96:260-260.
- Melo CH, Sousa FC, Batista RIPT. et al. 2015. Comparative analysis of laparoscopic and ultrasound-guided biopsy methods for gene expression analysis in transgenic goats. *Genetics and Molecular Research*. 14(3):8672-8684.
- Millis DL, Martinez SA. 2007. *Enxertos ósseos*. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3. ed. Barueri: Manole. pp. 1875-1891.
- Mullen SF, Critser JK. 2007. *The science of cryobiology*. In: Woodruff TK, Snyder KA. Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors. 1. Ed. Boston: Springer. pp. 83-109.
- Onions VJ, Webb R, McNeilly AS. et al. 2009. Ovarian endocrine profile and long-term vascular patency following heterotopic autotransplantation of cryopreserved whole ovine ovaries. *Human Reproduction*. 24(11):2845-2855.
- Piatek A, Skrzypczak PIOTR, Biezyński J. et al. 2015. Laparoscopic evaluation of macroscopic lesions in the uterus and adjacent tissues in sheep after ovariectomy. *Medycyna Weterynaryjna*. 71(6):354-357.
- Picton HM, Kim SS, Gosden RG. 2000. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *British Medical Bulletin*. 56(3):603-615.
- Secreto G, Muti P, Sant M. et al. 2017. Medical ovariectomy in menopausal breast cancer patients with high testosterone levels: a further step toward tailored therapy. *Endocrine-related câncer*. 24(11):21-29.
- Silva LAF, Pales AP, Fioravanti MCS. et al. 2006. Anel de látex aplicado no pedículo ovariano de bezerras Nelore. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 28(1):97-103.
- Tang L, Rodriguez-Sosa JR, Dobrinski I. 2012. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in mice. *Journal of Visualized Experiments*. 6(60):1-10.
- Teixeira PPM, Padilha LC, Motheo TF. et al. 2011a. Ovariectomy by laparotomy, a video-assisted approach or a complete laparoscopic technique in Santa Ines sheep. *Small Ruminant Research*. 99(2):199-202.
- Teixeira PPM, Padilha LC, Oliveira MEF. et al. 2011b. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*. 127(3):169-175.
- Torre A, Vertu-Ciolino D, Mazoyer C. et al. (2016). Safeguarding fertility with whole ovary cryopreservation and microvascular transplantation: higher follicular survival with vitrification than with slow freezing in a ewe model. *Transplantation*. 100(9):1889-1897.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science*. 178(4059):411-414.
- Vatanparast M, Khalili MA, Yari N. et al. 2018. Evaluation of sheep ovarian tissue cryopreservation with slow freezing or vitrification after chick embryo chorioallantoic membrane transplantation. *Cryobiology*. 81:178-184.
- Zeng W, Snedaker AK, Megee S. et al. 2009. Preservation and transplantation of porcine testis tissue. *Reproduction, Fertility and Development*. 21(3):489-497.
- Zhou XH, Wu YJ, Shi J et al. 2010. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology*. 60(2):101-105.