

**MARCOS EIJI SHIROMA**

**Efeitos da melatonina na criopreservação do tecido  
ovariano**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia  
Orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior  
Coorientadora: Dra. Luciana Lamarão Damous

**SÃO PAULO  
2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Shiroma, Marcos Eiji

Efeitos da melatonina na criopreservação do  
tecido ovariano / Marcos Eiji Shiroma. -- São  
Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: José Maria Soares Júnior.

Coorientadora: Luciana Lamarão Damous.

Descritores: 1.Transplante autólogo 2.Melatonina  
3.Ovário 4.Criopreservação 5.Preservação da  
fertilidade 6.Sobrevivência de enxerto

USP/FM/DBD-056/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliase Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## **Agradecimentos**

À minha família, que me criou priorizando condições para que eu seguisse dedicando-me à educação desde o ensino fundamental até o atual estágio de pós-graduação;

À Dra. Luciana Lamarão Damous, que, desde o início do planejamento desta pesquisa, exerceu papel primordial na concatenação do atual estudo com pesquisas prévias por ela já publicadas;

Ao Prof. Dr. José Maria Soares Jr, que foi o orientador deste estudo, provendo experiência ampla e sólida com pesquisa experimental e análise de resultados;

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, que desde sua entrada como Professor Titular da Disciplina de Ginecologia na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo estimulou e expandiu a produção científica, provendo estrutura, equipe e experiência;

Aos animais utilizados neste experimento, que vieram a este mundo tendo suas vidas já determinadas a contribuir com a execução de pesquisa científica para benefício da espécie Humana;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que sempre me atenderam com presteza, agilidade, fornecendo acesso a periódicos para bibliografia;

À Sra. Lucinda Cristina Pereira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Obstetrícia e Ginecologia, pelo apoio burocrático prestado sempre com eficiência e positividade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), que supriu parte do custeio financeiro deste estudo.

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Tabelas.....	III
Lista de Gráficos.....	IV
Lista de Figuras.....	VI
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI

### **1 Introdução**

1.1 Preservação da Fertilidade.....	1
1.2 Melatonina.....	2

### **2 Objetivos**

2.1 Geral.....	12
2.2 Específicos.....	12

### **3 Materiais e Métodos**

3.1 Controle de Ciclo Estral.....	13
3.2 Protocolo de Anestesia e Laparotomia.....	14
3.3 Protocolo de Ooforectomia.....	15
3.4 Protocolo de Criopreservação.....	15
3.5 Protocolo de Transplante de Ovário.....	16
3.6 Coleta e Análise do Material.....	16
3.7 Análise Estatística.....	19

### **4 Resultados**

4.1 Enxertos de ovários congelados e descongelados.....	20
4.2 Enxertos de ovários submetidos a transplante.....	22
4.2.1 Ciclo Estral.....	22
4.2.2 Macroscopia e histomorfometria.....	22
4.2.3 Imunoistoquímica.....	23

<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Referências.....</b>	<b>50</b>

**Lista de Abreviaturas**

DMSO	Dimetilsulfóxido
PO	Pós-operatório
TUNEL	Marcação de cortes fita simples por deoxinucleotidil terminal transferase
EUA	Estados Unidos da América
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PCNA	Antígeno nuclear de célula proliferativa
MT1	Receptor de melatonina tipo 1
MT2	Receptor de melatonina tipo 2
AMP	Monofosfato de adenosina
SNC	Sistema nervoso central
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
GMP	Guanosina 3'-5' monofosfato
PKC	Proteína quinase C
RNA	Ácido ribonucleico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
LH	Hormônio luteinizante
Bcl-2	Família de genes linfoma de células B2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
LIM	Laboratório de Investigação Médica
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
TL	Lactato de Tyrode
PBS	Tampão fosfato-salino
DAB	Diaminobenzidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
G1	Grupo controle
G2	Grupo melatonina

