

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia

**CÉLULAS-TRONCO OVARIANAS E RECUPERAÇÃO DA FERTILIDADE  
PÓS-QUIMIOTERAPIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Isabel Cirne Lima de Oliveira Durli

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia

**CÉLULAS-TRONCO OVARIANAS E RECUPERAÇÃO DA FERTILIDADE  
PÓS-QUIMIOTERAPIA EM CAMUNDONGAS**

Isabel Cirne Lima de Oliveira Durli

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr Eduardo Pandolfi Passos

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

Porto Alegre, 2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Durli, Isabel  
Células-Tronco Ovarianas e Recuperação da  
Fertilidade Pós-Quimioterapia em Camundongos Fêmeas /  
Isabel Durli. -- 2018.  
45 f.  
Orientador: Eduardo Pandolfi Passos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Infertilidade. 2. Cisplatina. 3. Células-tronco  
da linhagem das oogonias. 4. Ovário. I. Pandolfi  
Passos, Eduardo, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Gustavo, por me apoiar sempre, nos momentos bons e ruins. Aos meus filhos Francisco e Roberta pelo amor que sempre me deram.

Agradeço aos meus pais, por todo o seu esforço para que eu tivesse acesso ao estudo por estarem sempre presentes, apoiando nas horas difíceis e celebrando as conquistas.

A toda minha família e a família do Gustavo que sempre me apoiaram.

Ao meu orientador Eduardo Pandolfi Passos e a Professora Elizabeth Cirne-Lima, por me acolherem no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, por me darem grandes oportunidades de aprendizado acadêmico e profissional.

Gostaria de agradecer especialmente a Professora Ana Helena da Rosa Paz pela disponibilidade em me ajudar na reta final dos experimentos com muitos ensinamentos e também a sua dedicação em me ajudar a escrever a tese com a maior paciência e conhecimento.

Às colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, especialmente à Laura, à Paula, à Cristiana, à Fernanda Oliveira, Vitória, Mariana, Bruna, Gabriela, além de tantas outras colegas que estiveram sempre disponíveis a ajudar, indo até mesmo nos finais de semana me acompanhar nos experimentos

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental, que se mostraram sempre dispostos a ajudar e permitiram que esse estudo fosse realizado, em especial à veterinária Tuane e a enfermeira Marta da Unidade de Experimentação Animal, à Flavia, da Unidade de Patologia Experimental, e à Pati Lu.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	5
METODOLOGIA PARA REVISÃO DA LITERATURA.....	7
MAPA CONCEITUAL ESQUEMÁTICO .....	9
REVISÃO DA LITERATURA .....	9
1. Ciclo Reprodutivo e Ovulação.....	11
2. Tratamento do câncer e danos às Gonadas.....	13
3. Opções atualmente disponíveis para preservar a fertilidade .....	15
4. Células tronco, células-tronco Oogoniais e a terapia celular.....	16
JUSTIFICATIVA.....	19
HIPÓTESES .....	20
OBJETIVOS.....	21
Principal .....	21
Específicos.....	21
REFERÊNCIAS .....	22
ARTIGO EM INGLÊS.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
PERSPECTIVAS .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

### Abreviaturas em Inglês

FSH	Follicle stimulating hormone - Hormônio folículo-estimulante
GFP	Green fluorescent protein – Proteína verde fluorescente
GSCs	Germinative Stem Cells – Células tronco Germinativas
IHQ	Immunohistochemistry - Imunohistoquímica
LH	Luteinizing hormone - Hormônio luteinizante
OSCs	Oogonial Stem Cells - células-tronco da linhagem das oogônias
OSE	Ovary surface epithelium - Epitélio ovariano de superfície
SOP	Polycystic ovary syndrome - síndrome dos ovários policísticos

## Abreviaturas em Português

Kg	Kilogramas
NaCl	Cloreto de sódio
μl	Microlitros

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Experiment Infographic. ....	32
Figura 2. Weight loss after cisplatin protocol.....	35
Figura 3. Cytometry and immunocytochemistry for DDX4 expression ..	36
Figure 4. Histology sections of ovaries.....	36
Figura 5. Follicules Counting .....	37
Figura 6. IHQ for GFP positive cells.....	38



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados das estratégias de busca na literatura. ....	8
--	---

## RESUMO

**Introdução:** a alta prevalência do câncer e o aumento significativo da sobrevivência a longo prazo geraram interesse quanto à preservação da fertilidade em mulheres jovens expostas a quimioterapia e radioterapia. Nesse sentido, as células-tronco da linhagem das oogônias (oogonial stem cells - OSCs), abriram uma nova perspectiva de aplicação no tratamento e prevenção da infertilidade humana. **Objetivos:** neste trabalho isolamos as OSCs de camundongos para a terapia celular na recuperação da fertilidade pós-quimioterapia. **Delineamento:** Trata-se de um estudo experimental controlado. **Método:** Foram utilizadas como receptoras 18 camundongos fêmeas C57BL/6 adultas jovens. Como doadoras de OSCs foram utilizadas 8 camundongos C57BL/6 transgênicos para a proteína verde fluorescente (green fluorescent protein - GFP). O protocolo de indução de infertilidade consistiu em quinze injeções intraperitoneais de 2,5 mg/Kg de cisplatina com intervalo de 7 dias entre as três rodadas. O ciclo estral anterior e posterior a quimioterapia foi utilizado como controle da indução de infertilidade. Após três ciclos de quimioterapia, tendo sido confirmada a infertilidade, o grupo tratamento (9 fêmeas C57BL/6) recebeu  $36 \times 10^4$  de uma suspensão celular contendo OSCs em solução fisiológica através de microinjeção intra-ovariana. O grupo controle (9 fêmeas C57BL/6) passou pela mesma intervenção cirúrgica e recebeu apenas solução fisiológica. Dez dias após a terapia celular, as fêmeas foram colocadas em contato com os machos para o acasalamento. Após 21 dias foi verificada a ocorrência de prole. Análises histológicas dos ovários e de imunohistoquímica foram realizadas para quantificar folículos viáveis e atrésicos. Na prole foi realizada imunohistoquímica para GFP na procura de células oriundas das OSCs transplantadas. **Resultados:** Avaliações histológicas demonstraram que as OSCs foram capazes de aumentar o número de folículos primários, secundários e totais. Os animais tratados com OSCs alcançaram até duas gestações consecutivas. Em contraste, nenhuma fêmea no grupo de controle demonstrou função ovariana e nenhuma apresentou gestação. Os filhotes do grupo tratado apresentaram células positivas para GFP no tecido epitelial, muscular e nervoso, indicando a contribuição das OSCs GFP+ transplantadas para a formação da quimeras. **Conclusão:** A injeção intra-ovariana de OSCs em camundongos fêmeas com insuficiência ovariana induzida por cisplatina diminuiu o dano tecidual e foi capaz resgatar a fertilidade.

**Palavras-chaves:** Cisplatina, infertilidade, células-tronco oogoniais, ovário

**Palavras-chaves:** Cisplatin, infertility, oogonial stem cells, ovary.

## ABSTRACT

**Background:** Chemotherapy patients have adverse effects on the structure and function of the ovary leading to infertility. Recent studies have challenged the dogma that women are born with a finite number of oocytes without the capacity for renewal. Reports demonstrate formation of new oocytes from newly discovered germline stem cells, referred to as oogonial stem cells (OSCs). This study was conducted to further clarify the impact of a cell suspension enriched in OSCs on female reproductive function in an in vivo model of cisplatin-induced ovarian gonadotoxicity. **Aims:** To isolate OSCs from mice and apply for cell therapy in cisplatin-induced infertility mice model. **Design:** This is a controlled experimental study. **Methods:** Female mice received three cycles of 5 days 2.5 mg/kg cisplatin intraperitoneal applications followed by seven-days recovery. Infertile mice received GFP positive OSCs in loco into the ovary. Ten days after cell transplantation females were placed with males for 7 days in order to evaluate the possibility of progenies generation. Pups were evaluated for GFP expression and after F2 progeny generation females were killed and ovaries were processed for histology and follicle counting **Results:** Histological examinations shown OSCs were able to increase the number of primary, secondary and total follicles. OSCs treated animals achieved up to two consecutive pregnancies in contrast none of the animals in the control group demonstrated ovarian function and none achieved a pregnancy. Pups from the treated group presented GFP positive cells in epithelial, muscle, and nervous tissue indicating the contribution of transplanted GFP positive OSCs to the chimera formation. **Conclusion:** Intraovarian injection of OSCs into mice with cisplatin-induced ovarian failure diminished the histological damage and rescue fertility.

**Key words:** Cisplatin, infertility, oogonial stem cells, ovary

## INTRODUÇÃO

O tratamento para o câncer pode apresentar vários efeitos deletérios no trato reprodutivo. Sabe-se que exposição à quimioterapia ou à radioterapia diminui marcadamente o número de folículos presentes no ovário (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011). A destruição desses folículos pode causar falência ovariana prematura ou menopausa precoce. Dados da literatura científica demonstram que o tratamento com agentes alquilantes como a ciclofosfamida durante a adolescência aumenta em 9 vezes o risco de falência ovariana prematura. Nesse sentido, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica afirma que também a cisplatina é apresenta toxicidade gonadal. Entretanto, apesar de alta toxicidade gonadal, a cisplatina e outras drogas com o mesmo efeito são frequentemente utilizadas para tratar cânceres em adolescentes e mulheres em idade reprodutiva, especialmente nos tratamentos de cânceres das linhagens germinativas, câncer de mama, câncer cervical localmente avançado e outros tumores malignos (TANAKA et al., 2018).

Diferentes opções para a preservação da fertilidade são propostas para as pacientes com câncer. A criopreservação de embriões é um procedimento bem estabelecido, entretanto não se aplica a mulheres sem parceiro/a e pré-pubescentes. A criopreservação de oócitos maduros tem sido bastante estudada e hoje em dia é sugerida para pacientes que iniciarão protocolos de tratamento com drogas anticâncer gonadotóxicas porém, devido ao tamanho e a complexidade do oócito, não existem garantias da eficiência de fertilização pós-descongelamento. Ainda cabe salientar que o congelamento de embriões ou oócitos envolve um protocolo de estímulo hormonal que muitas vezes não pode ser aplicado a pacientes em tratamento de câncer e que, se puder ser aplicado, promoverá um atraso na terapia anticâncer de, pelo menos, duas semanas. Por outro lado, a criopreservação de tecido ovariano tem sido extensamente estudada e atualmente consiste na única forma possível de preservação da fertilidade em pacientes pré-pubescentes e em mulheres que necessitam iniciar imediatamente o tratamento para o câncer (LUYCKX et al., 2014).