F

CL

Folículo

Corpo lúteo



**Lista de Tabelas**

- Tabela 1 Análise histológica de contagem de folículos, corpos lúteos e vasos sanguíneos (média±desvio padrão) comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo) 25
- Tabela 2 Análise imunoistoquímica de caspase e TUNEL comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo) 26
- Tabela 3 Densidade de folículo ovariano, corpo lúteo e vasos sanguíneos (média±desvio padrão) comparando adição da melatonina ao crioprotetor ou não, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo) 28
- Tabela 4 Análise imunoistoquímica de caspase 3 clivada, TUNEL, ki67, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, fator de von Willebrand e colágenos tipo I e III entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo) 29

**Lista de Gráficos**

Gráfico 1	Análise histológica de contagem de folículos, corpos lúteos e vasos sanguíneos (média±desvio padrão) comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo)	26
Gráfico 2	Análise imunoistoquímica de caspase e TUNEL comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo)	27
Gráfico 3	Análise imunoistoquímica de caspase 3 clivada entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	30
Gráfico 4	Análise imunoistoquímica de TUNEL entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	32
Gráfico 5	Análise imunoistoquímica de Ki67 entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	34
Gráfico 6	Análise imunoistoquímica de receptor de estrogênio entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	36
Gráfico 7	Análise imunoistoquímica de receptor de progesterona entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	38
Gráfico 8	Análise imunoistoquímica de fator de von Willebrand entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)	40
Gráfico 9	Análise imunoistoquímica de fator de colágeno tipo I entre grupos controle e melatonina, em enxerto	41

criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias  
do transplante (n=10 cada grupo)

Gráfico 10 Análise imunoistoquímica de colágeno tipo III entre  
grupos controle e melatonina, em enxerto  
criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias  
do transplante (n=10 cada grupo)

## Lista de Figuras

- Figura 1 Fisiologia da secreção de melatonina. Esta indolamina é 5  
 produzida na glândula pineal. A produção deste hormônio está  
 sob controle de mecanismos que tem sua origem em fibras  
 nervosas oriundas da retina que passam pelo trato retino-  
 hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático (relógio biológico).  
 Este irá processar esta informação, em seguida, transmitirá pulsos  
 para o gânglio cervical superior e, finalmente, com a terminação  
 nervosa pós-ganglionar irá controlar a função da pineal. Este  
 sistema neuronal é ativado pela escuridão e inibido pela luz. A  
 ativação dos receptores  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ - adrenérgicos na glândula pineal  
 aumenta AMP cíclico e concentrações de cálcio e ativa n-Acetil-  
 Transferase (NAT), incrementando a síntese das indolaminas  
 (adaptada de Brzezinski et al.,1987)
- Figura 2 Esquema mostrando a síntese de melatonina na glândula pineal e 6  
 seu controle. A síntese da hidroxitriptamina a partir do triptofano  
 é estimulada pela luz, enquanto a atividade da enzima N-Acetil-  
 Transferase é estimulada pela escuridão. As barras escuras  
 indicam a fase escura do ciclo luz-escuro (Adaptado de Masana et  
 al., 2001)
- Figura 3 Esquema mostrando os mecanismos de ação da síntese de 7  
 melatonina através de receptores de melatonina localizados na  
 membrana plasmática (adaptado de Valenzuela et al., 2015)
- Figura 4 Radicais livres oxidativos baseados em oxigênio em vermelho; 10  
 radicais livres oxidativos baseados em nitrogênio em azul.  
 Melatonina atua diretamente como antioxidante nos radicais  
 marcados com asterisco\* e estimula enzimas anti-oxidantes:  
 glutatona peroxidase (GPX), glutatona- redutase (GSR),  
 superóxido-dismutase (SOD); estimula a enzima glutamil-  
 cisteína-ligase (GCL), aumentando síntese do potente anti-  
 oxidante glutatona (GSH); inibe enzimas pró-oxidativas óxido-  
 nítrico-sintase (NOS) e mieloperoxidase (MPO); NO óxido  
 nítrico; CAT catalase; O<sub>2</sub> oxigênio; 1O<sub>2</sub>, dioxigênio; O<sub>2</sub><sup>-</sup>,  
 radical superóxido; GSSG glutatona oxidada; hv energia  
 luminosa. Adaptado de Reiter et al., 2009
- Figura 5 Citologia corada pela técnica de Shorr-Harris de esfregaço vaginal 14  
 de ratas ilustrando as fases proestro (A), estro (B) e diestro (C) do  
 ciclo estral

- Figura 6 Frasco de crioprotetor DMSO (A); frasco de melatonina (B); criotubos com ovários de ratas (C) 17
- Figura 7 Ilustração da velocidade de congelamento do programa CL-8800, Cryogenesis software 17
- Figura 8 Sistema de congelamento lento (A); criotubo em temperatura de criopreservação -196°C (B) 18
- Figura 9 Ovário de rata em processo de descongelamento 18
- Figura 10 Ovário autólogo de rata sendo transplantado junto ao músculo psoas, após congelamento e descongelamento 19
- Figura 11 Enxerto autólogo de ovário de rata sendo coletado após 30 a 35 dias pós-transplante 20
- Figura 12 Enxerto autólogo de ovário de rata coletado após 30 a 35 dias pós-transplante 20
- Figura 13 Reação de imunistoquímica da caspase 3 clivada em folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D). A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x 31
- Figura 14 Reação de imunistoquímica de TUNEL em folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D). A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x 33
- Figura 15 Reação de imunistoquímica de Ki67 em folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D). A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x 35

- Figura 16 Reação de imunistoquímica de receptor de estrogênio em 37  
folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D). A – corte  
histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo  
ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo  
melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de  
ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte  
histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando  
corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x
- Figura 17 Reação de imunistoquímica de receptor de progesterona em 39  
folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D). A – corte  
histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo  
ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo  
melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de  
ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte  
histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando  
pcorpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x
- Figura 18 Reação de imunistoquímica de fator de von Willebrand em 40  
estroma ovariano de rata do grupo controle A e grupo melatonina  
B; C – corte histológico de controle negativo, 100x
- Figura 19 Reação de Picrosirius para colágeno tipo I em estroma ovariano 41  
de rata do grupo controle A e grupo melatonina B; reação de  
Picrosirius para colágeno tipo III em estroma ovariano de rata do  
grupo controle C e grupo melatonina D

## Resumo

Shiroma ME. *Efeitos da melatonina na criopreservação do tecido ovariano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

**INTRODUÇÃO:** Os avanços no tratamento de câncer possibilitaram maior sobrevivência às pacientes. Consequentemente, novas técnicas que permitam a manutenção da fertilidade dessas mulheres são estudadas e algumas permanecem em caráter experimental, como o transplante de ovário, que ainda apresenta limitações na qualidade do tecido criopreservado depois do descongelamento. A melatonina é uma indolamina com potente propriedade anti-oxidante cujos efeitos tem sido estudados em transplante de diversos órgãos. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da melatonina na criopreservação do tecido ovariano de ratas: avaliação funcional pela retomada do ciclo estral após transplante; macroscopia, histomorfometria e imunohistoquímica do enxerto. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Vinte e seis ratas Wistar adultas, com cerca de três meses de idade e ciclos estrais regulares foram distribuídas, randomicamente, em dois grupos com 13 animais em cada: 1) grupo controle: ovários criopreservados com meio M2 de cultura celular e crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO); e 2) grupo melatonina: ovários criopreservados com meio M2, DMSO e melatonina. Os ovários foram mantidos em nitrogênio líquido por 24h e, em seguida, realizou-se transplante autólogo e avascular dos ovários íntegros em retroperitônio. Em outros três animais de cada grupo, os ovários foram analisados imediatamente após o descongelamento, para avaliar os possíveis efeitos causados pela criopreservação. A partir do 15<sup>o</sup> dia de pós-operatório (PO), coletaram-se esfregaços vaginais diários corados pela técnica de Shorr-Harris para caracterização do ciclo estral. Entre o 30<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dia de PO, os animais foram submetidos à eutanásia sempre na fase diestro do ciclo estral. Os enxertos ovarianos foram identificados, ressecados e armazenados. Realizaram-se as seguintes análises: 1) histomorfológica; 2) histomorfométrica (classificação e contagem de folículos ovarianos e corpos lúteos); 3) quantificação de colágeno no estroma do ovário (Picrosirius); 4) imunohistoquímica para proliferação celular (Ki-67), apoptose (caspase-3 clivada, TUNEL), angiogênese (fator VIII – von Willebrand) e expressão hormonal (receptor para estrogênio e