As células-tronco são definidas como células capazes de extensa auto renovação e de originar ao menos um tipo de descendente altamente

diferenciadas. Vários tecidos pós-natais têm reservatórios de células-tronco específicas que contribuem para a sua manutenção e regeneração (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Em 2004 o grupo de Jonathan Tilly descreveu a presença de uma população de células da linhagem germinativa mitoticamente ativas (Germinative Stem Cells – GSCs ou Oogonial stem cells - OSCs) no ovário de camundongos fêmea. Os autores postularam que estas células mantêm a produção de oócitos e folículos após o nascimento (JOHNSON et al., 2004). Isto questionou o dogma da biologia reprodutiva de que a produção de células germinativas nas fêmeas mamíferas termina antes do nascimento, dogma este, embasado em um trabalho de Solomon Zuckerman, publicado em 1951. Muito debate acerca de existência/presença das OSCs em fêmeas em idade reprodutiva tem sido gerado. Neste trabalho procuramos fornecer dados científicos que possam embasar essa discussão e promover subsídios para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos que possam reverter os danos causados às gônadas femininas durante o tratamento do câncer.



## METODOLOGIA PARA REVISÃO DA LITERATURA

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada utilizando as bases de dados Pubmed, Lilacs, Medline e Google Acadêmico com as seguintes palavras-chaves: 1) *cisplatin and infertility* 2) *cisplatin and ovary* 3) *infertility and oogonial stem cells* 4) *oogonial stem cells and ovary* 5) *infertility and cisplatin and ovary*. A busca foi feita filtrando os resultados publicados nos últimos 5 anos (vide tabela 1).

Cruzando as palavras-chave, *cisplatin and infertility* foram encontrados 14.000 resultados no Google acadêmico. No Pubmed foram encontrados 49 artigos. No Lilacs, não foram encontrados resultados e no Medline 134. Ao se cruzar *cisplatin and ovary*, foram encontrados 17.700 resultados no Google acadêmico, 166 resultados no Pubmed, 33 resultados no Lilacs e 6.451 no Medline. Em relação ao cruzamento das palavras-chave *infertility and oogonial stem cells* foram encontrados 4.710 resultados no Google acadêmico. No Pubmed foram encontrados 12 artigos. No Medline foram encontrados 17 e no Lilacs, não foram encontrados. Ao se cruzar *oogonial stem cells e ovary* foram encontrados 6.340 resultados no Google acadêmico, 30 resultados no Pubmed, 45 no Medline e não foram encontrados resultados no Lilacs. E no cruzamento das três *infertility, cisplatin and ovary* no Google acadêmico foram encontrados 10.100 resultados, 9 no Pubmed e 27 no Medline no Lilacs não foram encontrados resultados.

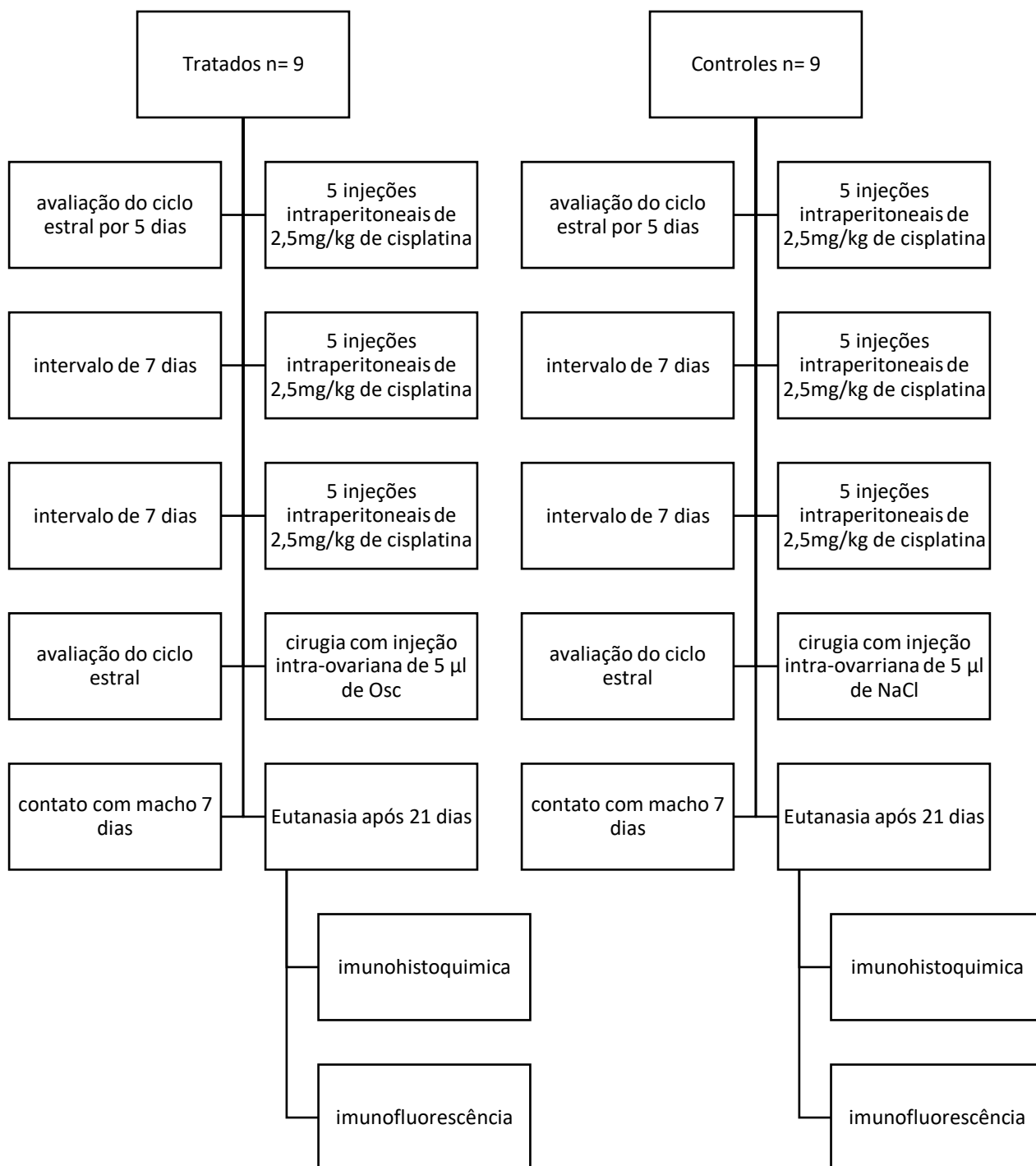
A partir dessa busca na literatura, foram selecionados 37 artigos como referências bibliográficas do manuscrito.

TABELA 1 - Resultados das estratégias de busca na literatura.

<b>Palavras-chaves</b>	<b>Google acadêmico</b>	<b>Pubmed</b>	<b>Lilacs</b>	<b>Medline</b>
<b>Cisplatin and infertility</b>	14.00	49	-	134
<b>Cisplatin and ovary</b>	17.700	166	33	6.451
<b>infertility and oogonial stem cells</b>	4.710	12	-	17
<b>Oogonial stem cells and ovary</b>	6.340	30	-	45
<b>Infertility, cisplatin and ovary</b>	10.100	9	-	27



## MAPA CONCEITUAL ESQUEMÁTICO



Foram utilizados camundongos fêmeas adultos com oito semanas de idade, C57BL/6. Utilizamos o tratamento com quimioterápico para indução da esterilidade. Para este grupo de animais foi adotada uma modificação do protocolo descrito por Sawhney et al. (2005) que consiste em cinco aplicações

diárias consecutivas intraperitoneais de 2,5 mg/Kg de cisplatina (diluída em NaCl 0,9%), seguidas por um intervalo de sete dias de recuperação, uma segunda série de 5 aplicações intraperitoneais de 2,5 mg/Kg e uma terceira série de 5 aplicações de cisplatina para a indução de falência ovariana. Esse protocolo induz uma exposição subcrônica à cisplatina que mimetiza o tratamento através de regimes de quimioterapia na clínica. Cada grupo foi submetido aos procedimentos cirúrgicos 7 dias após a última injeção de quimioterápico no total 18 animais, controles (n=9) e tratados (n=9).

O grupo tratado recebeu uma suspensão de  $36 \times 10^4$  células enriquecida em OSCs em solução fisiológica *in loco* nos ovários através de microinjeção intra-ovariana de 5µL. O grupo controle (contendo 9 animais C57BL/6) também passou pela intervenção cirúrgica e recebeu apenas de solução fisiológica (NaCl 0,9%). Após a cirurgia as fêmeas passaram por 10 dias de recuperação e foram colocados nas caixas com os machos na qual permaneceram por 7 dias. Vinte e um dias depois após foi verificada a prole. Ao final do protocolo experimental um ovário de cada animal do grupo tratado e do grupo controle foi fixado em fomol tamponado 10% para as análises histológicas. As amostras de ovários processadas em blocos de parafina foram seccionadas em cortes de 4 µm e analisadas por HE para a contagem dos diferentes folículos. A prole foi avaliada por IHQ para a expressão de GFP.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Ciclo Reprodutivo e Ovulação

Em todas as espécies de mamíferos, o desenvolvimento de folículos e oócitos segue uma sequência característica de eventos que começa com o estabelecimento do ovário e termina com a ovulação de um oócito fértil, em metáfase II (PICTON et al., 2008). O desenvolvimento folicular começa já no quarto mês da vida fetal. As células germinativas primordiais, neste momento, migram do endoderma do saco vitelino para a crista gonadal, passando por divisões mitóticas. Uma vez chegando à crista gonadal, as oogônias entram na primeira divisão meiótica e se tornam oócitos primários. As células somáticas originárias da gônada primitiva (ou seja, células epiteliais de superfície, células da granulosa e da teca, células intersticiais, fibroblastos) circundam a oogônia, formando folículos ovarianos rudimentares (0,1 mm de diâmetro). Folículos contendo oócitos no estágio de dictióteno da meiose constituem a reserva folicular ovariana, que fornece o potencial reprodutivo por toda a vida da mulher (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