progesterona). RESULTADOS: No grupo de ratas cujos enxertos ovarianos foram analisados logo após o descongelamento, não se observou diferença estatisticamente significativa do grupo melatonina em relação ao controle com relação a folículos imaturos ( $4,66 \pm 0,88 \times 10,33 \pm 2,90$ ;  $p=0,13$ ), folículos maduros ( $5,33 \pm 1,20 \times 11,00 \pm 3,51$ ;  $p=0,20$ ), corpos lúteos ( $10,33 \pm 4,70 \times 10,00 \pm 3,46$ ;  $p=0,95$ ), vasos sanguíneos ( $2,66 \pm 1,76 \times 4,66 \pm 1,45$ ;  $p=0,43$ ), expressão de caspase em estroma ( $1,95 \pm 0,33 \times 1,61 \pm 0,32$ ;  $p=0,48$ ), caspase em folículos ( $2,37 \pm 0,33 \times 3,39 \pm 0,75$ ;  $p=0,18$ ), TUNEL em estroma ( $0,21 \pm 0,09 \times 0,05 \pm 0,01$ ;  $p=0,05$ ) e TUNEL em folículos ( $0,07 \pm 0,01 \times 0,04 \pm 0,01$ ;  $p=0,26$ ). No grupo de ratas cujos enxertos ovarianos foram analisados após 30 a 35 dias do transplante, todos os animais apresentaram fase estral do ciclo estral, sendo mais precoce no grupo melatonina ( $16,22 \pm 0,50 \times 20,75 \pm 1,89$ ;  $p=0,0017$ ). Os folículos ovarianos viáveis estavam em diversos estágios de desenvolvimento e os corpos lúteos, intactos. O grupo melatonina, em relação ao grupo controle, apresentou aumento em: folículos maduros ( $8,75 \pm 2,02 \times 3,01 \pm 0,91$ ;  $p=0,04$ ), colágeno tipo I ( $8,52 \pm 1,04 \times 5,75 \pm 0,52$ ;  $p=0,03$ ), células endoteliais (fator de von Willebrand) ( $3,20 \pm 0,38 \times 1,69 \pm 0,28$ ;  $p=0,003$ ), proliferação celular por Ki67 tanto em folículos ( $4,09 \pm 0,55 \times 1,46 \pm 0,29$ ;  $p=0,002$ ) como corpos lúteos ( $5,27 \pm 0,54 \times 1,67 \pm 0,33$ ;  $p<0,001$ ), receptores de estrogênio em folículos ( $5,37 \pm 0,73 \times 2,41 \pm 0,93$ ;  $p=0,02$ ), corpos lúteos ( $6,43 \pm 0,85 \times 2,25 \pm 0,38$ ;  $p<0,001$ ) e apoptose por caspase em corpos lúteos ( $24,50 \pm 2,06 \times 5,88 \pm 0,82$ ;  $p<0,001$ ). O grupo melatonina, em relação ao controle, revelou redução em colágeno tipo III ( $1,49 \pm 0,15 \times 3,53 \pm 0,28$ ;  $p<0,001$ ) e apoptose pelo método TUNEL em folículos ( $0,04 \pm 0,02 \times 0,40 \pm 0,14$ ;  $p<0,001$ ) e corpos lúteos ( $0,10 \pm 0,03 \times 1,58 \pm 0,23$ ;  $p<0,001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa no grupo melatonina em relação ao controle em número de folículos imaturos ( $6,00 \pm 2,55 \times 7,20 \pm 3,23$ ;  $p=0,66$ ), corpos lúteos ( $5,22 \pm 1,05 \times 7,86 \pm 1,71$ ;  $p=0,34$ ) e apoptose representada pela caspase 3 clivada em folículos ( $13,70 \pm 1,79 \times 11,30 \pm 1,87$ ;  $p=0,38$ ) nem em receptores de progesterona em folículos ( $4,65 \pm 1,13 \times 4,26 \pm 0,53$ ;  $p=0,77$ ) ou corpos lúteos ( $13,47 \pm 1,72 \times 16,62 \pm 1,07$ ;  $p=0,14$ ). CONCLUSÃO: O emprego da melatonina na solução de criopreservação aparenta melhorar a qualidade do tecido ovariano preservado, em parâmetros funcionais, histológicos e imunoistoquímicos.