Os mecanismos subjacentes à progressão do desenvolvimento dos folículos primordiais humanos do estado de repouso para o estado de crescimento não são totalmente compreendidos. As evidências atualmente disponíveis indicam que o destino de cada folículo é dependente de um equilíbrio delicado entre a expressão e a ação de fatores que promovem a proliferação, crescimento e diferenciação das células foliculares e aqueles que promovem a apoptose; alguns folículos primordiais iniciam o crescimento enquanto outros permanecem quiescentes por meses ou anos. Os folículos pré-antrais (0,1 a 0,2 mm) desenvolvem-se independentemente do estímulo das gonadotrofinas. Quando alcançam um diâmetro de 0,2 a 0,4 mm, começa a desenvolver-se uma cavidade cheia de fluido (isto é, o antro) e os folículos tornam-se responsivos às gonadotrofinas. Os folículos podem evoluir para o estágio antral precoce ao longo da vida fetal e durante a infância, mas regredem. Na puberdade, a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada resulta na liberação pulsátil do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) da hipófise, que culmina no desenvolvimento cíclico de folículos antrais  $\geq 2$ mm, início da ovulação e menstruação (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

Quando os folículos primários entram na fase de crescimento, seu tamanho aumenta, tanto pelo aumento do oócito quanto pela proliferação de células da granulosa, gerando folículos de múltiplas camadas (folículos secundários). Ao se unirem, a camada circundante de células do estroma se estratifica e se diferencia em duas partes: a parte externa é a teca externa e a parte interna é a teca interna. A partir de um diâmetro folicular de cerca de 0,15 mm em humanos, a teca interna inicia sua diferenciação epitelíóide e o folículo é definido como um folículo pré-antral. Em humanos, os folículos passam do estágio pré-antral ao estágio antral precoce com um diâmetro folicular compreendido entre 0,18 e 0,25 mm. Através do acúmulo de fluido na cavidade antral e proliferação das células da granulosa e da teca interna (TIC), o folículo progride através dos estágios subsequentes de desenvolvimento até atingir um tamanho de 2 mm (figura 1). O tempo necessário para que um folículo cresça da fase pré-antral até um tamanho de 2 mm é de cerca de 70 dias (GOUGEON, 1998).

A competência dos oócitos é progressivamente adquirida na sequência de uma série coordenada de mudanças funcionais no gameta e nas células do cumulus. No entanto, não é até os últimos dias de desenvolvimento folicular que os oócitos adquirem a capacidade de passar pela progressão meiótica para a metáfase II. A redistribuição dos grânulos corticais e mudanças no número de mitocôndrias, na sua atividade e distribuição ocorrem durante os estágios finais de maturação oocitária. A maturação citoplasmática e nuclear do oócito é caracterizada ainda por uma cascata de eventos moleculares e pontos de verificação que incluem alterações na transcrição e tradução do RNA, replicação e reparo do DNA, condensação cromossômica, formação de fusos e desenvolvimento dos mecanismos para a penetração da cabeça do espermatozoide. A maturação dos oócitos é desencadeada pelo surto pré-ovulatório de gonadotrofinas e, particularmente, por níveis elevados de LH. A cascata folicular originada pelo pico de LH resulta em uma mudança na produção de esteroides das células da granulosa da predominância do estrogênio para um ambiente progestogênico e na diminuição da concentração intracelular de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) no oócito, que é induzida pelo menos em parte pela perda de contatos juncionais entre as células do cumulus e o oócito. A ativação das vias moleculares que levam à produção de ácido hialurônico pelas células do cumulus ocorre em resposta ao aumento de LH, que leva à mucificação e expansão do cumulus. A perda de contatos juncionais entre o oócito e as células somáticas, por sua vez, desencadeia a retomada da meiose nos oócitos maduros, pois reduz ainda

mais as concentrações de AMPc, leva à inativação da proteína quinase A dependente de AMPc e reduz o efeito inibitório da influência das purinas na manutenção da parada da meiose (PICTON et al., 2008). A ovulação ocorre, em média, dentro de 24 h do pico de LH. As concentrações séricas de progesterona começam a subir após o pico pré-ovulatório de estradiol, mas antes do pico de LH, e indicam o início da luteinização folicular (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2012).

## **2.Tratamento do câncer e danos às Gonadas**

A alta prevalência do câncer e o aumento significativo da sobrevivência em longo prazo geraram interesse mundial quanto à preservação da fertilidade em mulheres jovens expostas a quimioterapia e radioterapia. Nas últimas duas décadas, as taxas de sobrevivência a muitos tumores malignos que afetam as mulheres aumentou significativamente. Para muitos desses tumores, as taxas de sobrevivência excedem 80-90% (BLUMENFELD, 2012).

O câncer afeta uma em cada 800 crianças e os dados sugerem que em torno de 80% desses pacientes estarão vivos 5 anos após o diagnóstico e que 70% serão sobreviventes a longo prazo. Com o aumento no número de sobreviventes em longo prazo, a função gonadal e a fertilidade se tornaram importantes preocupações para esses jovens (ANDERSON et al., 2015). Ainda, em relação a mulheres em idade reprodutiva, existem estimativas de que, nos países ocidentais, uma em cada 49 mulheres com idade abaixo do 40 anos irão desenvolver câncer. Nesse sentido, os efeitos a longo prazo do tratamento do câncer são de grande interesse para os endocrinologistas, hematologistas, oncologistas, ginecologistas, reumatologistas e clínicos gerais, e a proteção contra os efeitos iatrogênicos da quimioterapia assume alta prioridade.

Sabe-se que o tratamento para o câncer pode afetar as funções endócrina e reprodutiva. Conseqüentemente, a perda da fertilidade é uma grande preocupação para as pacientes. Durante as últimas cinco décadas, grandes avanços no tratamento do câncer resultaram em um aumento substancial no número de pacientes jovens curados. Atualmente pacientes com câncer de mama, por exemplo, podem ter uma sobrevivência longa. No entanto, a qualidade de vida pode ser diminuída por efeitos como menopausa precoce, infertilidade, efeitos psicossociais negativos e pelo risco de recorrência (HOWARD-ANDERSON et al., 2012).

Os dados atuais sugerem que a gestação pós-tratamento não aumenta o risco de progressão do câncer para a maioria dos tumores. A ênfase então mudou da preservação da vida para a preservação da qualidade de vida. Atualmente, os serviços de preservação da fertilidade são raramente oferecidos ou até mesmo discutidos com o paciente antes do início da terapia para o câncer. Porém, estudos demonstram que os pacientes que receberam informações sobre sua saúde sexual e reprodutiva apresentam menores níveis de estresse psicológico que pacientes que não receberam essa informação (MAHAJAN, 2015).

Não há evidências de um efeito direto do câncer no sistema reprodutivo feminino. Exceto para os tipos de câncer que afetam diretamente esse sistema. Entretanto, seu tratamento pode ter vários efeitos adversos no trato reprodutivo. A exposição à quimioterapia ou à radioterapia diminui marcadamente o número de folículos presentes no ovário (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011). A destruição dos folículos pode causar falência ovariana prematura ou menopausa precoce. O tratamento com agentes alquilantes como a ciclofosfamida durante a adolescência aumenta em 9 vezes o risco de falência ovariana prematura. A Sociedade Americana de Oncologia Clínica afirma que a cisplatina é um exemplo de droga anticâncer com toxicidade gonadal. Entretanto, apesar de sua alta toxicidade gonadal, a cisplatina é frequentemente utilizada para tratar cânceres em adolescentes e mulheres em idade reprodutiva, especialmente nos tratamentos de cânceres das linhagens germinativas, câncer de mama, câncer cervical localmente avançado e outros tumores malignos (TANAKA et al., 2018). As drogas com toxicidade ovariana promovem a redução do número de folículos primordiais. Sugere-se que os tratamentos gonadotóxicos induzem um ciclo vicioso patofisiológico de destruição folicular. Ou seja, a depleção dos folículos reduz a secreção de estradiol e inibina, que causa um aumento nas concentrações séricas de hormônio folículo-estimulante (Follicle stimulating hormone - FSH), que pode levar ao recrutamento de outros folículos, que também são destruídos pela quimioterapia (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011).

A falência ovariana prematura pós-quimioterapia ocorre com maior frequência nas pacientes com idade mais avançada. Entretanto, modelos matemáticos sugerem que a exposição a tratamento gonadotóxico em pacientes mais jovens leva à perda de um número maior de folículos. Portanto, mulheres mais jovens tratadas para o câncer perdem mais anos de função ovariana normal. Por outro lado, as pacientes

com idade mais avançada têm uma menor reserva ovariana e um maior risco de desenvolverem falência ovariana durante ou após a quimioterapia. Apesar das mulheres mais jovens terem uma maior perda de folículos, elas têm maior probabilidade de manter ou recuperar a função menstrual (DIEDRICH; FAUSER; DEVROEY, 2011).

### **3. Opções atualmente disponíveis para preservar a fertilidade**

Diferentes opções para a preservação da fertilidade são propostas para as pacientes com câncer. A criopreservação de embriões é um procedimento bem estabelecido para preservar a fertilidade de mulheres em idade reprodutiva. Outra alternativa para esse grupo é a criopreservação de oócitos maduros. Por outro lado, a criopreservação de tecido ovariano é a única forma possível de preservação da fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam iniciar imediatamente o tratamento para o câncer (LUYCKX et al., 2014). Até o momento, foram publicados na literatura mais de 86 nascimentos após o autotransplante de tecido ovariano criopreservado (JENSEN et al., 2017). No entanto, o transplante de tecido ovariano criopreservado não pode ser realizado quando há um risco de reimplantação de células malignas, como no caso das pacientes com leucemia. Portanto, novas opções devem ser desenvolvidas para as situações em que o transplante não é recomendável (LUYCKX et al., 2014).

A fertilização *in vitro* e a criopreservação de embriões, único método que não é experimental e que está clinicamente estabelecido, necessita de uma prorrogação da quimioterapia por pelo menos 2 semanas e frequentemente não se aplica a mulheres jovens solteiras. Nas duas últimas décadas, a criopreservação de oócitos ganhou popularidade e aumentou o seu sucesso devido ao método de vitrificação. No entanto, esse método não garante a fertilidade futura.

#### 4. Células tronco, células-tronco Oogoniais e a terapia celular

As células-tronco são definidas como células capazes de extensa auto-renovação e de originar ao menos um tipo de descendentes altamente diferenciadas. Vários tecidos pós-natais têm reservatórios de células-tronco específicas que contribuem para a sua manutenção e regeneração (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Desde a identificação das células-tronco de fontes humanas como embriões, fetos, órgãos e tecidos adultos, suas possíveis aplicações terapêuticas têm sido exploradas (SIMÓN, 2012). O dogma de que os mamíferos humanos nascem com todos os oócitos pré-formados tem as suas origens em um trabalho de Solomon Zuckerman, publicado em 1951, que não encontrou nenhuma evidência experimental disponível naquela época que fosse inconsistente com a hipótese de que a produção de células germinativas nas fêmeas mamíferas termina antes do nascimento. Este artigo afetou profundamente a interpretação das observações clínicas e experimentais relacionadas ao desenvolvimento ovariano e à sua função pelos 50 anos subsequentes (revisado por DUNLOP; TELFER; ANDERSON, 2013).

Em 2004 o grupo de Jonathan Tilly reiniciou este debate quando reportou a presença de uma população de células da linhagem germinativa mitoticamente ativas (Germinative Stem Cells - GSCs) no ovário de camundongos fêmeas. Os autores postularam que estas células mantêm a produção de oócitos e folículos após o nascimento (JOHNSON et al., 2004). A descoberta das GSCs, ou células-tronco da linhagem das oogônias (oogonial stem cells - OSCs), como são mais conhecidas atualmente, gerou grande debate na última década. É impossível provar a ausência de algum tipo de célula em um tecido, mas o debate não pode ser resolvido até que a presença e o funcionamento das OSCs em ovários adultos possa ser inequivocadamente demonstrada. Independentemente da relevância fisiológica destas células, o que é inegável é a possibilidade de aplicações clínicas das OSCs na infertilidade e na preservação da fertilidade (DUNLOP; TELFER; ANDERSON, 2013).

Nosso grupo de pesquisa estudou o isolamento de células germinativas testiculares bem como o seu transplante para modelo animal de infertilidade por quimioterapia, obtendo sucesso na regeneração tecidual, inclusive com restabelecimento da espermatogênese pós-transplante (HORN et al., 2008). Quanto às OSCs, Zou et al. (2009) estabeleceram uma linhagem de OSCs de camundongos



fêmeas na fase neonatal. Esta linhagem foi isolada por técnica imunomagnética, apresentou cariótipo normal, alta atividade da telomerase e foi mantida em cultura por mais de 15 meses. Este mesmo grupo também isolou OSCs de fêmeas adultas, as quais foram mantidas em cultura por mais de seis meses. Estas OSCs transduzidas com o gene codificante da proteína verde fluorescente (green fluorescent protein - GFP) foram transplantadas para ovários de fêmeas inférteis. As células transplantadas passaram pela oogênese e as camundongas fêmeas receptoras foram capazes de produzir filhotes que também possuíam o transgene GFP (ZOU et al., 2009). Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, foram isoladas OSCs e células-tronco da linhagem adipogênica (ADSCs) de camundongas fêmeas GFP positivas. Estas células, marcadas, foram injetadas nos ovários de fêmeas receptoras esterilizadas por quimioterapia e, como resultado, os animais dos grupos ADSC e OSC apresentaram uma melhora histológica significativa em comparação ao grupo controle. Houve também uma maior incidência de células foliculares viáveis (71%) no grupo OSC e no grupo ADSC (43%) comparados ao controle. Além disso, observou-se uma tendência a melhor recuperação no grupo OSC comparado aos outros grupos 14 dias após o transplante (TERRACIANO, 2013).

O isolamento de OSCs foi feito por um pequeno número de outros grupos até o momento (HU et al., 2012; PACCHIAROTTI et al., 2010; SIMÓN, 2012). Muitas críticas foram feitas às técnicas experimentais utilizadas e à interpretação dos resultados dos experimentos com OSCs (BYSKOV et al., 2005; NOTARIANNI, 2011). Alguns críticos são céticos quanto ao uso de Ddx4/DDX4 como um marcador de superfície celular para separação das células OSCs por ele ter uma localização intracitoplasmática nos oócitos (CASTRILLON et al., 2000). No entanto, foi proposto que o Ddx4/DDX4 tem um domínio transmembrana nas OSCs antes de se tornar intracelular nos oócitos maduros, apesar de ainda não existirem evidências experimentais para isto (WHITE et al., 2012). O argumento para a existência das OSCs foi fortalecido por trabalhos posteriores relatando o isolamento de OSCs em camundongas utilizando marcadores alternativos como VASA e Fragilis (PACCHIAROTTI et al., 2010; ZOU et al., 2011).

Questiona-se por que estas células levaram tanto tempo para serem descobertas (DUNLOP; TELFER; ANDERSON, 2013). Contudo, as evidências indicam que são células extremamente raras. White et al. (2012), relataram que as OSCs constituem somente 0,014% de todas as células dos ovários de camundongas

fêmeas. HAYASHI descreve que a quantidade das OSCs varia em relação a idade dos animais: passando de 1 a 2% das células dos ovários de camundongas em período neonatal para 0,05% em animais mais velhos (HAYASHI et al., 2012). Também há preocupações quanto ao tempo que leva para essas células se estabelecerem em cultura (10–12 semanas para camundongos e 4–8 semanas para humanos) e a possibilidade de haver transformações *in vitro*. No entanto, foram obtidos filhotes provenientes do cultivo e consequente transplante de OSCs em camundongas e também foram geradas estruturas semelhantes a folículos primários em tecido humano (DUNLOP; TELFER; ANDERSON, 2013). Apesar destas controvérsias, a descoberta das OSCs oferece novas estratégias potenciais para aplicação clínica.

## JUSTIFICATIVA

A alta prevalência do câncer e o aumento significativo da sobrevivência em longo prazo geram interesse mundial quanto à preservação da fertilidade em mulheres jovens expostas a quimioterapia. Muitos quimioterápicos apresentam elevada toxicidade gonadal, entretanto, apesar desse efeito, são frequentemente utilizados para tratar cânceres em adolescentes e mulheres em idade reprodutiva. A aplicação se dá especialmente para tratamento de cânceres das linhagens germinativas, câncer de mama, câncer cervical localmente avançado e outros tumores malignos (TANAKA et al., 2018).

Os métodos não experimentais atualmente disponíveis para preservar a fertilidade nessas pacientes são a fertilização *in vitro* e a criopreservação de embriões, entretanto necessitam de uma prorrogação do tratamento quimioterápico em, pelo menos 2 semanas, e frequentemente não se aplicam, a mulheres jovens e solteiras. Nas últimas décadas, a criopreservação de oócitos ganhou popularidade, e técnicas como a vitrificação foram padronizadas, o que aumentou o sucesso no congelamento desse gameta. No entanto, não existem garantias de fertilidade futura a partir desse procedimento. Por outro lado, a criopreservação de tecido ovariano, tem sido muito estudada e consiste na única forma (até o momento) disponível de preservação da fertilidade em pacientes pré-púberes e em mulheres que necessitam iniciar imediatamente o tratamento para o câncer (LUYCKX et al., 2014).

Por todo o exposto, este trabalho se justifica por buscar isolar e caracterizar as células-tronco germinativas (OSCs) de camundongas e testar a terapia com esse tipo de células-tronco para recuperação da fertilidade pós-quimioterapia. Acreditamos que a compreensão acerca da biologia deste tipo celular poderá contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas que possam ser aplicadas para o tratamento e a prevenção da infertilidade feminina.

## HIPÓTESES

**Hipótese nula:** As OSCs de camundongos fêmeas doadoras GFPs não serão capazes de recuperar a fertilidade pós-quimioterapia.

**Hipótese alternativa:** As OSCs de camundongos fêmeas doadoras GFPs serão capazes de recuperar a fertilidade pós-quimioterapia.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Principal**

Avaliar a terapia com células-tronco da linhagem das oogônias (OSCs) em camundongos fêmeas quanto à capacidade de recuperação da fertilidade pós-quimioterapia com cisplatina.

### **Objetivos Específico**

- Isolar as OSCs de ovários de camundongas C57BL/6 transgênicas para a proteína verde fluorescente (green fluorescent protein - GFP);
- Transplantar as OSCs para as camundongas selvagens tratadas com quimioterápicos;
- Avaliar o ciclo estral antes e após a quimioterapia para constatar a indução de infertilidade;
- Avaliar a capacidade de geração de prole nas camundongas receptoras;
- Avaliar a histologia dos ovários das receptoras em comparação com o grupo controle para verificação de possível recuperação da estrutura ovariana e do número de folículos.
- Avaliar a presença de células GFP-positivas na prole das fêmeas tratadas.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. A. et al. Endocrine late-effects of cancer treatment 2  
Cancer treatment and gonadal function : experimental and established strategies  
for fertility preservation in children and young adults. **THE LANCET Diabetes &  
Endocrinology**, v. 8587, n. 15, p. 1–12, 2015.

AUERSPERG N, Wong AS, Choi KC et al. Ovarian surface epithelium:  
biology, endocrinology, and pathology. **Endocr Rev** 22: 255–288, apr. 2001.

BHARTIYA D, Sriraman K, Parte S et al. Ovarian stem cells: absence of  
evidence is not evidence of absence. **J Ovarian Res** 6:65, Sep. 2013.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Ovarian antral  
folliculogenesis during the human menstrual cycle: A review. **Human  
Reproduction Update**, v. 18, n. 1, p. 73–91, 2012.

BLUMENFELD, Z. Chemotherapy and fertility. **Best practice & research.  
Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 26, n. 3, p. 379–90, jun. 2012.