Descritores: Transplante autólogo; Melatonina; Ovário; Criopreservação; Preservação



da fertilidade; Sobrevivência de enxerto.

## Abstract

Shiroma ME. *Melatonin effects on ovarian tissue cryopreservation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

**INTRODUCTION:** Advances in cancer treatment have allowed young patients to enjoy longer survival. Consequently, new techniques enabling fertility maintenance in such young women have been studied in experimental environments. Also, cryopreservation has still some limitations in the quality of ovarian tissue after thawing. Melatonin is an indolamine with potent anti-oxidant properties that have been studied in different organs transplantation. **OBJECTIVE:** the aim of this study was to analyze cryopreserved rat ovarian grafts with melatonin added to the culture medium: functional evaluation by estrous cycle restart after transplantation; macroscopy, histomorphometry and immunohistochemical analysis of the graft. **MATERIALS AND METHODS:** Twenty out of 26 adult female Wistar rats, aged approximately three months with regular estrous cycles, were allocated to two study groups of 10 animals each: 1) control group: cryopreserved ovaries in M2 culture medium, dimethyl sulfoxide (DMSO); and 2) melatonin group: cryopreserved ovaries in M2 culture medium, DMSO, and melatonin. Following a 24-hour immersion in liquid nitrogen, the whole ovaries underwent an autologous and avascular transplant with retroperitoneal placement. After postoperative (PO) day 15, daily vaginal smears were collected and stained by the Shorr-Harris technique for estrous cycle characterization. Between PO day 30 and 35, the animals were euthanized always in diestrus. The ovarian grafts were identified, dried, and stored. The following analyses were carried out: 1) histomorphology; 2) histomorphometry: classification and counting of ovarian follicles and corpora lutea; 3) quantification of collagen in ovarian stroma (Picosirius); 4) immunohistochemistry for cell proliferation (Ki-67), apoptosis (cleaved caspase 3, TUNEL), angiogenesis (factor VIII-von Willebrand factor) and hormonal expression (estrogen and progesterone receptors). The three remaining rats from each group had their ovaries analyzed immediately after thawing so as to determine the cryopreservation effects. **RESULTS:**