BYSKOV, A. G. et al. Eggs forever? Differentiation; **Research in  
Biological Diversity**, v. 73, n. 9-10, p. 438–46, dez. 2005.

BUKOVSKY A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived  
from adult human ovaries. **Reprod Biol Endocrinol** 3:17–30, may. 2005.

CASTRILLON, D. H. et al. The human VASA gene is specifically  
expressed in the germ cell lineage. **Proceedings of the National Academy of  
Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9585–90, 15 ago.  
2000.

DASARI, S.; BERNARD, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, oct. 2014.

DIEDRICH, K.; FAUSER, B. C. J. M.; DEVROEY, P. Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 22, n. 3, p. 232–48, mar. 2011.

DUNLOP, C. E.; TELFER, E. E.; ANDERSON, R. A. Ovarian stem cells-potential roles in infertility treatment and fertility preservation. **Maturitas**, v. 76, n. 3, p. 279–83, nov. 2013.

GOUGEON, A. Ovarian follicular growth in humans: Ovarian ageing and population of growing follicles. **Maturitas**, v. 30, n. 2, p. 137–142, oct. 1998.

GREENFELD C, Flaws JA. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. **Bioessays**, 26:829–832, aug. 2004 .

HAYASHI, K. et al. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6109, p. 971–5, 16 nov. 2012.

HORN, M. M. et al. Germinative testicular cells and bone marrow mononuclear cells transplanted to a rat model of testicular degeneration. **Cloning and stem cells**, v. 10, n. 4, p. 543–6, dez. 2008.

HOWARD-ANDERSON, J. et al. Quality of life, fertility concerns, and behavioral health outcomes in younger breast cancer survivors: a systematic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 5, p. 386–405, 7 mar. 2012.

HU, Y. et al. GSK3 inhibitor-BIO regulates proliferation of female germline stem cells from the postnatal mouse ovary. **Cell proliferation**, v. 45, n. 4, p. 287–98, ago. 2012.

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, p. 325–336, mar. 2017.

JOHNSON, J. et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 145–50, 11 mar. 2004.

LUYCKX, V. et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 1149–1156, apr. 2014.

MAHAJAN, N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 8, n. 1, p. 3–12, jan-mar. 2015.

MEIRELLES, L. DA S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–13, 1 jun. 2006.

PACCHIAROTTI, J. et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. Differentiation; **Research in biological Diversity**, v. 79, n. 3, p. 159–70, mar. 2010.



PARTE S, Bhartiya D, Patel H et al. Dynamics associated with spontaneous differentiation of ovarian stem cells in vitro. **J Ovarian Res** 7:25, fev. 2014.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703–715, dec. 2008.

SALAMANCA CM, Maines-Bandiera SL, Leung PC et al. Effects of epidermal growth factor/hydrocortisone on the growth and differentiation of human ovarian surface epithelium. **J Soc Gynecol Investig** 11:241–251, may. 2004.

SAWHNEY, P. et al. Cisplatin-Induced Long-term Failure of Spermatogenesis in Adult C57/Bl/6J Mice. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 136-145, jan.-fev. 2005.

SIMÓN, C. Somatic stem cells and tissue engineering shed light on unsolved clinical issues in reproductive medicine: in stem cells we trust. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 1, p. 1–2, jul. 2012.

Tanaka Y, Kimura F, Zheng L, Kaku S, Takebayashi A, Kasahara K, Tsuji S, Murakami T Protective effect of a mechanistic target of rapamycin inhibitor on an in vivo model of cisplatin-induced ovarian gonadotoxicity. **Exp Anim**, 1;67(4):493-500, nov. 2018.

TERRACIANO P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cells Int**, p.8, dez. 2014

VIRANT-KLUN I, Stimpfel M, Skutella T. Stem cells in adult human ovaries: from female fertility to ovarian cancer. **Curr Pharm Des**, 18:283–292, 2012.

WHITE, Y. A R. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells

purified from ovaries of reproductive-age women. **Nature medicine**, v. 18, n. 3, p. 413–21, mar. 2012.

WOODS DC, Tilly JL. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. **Nat Protoc** 20:966–988, may. 2013.

WOODS DC, Tilly JL. An evolutionary perspective on adult female germline stem cell function from flies to humans. **Semin Reprod Med** 31:24–32, jan. 2013.

ZHANG Y, Yang Z, Yang Y, Wang S, Shi L, Xie W, Sun K, Zou K, Wang L, Xiong J, Xiang J, Wu J. Production of transgenic mice by random recombination of targeted genes in female germline stem cells. **J. Mol. Cell Biol**; 3:132–141, apr. 2011.

ZOU, K. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nature cell biology**, v. 11, n. 5, p. 631–6, may 2009.

ZOU, K. et al. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. **Stem cells and development**, v. 20, n. 12, p. 2197–204, dez. 2011.

**ARTIGO EM INGLÊS**

O artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Stem Cells Research & Therapy, que possui fator de impacto 4.22 avaliado em 2015 e foi avaliada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com o nível qualis A1 na área Medicina III em 2016.

OVARIAN STEM CELLS PROMOTES FERTILITY RESCUE ON AN IN VIVO MODEL OF CISPLATIN-INDUCED OVARIAN GONADOTOXICITY

Isabel Cirne Lima de Oliveira Durli<sup>1,2</sup>, Laura Silveira Ayres<sup>1</sup>, Paula Barros Terraciano<sup>1,2</sup>, Cristiana Palma Kuhl<sup>1</sup>, Tuane Nerissa Alves Garcez<sup>2</sup>, Markus Berger Oliveira<sup>1,2</sup>, Elizabeth Obino Cirne-Lima<sup>1,2,3</sup>, Ana Helena da Rosa Paz<sup>2,3</sup> and Eduardo Pandolfi Passos<sup>1,2,3</sup>

PPGGO/UFRGS, 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Correspondence should be addressed to Isabel Cirne Lima de Oliveira Durli; idurli@hcpa.edu.br

Abstract

**BACKGROUND:** Chemotherapy patients have adverse effects on the structure and function of the ovary leading to infertility. Recent studies have challenged the dogma that women are born with a finite number of oocytes without the capacity for renewal. Reports demonstrates formation of new oocytes from newly discovered germline stem cells, referred to as oogonial stem cells (OSCs). This study was conducted to further clarify the impact of a cell suspension enriched in OSCs on female reproductive function in an in vivo model of cisplatin-induced ovarian gonadotoxicity

**METHODS:** Female mice received three cycles of 5 days 2.5 mg/kg cisplatin intraperitoneal applications followed by seven-days recovery. Infertile mice received GFP positive OSCs *in loco* into the ovary. Ten days after cell transplantation females were placed with males for 7 days in order to evaluate the possibility of progenies generation. Pups were evaluated for GFP expression and after F2 progeny generation females were killed and ovaries were processed for histology and follicle counting .

**RESULTS:** Histological examinations shown OSCs were able to increase the number of primary, secondary and total follicles. OSCs treated animals achieved up to

two consecutive pregnancies in contrast none of the animals in the control group demonstrated ovarian function and none achieved a pregnancy. Pups from the treated group presented GFP positive cells in epithelial, muscle, and nervous tissue indicating the contribution of transplanted GFP positive OSCs to the chimera formation.

**CONCLUSION:** Intraovarian injection of OSCs into mice with cisplatin-induced ovarian failure diminished the histological damage and rescue fertility.

## **Introduction**

Chemotherapy and radiotherapy in patients with cancer have adverse effects on the structure and function of the ovary leading to infertility in immature girls and young women with cancer [1]. Cancer treatment can affect reproductive functions. Therefore, the loss of fertility is a major concern for patients. Over the last five decades, major advances in cancer treatment have resulted in a substantial increase in the number of young patients cured. With the increase in the number of long-term survivors, gonadal function and fertility have become important concerns for these people [2]. Different options for fertility preservation are available for cancer patients. Cryopreservation of embryos is a well-established procedure and mature oocytes cryopreservation is also an alternative to preserve the fertility of women at reproductive age. On the other hand, ovarian tissue cryopreservation is the only possible way of preserving fertility in prepubertal patients and in women who need to start cancer treatment immediately [3].

Stem cells are defined as cells capable of extensive self-renewal and originate at least one type of highly differentiated offspring. Several postnatal tissues have specific stem-cell reservoirs that contribute to its maintenance and regeneration[4]. Since the identification of stem cells from human sources such as embryos, fetuses, organs and adult tissues, their possible therapeutic applications have been explored [5]. The dogma that human mammals are born with all preformed oocytes has its origins in a work by Solomon Zuckerman, published in 1951, that found no experimental evidence available at that time that was inconsistent with the hypothesis that the production of germinative cells in mammalian females terminates before birth. This article has profoundly affected the interpretation of clinical and

experimental observations related to ovarian development and its function for the subsequent 50 years [6].

In 2004 Jonathan Tilly's[7] group restarted this debate when it reported the presence of a population of mitotically active germline cells (Oogonial Stem Cells OSCs) in the ovary of mice. The discovery of GSCs (germline stem cells), or oogonial stem cells (OSCs), as they are more commonly known today, has generated much debate in the last decade. This study was conducted to further clarify the impact of a cell suspension enriched in OSCs on female reproductive function after chemotherapy using in an in vivo model of cisplatin-induced ovarian gonadotoxicity

## **Materials and Methods**

This work was carried out in the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). C57BL/6 adult female mice with eight weeks of age, wild and transgenic for green fluorescent protein (GFP) were bred and maintained in the Animal Experimental Unit-HCPA. The mice were kept under controlled conditions of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity ( $55\% \pm 5\%$ ) with photoperiod of 12/12 hours and allowed free access to food and water. In vivo procedures were carried out in accordance with current legislation in Brazil, Law 11.794 (08/10/2008), which establishes procedures for the scientific use of animals and regulates the registration of experimental centers. All procedures were based on the Brazilian guideline for the care and use of animals for scientific and educational purposes - DBCA (RN 30/2016). This work was approved by the Institutional Review Board and is registered under the protocol number 14-0332.

### **Cisplatin Infertility Model**

For infertility induction with cisplatin, the treatment group (n=9) and control group (n=9) received a modification of the protocol described by Sawhney et al. [8], which consists of three cycles of five consecutive intraperitoneal daily applications of 2.5 mg/kg cisplatin in a final volume of approximately 0.05 mL, followed by a seven-day recovery. This protocol induces a subchronic exposure to cisplatin that mimics chemotherapy treatment regimens in the clinic [8,9]. The experiment infographic is

presented in figure 1. Animals were weighted on days D0 and D39 of the experimental protocol.

### **Estral Cycle Detection**

Vaginal cytology evaluation was performed for five days (estral cycle period) before the start of chemotherapy protocol and for five days after the last day of chemotherapy treatment. Vaginal cytology analysis was performed according to CESCHIN et al. (2004) [10]. Vaginal smears were performed in the first hours of the clear cycle and a blind evaluator perform the analysis. The vaginal suspensions were collected with 0.1 mL 0.9% saline. The slides were analyzed immediately after washing without any processing.

### **Pool processing containing OSCs**

As described by Parte et al, 2015,[11] Six Ovaries of transgenic GFP C57/bl6 mice were excised aseptically and individually placed in 0.5 ml of DMEM-HG media (BioSource, Rockville, MD) with 0.5 mg/mL of Collagenase Type IV. After 30 min incubation in water bath at 37°C, each ovary was vortexed for 2 min, ovaries were removed, and the suspension was vortexed again for 2 min to disaggregate cell clusters. The suspension was diluted with additional DMEM-HG containing 15% fetal calf serum. Cell suspension were centrifuged 2.000 rpm for 5 min and resuspended in saline and quantified using a Neubauer's chamber.

### **Cell Therapy for Fertility Recovery**

For cell therapy, females with ovarian failure received 5  $\mu$ L of  $36 \times 10^4$  cell suspension containing OSCs in physiological solution. Cells were injected *in loco* into the ovaries through intra-ovarian microinjection with 30G gingival needle. The control group received the same surgical intervention and and 5  $\mu$ L of physiological solution (cell vehicle).

Surgical access to the recipient ovary was dorsal and the females received inhaled anesthesia with 5% isoflurane for induction and 3% for maintenance. Tramadol at 10 mg / kg intraperitoneally was used as pre-surgical analgesic support and as a postoperative protocol every 12 hours for 2 days. Ten days after cell transplantation females were placed with males for 7 days in order to evaluate the possibility of progenies generation.

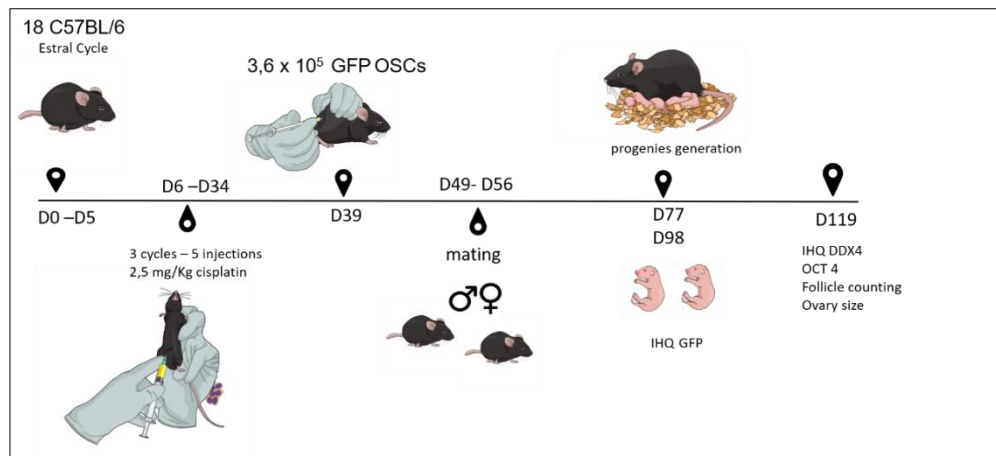


Figure 1. Experiment Infographic.

### DDX4 Cytometry and immunocytochemistry

In order to evaluate the DDX4 expression a pool of 6 ovaries were processed following the protocol described earlier. Six ovaries were digested, blocked and incubated with 1:50 rabbit DDX4 antibody (ab13840; Abcam) then washed and incubated with 1:50 Alexa Fluor 647R goat anti-rabbit IgG (A20991; Invitrogen, UK).

Cell suspension were analyzed using a Atunne (Beckton Dickinson, UK) cytometer, after gating the negative controls. Data were analysed using the FLOWJO software (FLOWJO LLC, USA). Also a sample of the cell suspension were seeded in tissue slides coated with 2ug/ml fibronectin fixed with cold 100% methanol (chilled at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) at room temperature for 5 min. Then cells were washed and incubated with 1:50 Alexa Fluor 647R goat anti-rabbit IgG (A20991; Invitrogen, UK) in humidified chamber for overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then washed and incubated for for 1 h at room temperature in the dark with 1:50 Alexa Fluor 647R goat anti-rabbit IgG (A20991; Invitrogen, UK). After the final washing slices were prepared with 20ul of ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (P36931; Invitrogen, UK).



### **Histological analysis**

One ovary from each animal of the treatment and control groups was fixed in 10% formalin (4° C overnight), dehydrated in ethanol, clarified in xylene and paraffin embedded. Histological sections of 6 µm of the ovary were obtained and stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed by optical microscopy (Nikon Eclipse TE2000-U) for ovarian follicles count. Ovarian follicles were counted in each section. The viable follicles were classified into four types according to classification of McGee et al. (2000) [12]: a) primordial – containing an oocyte surrounded by a single layer of flattened cells, b) primary – characterized by a single layer of cuboidal pregranulosa cells, c) secondary – containing 2–5 complete layers of granulosa cells, d) tertiary – containing multiple layers of granulosa cells with some small antrum or Graafian – with the cavity occupying most of the total follicular volume. The follicles were considered atretic when demonstrated apoptosis signals in the oocyte and/or granulosa and thecal cells, changes in follicular shape (triangular shape) and presence of cells in follicular fluid. Each follicle was counted once, and the total number of each follicle types was registered. All tissue samples were evaluated by a single histologist who was blinded to the groups.

### **Immunohistochemical analysis**

The ovarian specimens fixed in 10% buffered formalin, processed and included in paraffin, were submitted to histological cutting in a microtome set at 4 µm thickness. The sections were placed on previously silanized slides. In order to proceed with the immunohistochemical technique, the slides were heated in an incubator at 80° C for 30 minutes, dewaxed in xylol, rehydrated in ethyl alcohol and then in distilled water. Antigenic recovery was performed in a water bath for 20 minutes at 95° C in pH 6.0 citrate buffer and cooled for 10 min in the same buffer. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide solution in methanol for 20 minutes. Protein blocking was performed with powdered skim milk diluted to 5% in PBS for 20 minutes. The sections were then incubated overnight in a refrigerator at 2-8° C with Anti-DDX4/MVH antibody (ab13840, abcam) at a 1:1000 dilution. After incubation, goat anti-rabbit secondary antibody (AP132P, Millipore) was applied at a 1:200 dilution and incubated for 1 h and 30 minutes at room temperature. The visualization of the reaction

was obtained with liquid 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Dako, K3468), according to the manufacturer's recommendations. After visualization, the slides were counterstained in Harris hematoxylin for 10 seconds and differentiated in 2% ammoniacal water for 30 seconds. The slices were dehydrated in absolute alcohol and placed in xylol for the assembly of the slides in Entellan type resin.

For analyzing the fetus, the same protocol was used for the ovaries but the primary antibody was GFP (FL) Rabbit Polyclonal IgG (A0412, Santa Cruz Biotechnology) at a 1:300 dilution.

### **Statistical analysis**

The differences between body weights were analyzed with T Test. Ovarian follicles count and DDX4, OCT4 percentages of staining areas were evaluated with Mann-Whitney U test for independent samples. The tests were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Cisplatin promoted Estral Cycle alterations**

Regarding vaginal cytology, during the five days period before the beginning of treatment, both groups presented smears with estrogenic influence phases, which was already expected and is an indication that the mice were fertile. In the five days period after the end of cisplatin protocol, all mice remained in diestrus phase, indicating that the mice were infertile. As for vaginal cytology, smears in estrus, proestrus and metaestrus indirectly indicate estrogen hormonal influence, whereas smears in diestrus determine the absence of hormonal influence [10]. As expected animals presented a significant weight loss ( $17.89 \pm 0.31$  versus  $15.92 \pm 0.27$ ) after cisplatin induced infertility protocol as demonstrated in figure 2 .

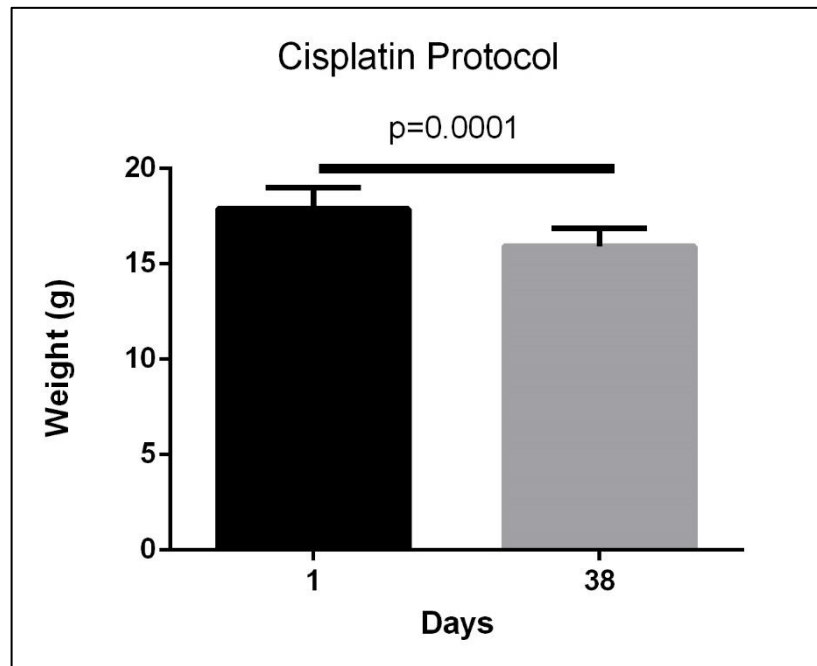


Figure 2- Weight loss after cisplatin protocol

#### **OSCs were positive for DDX4**

A pool of 6 ovaries was processed for OSCs isolation and the cell suspension was analyzed by flow cytometry and immunocytochemistry for DDX4 expression. Immunocytochemistry demonstrated the cytoplasmatic expression of DDX4 (Figure 3 A, B and C). The cell suspension was 0.971% positive for DDX4. Immunocytochemistry demonstrated the cytoplasmatic expression of DDX4 (Figure 3 D and E).