In the group of rats whose ovarian grafts were analyzed shortly after thawing, no statistically significant difference was observed between the melatonin group and the control group regarding immature follicles ( $4,66 \pm 0,88 \times 10,33 \pm 2,90$ ;  $p=0,13$ ), mature follicles ( $5,33 \pm 1,20 \times 11,00 \pm 3,51$ ;  $p=0,20$ ), corpora lutea ( $10,33 \pm 4,70 \times 10,00 \pm 3,46$ ;  $p=0,95$ ), blood vessels ( $2,66 \pm 1,76 \times 4,66 \pm 1,45$ ;  $p=0,43$ ), caspase expression in stroma ( $1,95 \pm 0,33 \times 1,61 \pm 0,32$ ;  $p=0,48$ ), caspase in follicles ( $2,37 \pm 0,33 \times 3,39 \pm 0,75$ ;  $p=0,18$ ), TUNEL in stroma ( $0,21 \pm 0,09 \times 0,05 \pm 0,01$ ;  $p=0,05$ ) and TUNEL in follicles ( $0,07 \pm 0,01 \times 0,04 \pm 0,01$ ;  $p=0,26$ ). In the group of rats whose ovarian grafts were analyzed 30 to 35 days after transplantation, all animals presented estrous phase of the estrous cycle, being more precocious in the melatonin group. ( $16,22 \pm 0,50 \times 20,75 \pm 1,89$ ;  $p=0,0017$ ). Viable ovarian follicles were obtained in several stages of development and intact, and functioning corpora lutea. The use of melatonin, in comparison to control, promoted an increase in: mature follicles ( $8,75 \pm 2,02 \times 3,01 \pm 0,91$ ;  $p=0,04$ ), collagen type I ( $8,52 \pm 1,04 \times 5,75 \pm 0,52$ ;  $p=0,03$ ), endothelial cells (von Willebrand factor) ( $3,19 \pm 0,38 \times 1,69 \pm 0,28$ ;  $p=0,003$ ), cellular proliferation (Ki67) both in follicles ( $4,09 \pm 0,55 \times 1,46 \pm 0,29$ ;  $p=0,002$ ) and corpora lutea ( $5,27 \pm 0,54 \times 1,67 \pm 0,33$ ;  $p<0,001$ ), estrogen receptors in follicles ( $5,37 \pm 0,73 \times 2,41 \pm 0,93$ ;  $p=0,02$ ) and corpora lutea ( $6,43 \pm 0,85 \times 2,25 \pm 0,38$ ;  $p<0,001$ ), and apoptosis by clived caspase 3 in corpora lutea ( $24,50 \pm 2,06 \times 5,88 \pm 0,82$ ;  $p<0,001$ ). In the melatonin group, compared to control, there was reduction on collagen type III ( $1,49 \pm 0,15 \times 3,53 \pm 0,28$ ;  $p<0,001$ ) and apoptosis by TUNEL on follicles ( $0,04 \pm 0,02 \times 0,40 \pm 0,14$ ;  $p<0,001$ ) and corpora lutea ( $0,10 \pm 0,03 \times 1,58 \pm 0,23$ ;  $p<0,001$ ). Melatonin group, compared to control, showed no statistically significant difference on number of immature follicles ( $6,00 \pm 2,55 \times 7,20 \pm 3,23$ ;  $p=0,66$ ), corpora lutea ( $5,22 \pm 1,05 \times 7,86 \pm 1,71$ ;  $p=0,34$ ) and apoptosis by caspase on follicles ( $13,70 \pm 1,79 \times 11,30 \pm 1,87$ ;  $p=0,38$ ) and progesterone receptor on follicles ( $4,65 \pm 1,13 \times 4,26 \pm 0,53$ ;  $p=0,77$ ) or corpora lutea ( $13,47 \pm 1,72 \times 16,62 \pm 1,07$ ;  $p=0,14$ ). **CONCLUSION:** The use of melatonin in cryopreservation solution seems to improve the quality of preserved ovarian tissue, in functional, histological and immunohistochemical parameters.

Descriptors: Transplantation, autologous; Melatonin; Ovary; Cryopreservation; Fertility preservation; Graft Survival.