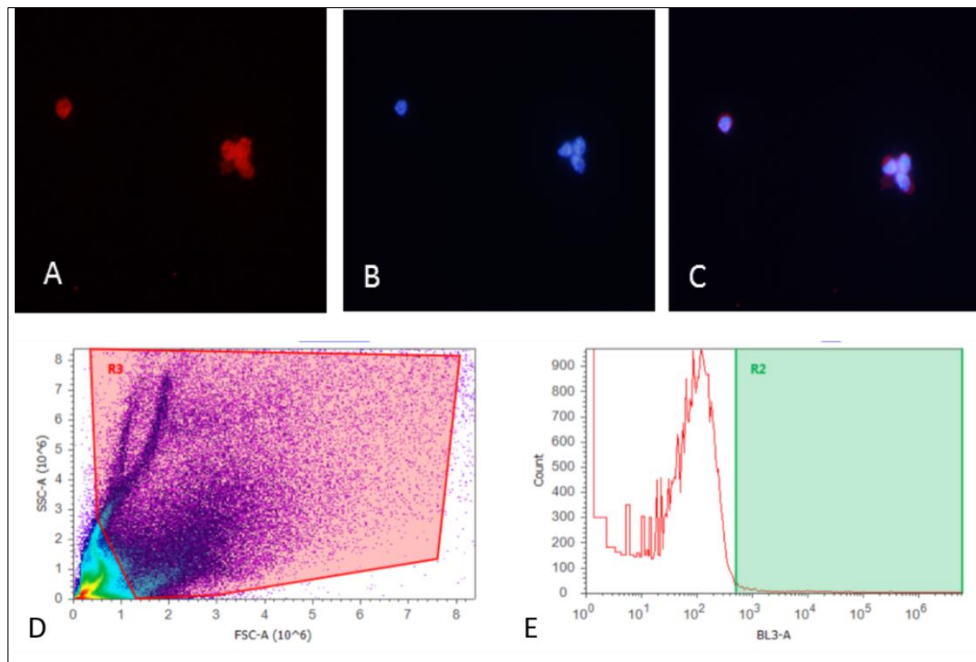


Figure 3: A) Cytoplasmatic expression of DDX4 (Alexa Fluor 647R); B) Cell nuclei stained with DAPI; C) Merge in 20x magnification; D) Flow cytometry analysis of total cell suspension granularity versus cell size; and E) Histogram demonstrating the number of DDX4 positive cells on R2 gate.

### OSCs transplantation rescues ovarian follicles

Ovarian histology demonstrated clear differences between OSCs treated group when compared to control group as shown in figure 4.

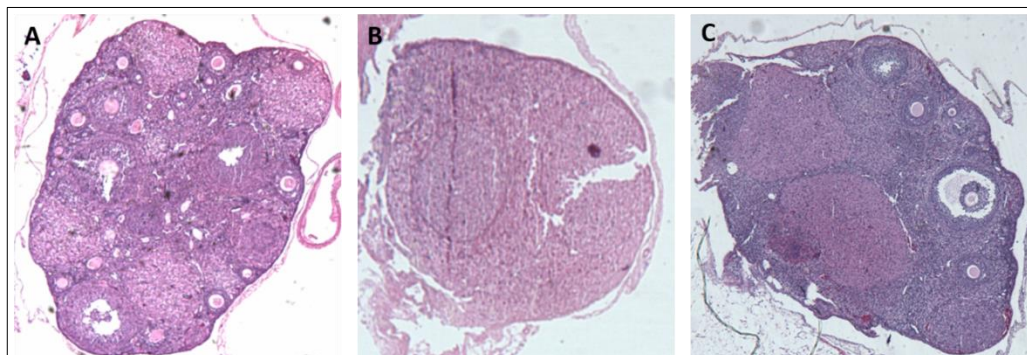


Figure 4. Histology sections of ovaries from: A) Healthy females; B) Control group (submitted to cisplatin protocol) and C) Treated group (cisplatin + OSCs cell transplantation). 4X magnification.

Regarding the ovarian follicles count, there was statistical difference between the control and treated groups in primary follicles ( $p=0,0005$ ), secondary follicles ( $p=0,0023$ ) and total viable follicles counts ( $p=0,0065$ ) as demonstrated in figure 5.

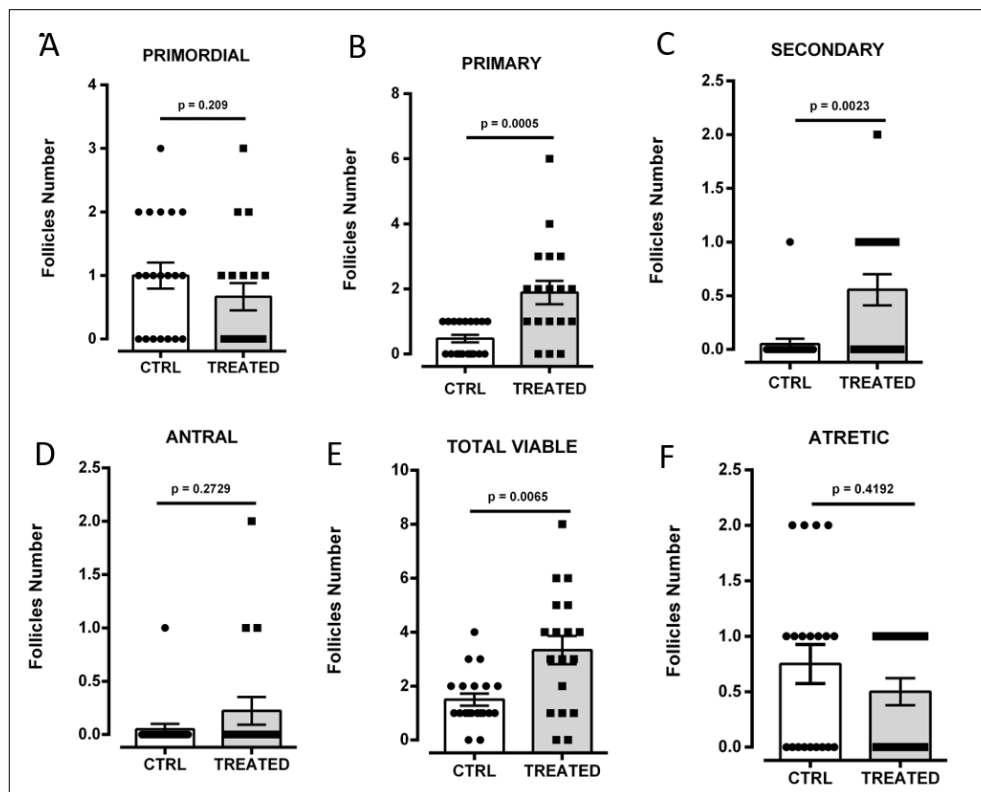


Figure 5 – Follicles Counting: A) Primordial follicles; B) Primary Follicles; C) Secondary Follicles; D) Antral Follicles; E) Total Viable and E) Atretic. N=9 -Mann-Whitney U test.

### Cell therapy allowed progeny generation with GFP positive cells

After, the mating period the next generation of mice, were evaluated and considered as F1. Animals from control group presented no offspring on F1 or F2. Interestingly 2 animals from the treated group presented progeny on F1 and 5 animals in F2 (the same 2 that had F1 and additional 3 females) totaling 10 pups. In other words, OSCs treated animals achieved up to two consecutive pregnancies in contrast none of the animals in the control group who received the standard chemotherapy dose demonstrated ovarian function and none achieved a pregnancy.

In all pups from the OSCs were analyzed by IHC for GFP expression and we observed the presence of GFP positive cells in epithelial, muscle, and nervous tissue as shown in figure 6 .