## **1. Introdução**

### **1.1 Preservação da fertilidade**

Recentes avanços no tratamento de doenças oncológicas resultaram em aumento significativo da sobrevivência de mulheres jovens com câncer (Demeestere et al., 2009; Abir et al., 2011; Grynberg et al., 2012), obtendo-se assim taxas de cura superiores a 90% (Donnez et al., 2013; Siegel et al., 2020). Entre 2014 e 2016, uma em cada 17 mulheres até 49 anos desenvolveu câncer nos EUA (Siegel et al., 2020). Anualmente nos EUA, estimam-se 60 mil novos casos de câncer em mulheres antes dos 40 anos, sendo quatro mil em pré-púberes e adolescentes (Rodriguez-Wallberg et al., 2012). No entanto, a quimioterapia e a radioterapia podem comprometer o futuro reprodutivo dessas pacientes (Demeestere et al., 2009; Friedman et al., 2012; Grynberg et al., 2012; Rodriguez-Wallberg et al., 2012; Donnez et al., 2013; Labied et al., 2013), pois podem danificar o ovário. Estima-se que a insuficiência ovariana prematura ocorra em aproximadamente 68% das mulheres tratadas com agentes alquilantes para câncer de mama durante o período reprodutivo; de 38% a 57% das tratadas com quimioterapia citotóxica e radioterapia para linfomas; e mais de 90% das pacientes submetidas a regime de condicionamento para transplante de medula óssea (Demeestere et al., 2009; Donnez et al., 2013). A radioterapia também é reconhecidamente destruidora da reserva folicular. A grande preocupação atual centra-se em como preservar a fertilidade dessas mulheres.

Entre as opções para manutenção da capacidade reprodutiva, dispõem-se de congelamento de oócitos, embriões ou tecido ovariano (Grynberg et al., 2012; Rodriguez-Wallberg et al., 2012; Donnez et al., 2013). Essas técnicas de preservação da fertilidade ainda não fazem parte do manejo habitual de pacientes jovens que serão submetidas a tratamento citotóxico, pois a criopreservação de oócitos ou embriões implica em atraso de dois a quatro semanas no início do tratamento do câncer (Demeestere et al., 2009; Grynberg et al., 2012; Rodriguez-Wallberg et al., 2012; Labied et al., 2013). Outro motivo é que a criopreservação de tecido ovariano ainda é considerada técnica experimental, tendo limitações na qualidade do tecido descongelado.

A criopreservação possibilita o armazenamento de grande quantidade de folículos primordiais e primários, de maneira rápida e em qualquer período do ciclo menstrual (Demeestere et al., 2009; Friedman et al., 2012). Deve-se salientar que é a única opção para preservar a fertilidade de meninas pré-púberes (Demeestere et al., 2009; Abir et al., 2011; Rodriguez-Wallberg et al., 2012; Donnez et al., 2013; Labied et al., 2013). Portanto, o aprimoramento de técnicas para preservar o tecido ovariano é essencial para o avanço desta nova modalidade de tratamento, principalmente diminuindo o dano tecidual após o descongelamento.

A preservação da fertilidade da mulher é um dos grandes desafios de nossos tempos, assim como oferecer a pacientes em risco de insuficiência ovariana prematura (hipoestrogenismo), seja induzida ou iatrogênica, as melhores chances de maternidade (Grynberg et al., 2012; Donnez et al., 2013). Pode-se ofertar esse recurso também para pacientes com doenças não-malignas (Grynberg et al., 2012; Donnez et al., 2013), como anemia falciforme ou talassemia, que podem necessitar de transplante de medula óssea, além de lupus, doenças genéticas como a síndrome de Turner, ou até afecções que levem a ooforectomia bilateral, como cistos recorrentes (Demeestere et al., 2009; Donnez et al., 2013), todas implicando em infertilidade. Isso reforça a necessidade de aprimoramento dessa técnica.