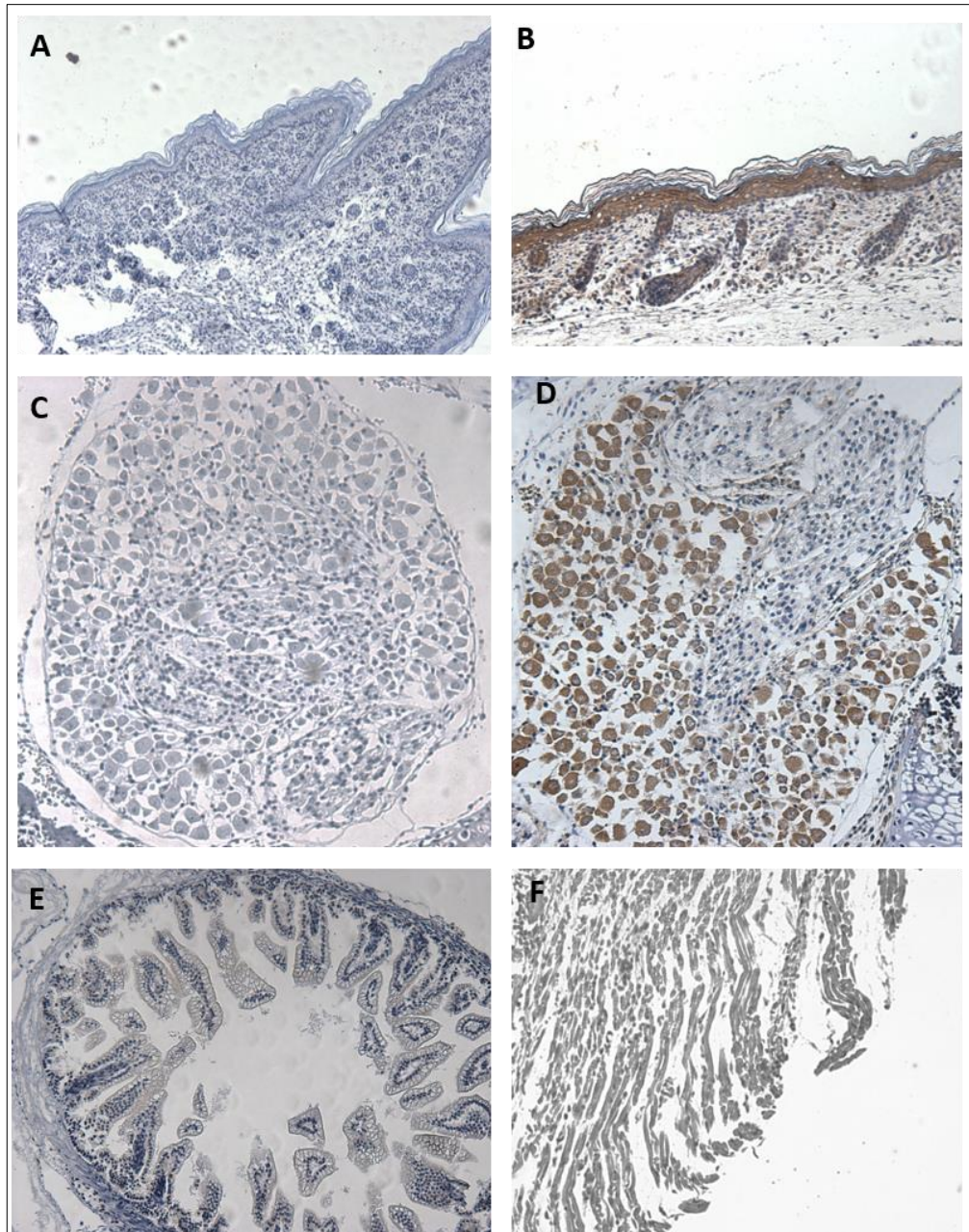


Figure 6: IHC for GFP cells present in F1 generation. A) Negative control of IHC reaction demonstrating no unspecific staining on epidermis; B) GFP positive cells presenting on epidermis; C) Negative control of IHC reaction demonstrating no unspecific staining spinal cord; D) GFP positive neurons; E) GFP positive enterocytes; F) GFP positive striated muscle. 20X magnification



## Discussion

Treatment of malignant disease has resulted in a significant increase in life expectancy for young cancer patients. After cytotoxic chemotherapy, women's could preserve their future fertility potential by undergoing egg-retrieval and vitrification or egg-retrieval and in vitro fertilization with embryo cryopreservation for future thawing and embryo transfer after several years of no evidence of the malignant disease [13]. However those possibilities are not available for young and single patients.

Recent studies have challenged the dogma that women are born with a finite number of oocytes without the capacity for renewal.

Here, in order to evaluate the effects of cell therapy to restore chemical induced infertility, we have adapted the Sawhney et al.,[8] protocol applying 3 cycles of 2.5mg/kg cisplatin with a seven-day interval. Corroborating with Sawhney and Tanake we could demonstrate differences in follicles counting as well as in weight loss, showing that we have successfully reproduced the cisplatin-induced ovarian gonadotoxicity model.

Stem cell-based strategies for ovarian regeneration and oocyte production have been proposed as future clinical therapies for treating infertility in women [14, 15].

In this way, we and others have studied mitotically active germ cells known as oogonial stem cells (OSCs) that have been shown to undergo differentiation into oocytes in both in-vitro and in-vivo studies [16,17,18].

Here we demonstrated the GFP positive OSCs were able to promote fertility rescue in cisplatin induced infertile females. Our previous work isolated MVH positive OSCs by immunomagnetic isolation and demonstrated that these cells were able to increase the number of follicles with apparent normal structure in the cells recipient group [16].

In this work we took a step forward to determine whether these cells had the ability to participate in oogenesis and offspring generation. Our data corroborate with Lu Z et al, 2016 [18] as we were able to not only the fertility rescue but also the generation of offspring and even a chimera formation demonstrating that GFP transplanted cells were able to generate tissues form ectodermal, mesodermal and endodermal layer. Unfortunately we could not sort DDX4 positive cells. Others have demonstrated as White et al. 2012[19] and Hayashi, K. et al 2012[20] what OSCs are a very rare cell population and we demonstrated here that only 0.9% of our isolated cells were positive for this marker, we possibly have transplanted other cells like putative mesenchymal

stromal ovary cells [21], however an article published in *Science* showed that there is no evidence to suggest that bone marrow stem cells and/or circulating cells contribute to the formation of mature eggs [22] suggesting that OSCs may be related to oocyte rescue and consequently progeny formation.

However the possible transplantation of MSC also could perform a role on tissue regeneration. In animals with ovarian failure, MSCs infusion resulted in an increase in ovarian vascularization and weight, reduction in apoptosis and increase in cell proliferation with greater primordial, antral and pre-ovulatory follicle number compared to controls [23]. Further experiments must be performed to confirm which cell is responsible for the observed effect in our study.

Few conditions in reproductive medicine have greater potential to destroy the hope and dreams of parenthood than premature ovarian failure or insufficiency. The science behind OSCs may make it possible to problem by developing patient specific oocytes that could be used for in-vitro fertilization. It may also mean that women of advancing age or women with primary ovarian insufficiency or women under gonadotoxic treatments may one day be more likely to conceive by utilizing OSCs with the help of artificial reproductive technologies. Even after those these encouraging data, certainly, much more investigation is needed to determine the genetic integrity and quality of the oocytes derived from OSCs before any consideration of clinical application can occur. Thus, any potential clinical role or impact of OSCs on female fertility treatment must await further studies.

### **Compliance with ethical standards**

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of Animal Use Ethics Committee - Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the study was approved by the Committee with the number 14-0332.

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.



## References

1. E, Shojafar E, Mwhranjani ML &, Ali Shariatzadeh SM. Adipose-derived mesenchymal stromal cell transplantation at the graft site improves the structure and function of autografted mice ovaries: a stereological and biochemical analysis. *Cytotherapy*, 2018; 20: 1342-1336.
2. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WHB. Endocrine late-effects of cancer treatment 2 Cancer treatment and gonadal function: experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *LANCET Diabetes Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;8587:1–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00039-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00039-X)
3. Luyckx V, Dolmans M, Vanacker J, Legat C, Moya CF, Donnez J, et al. A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold. *Fertil Steril*. 2014;101:1149–56.
4. Meirelles, L. DA S.; Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006 v. 119, n. Pt 11, p. 2204–13.
5. Simón, C. Somatic stem cells and tissue engineering shed light on unsolved clinical issues in reproductive medicine: in stem cells we trust. *Fertility and Sterility* 2012 v. 98, n. 1, p. 1–2.
6. Dunlop, C. E.; Telfer, E. E.; Anderson, R. A. Ovarian stem cells--potential roles in infertility treatment and fertility preservation. *Maturitas*. 2013 v. 76, n. 3, p. 279–83.
7. Johnson, J. et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004, v. 428, n. 6979, p. 145–50.
8. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH. Cisplatin-Induced Long-term Failure of Spermatogenesis in Adult C57/Bl/6J Mice. *J Androl* .

2005;2626:136–45.

9. Szturz P, Wouters K, Kiyota N, Tahara M, Prabhash K, Noronha V, et al. Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non- Nasopharyngeal Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*. 2017;22:1–11.

10. Ceschin AP, Biondo-Simões MDLP, Thomaz BAC, Totsugui J. Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004;19:27–30.

11. Parte S, Patel H, Sriraman K and Bhartiva D. Isolation and Characterization of Stem Cells in the Adult Mammalian Ovary. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2015; 1235:203-29 .

12. Mcgee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocr Rev*. 2000;21:200–14.

13. Imai A & Furui T. Chemotherapy-induced female infertility and protective action of gonadotropin-releasing hormone analogues. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2007; 20-24.

14. Zou, K. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature cell biology*. 2009 v. 11, n. 5, p. 631–6

15. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cells injection in the treatment of chemically induce ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy*. 2013 v. n.1 p.64-75.

16. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. *Stem Cells Int*. 2014 , p.8.

17. Ghazal S. Oogonial stem cells: do they exist and may they have an impact on future fertility treatment? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2013; 25(3):223–228.
18. Lu Z, Wu M, Zhang J, Xiong J, Cheng J, Shen W, Luo A, Fang L and Wang S. Improvement in Isolation and Identification of Mouse Oogonial Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016, p.10.
19. White, Y. A R. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature medicine*. 2012, v. 18, n. 3, p. 413–21.
20. HAYASHI, K. et al. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science (New York, N.Y.)*. 2012, v. 338, n. 6109, p. 971–5, 16.
21. Stimpfel M, Cerkovnik P, Novakovic S, Maver A, Virant-Klun I. Putative mesenchymal stem cells isolated from adult human ovaries. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31(8):959-74.
22. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006; 29;441(7097):1109-14.
23. Herraiz S, Buigues B, Díaz-García C, Romeu M, Martinez S, Gomez-Seguí I, et al. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cells. *Fertil Steril* 2018;109:908–18.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como conclusão, esse estudo demonstrou diferenças significativas na contagem de folículos, bem como na perda de peso dos animais tratados, mostrando que o modelo de gonadotoxicidade ovariana induzida pela cisplatina foi reproduzido com sucesso. Também foi possível comprovar que as OSCs GFP positivas foram capazes de promover a recuperação da fertilidade em fêmeas inférteis submetidas à quimioterapia, bem como possibilitar a geração de descendentes provenientes do transplante celular. Foi demonstrado que as células GFP transplantadas foram capazes de originar quimeras e estavam presentes nos tecidos dos três folhetos embrionários, ectoderme, mesoderme e endoderme. Uma grande variedade de possibilidades para futuros tratamentos derivados desta técnica e a compreensão acerca das OSCs no sistema reprodutivo são aspectos vitais deste processo.

## PERSPECTIVAS

- Avaliar os níveis de expressão dos receptores de DDX4 e OCT4, marcadores de células-tronco da linhagem germinativas nos ovários das fêmeas tratadas e nas controles.
- Avaliar a presença de células GFP-positivas no ovário das fêmeas tratadas.
- Avaliar a expressão de DDX4 , OCT4 e GFP pela técnica de western Blot.