Há diversos desafios a serem suplantados. A idade da paciente é um fator importante no sucesso da criopreservação, tendo como limite de 35 anos para a maioria dos centros de Reprodução Humana (Donnez et al., 2013). No transplante de tecido criopreservado de ovário, uma das principais dificuldades a serem superadas é melhorar o leito vascular da área receptora (Friedman et al., 2012; Donnez et al., 2013), uma vez que há lesão isquêmica que ocorre ao longo do tempo em que se restabelece a vascularização do enxerto (Demeestere et al., 2009; Abir et al., 2011; Friedman et al., 2012; Labied et al., 2013). Esta lesão resulta em fibrose e apoptose, afetando a taxa de sobrevivência dos folículos, assim como o tempo de vida útil do enxerto, ambos chaves para o restauro da fertilidade (Demeestere et al., 2009; Labied et al., 2013). Além disso, a ativação folicular no enxerto ocorre de forma acelerada após o transplante, levando a discrepâncias na maturação de células da granulosa e no desenvolvimento de oócitos, possivelmente devido a estresse de hipóxia e falta de hormônio anti-mülleriano no enxerto (Donnez et al., 2013). Por fim, o regime de congelamento e descongelamento causa alterações

morfológicas estruturais, especialmente na espessura da camada de células da teca interna (Donnez et al., 2013).

## 1.2 Melatonina

Nesse panorama de pesquisas experimentais para preservação da fertilidade, novas técnicas tem sido propostas para otimizar os resultados, entre as quais salienta-se o emprego de melatonina para diminuir o estresse oxidativo. A melatonina foi o primeiro composto biologicamente ativo identificado na pineal e constitui seu principal hormônio (Wurtman et al., 1969). A sua descoberta ocorreu no início do século, como resultado do esforço para o isolamento, na pineal de mamíferos, do fator responsável pelo clareamento da pele de anfíbios (Lerner et al., 1958). A melatonina, conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina é substância altamente lipossolúvel e transportada no plasma ligada majoritariamente a albumina, com vida média entre 30 e 60 minutos (Maganhin et al., 2008). Dessa maneira, é uma molécula hidro e lipofílica (Reiter et al., 2009; Tamura et al., 2012; Cruz et al., 2014), que se difunde facilmente nos vários compartimentos subcelulares, como as membranas, citoplasma, núcleo e mitocôndria (Reiter et al., 2009; Wang et al., 2013; Cruz et al., 2014). É uma indolamina derivada da serotonina e produzida principalmente na pineal (Reiter et al., 2009; Tamura et al., 2012). Esta glândula está localizada no teto do terceiro ventrículo, entre os hemisférios cerebrais e tem peso de cerca de 0,13g e diâmetro de 1,2cm em humanos (Maganhin et al., 2008). É conectada à retina por projeções retino-hipotalâmicas via núcleo supraquiasmático do hipotálamo, no qual funciona como controle autônomo para o gânglio cervical superior (Maganhin et al., 2008). Sua síntese é controlada pelo núcleo supraquiasmático, que tem, como função primordial, gerar um ritmo circadiano endógeno de aproximadamente 24 horas, sendo por isso denominado de “relógio biológico”, tipo oscilador auto-contínuo, pelo qual a informação do meio ambiente chega até a pineal. Alguns neurotransmissores regulam a função da pineal, como a noradrenalina e o glutamato. O primeiro por meio do terminal simpático pós-ganglionar, oriundo da interface do trato retino-hipotalâmico e do núcleo supraquiasmático. O segundo por receptor diretamente na membrana da pineal (Reichlin, 1992). A adrenalina e a noradrenalina também agem diretamente nos

adrenoceptores do subtipo alfa 1 e beta 1, que se localizam nos pinealócitos, estimulando a captação do triptofano e facilitando a síntese das indolaminas, como serotonina e melatonina (Reiter et al., 2014). Estudos com pinealócitos em cultura mostram que o sinal celular para incremento da síntese das indolaminas está também na dependência da ativação dos receptores beta-adrenérgicos (Reiter et al., 2014). Além disso, os esteróides ovarianos regulariam a interação entre os receptores alfa e beta adrenérgicos, modulando a síntese desta indolamina (Reiter et al., 2014).

Há produção de melatonina em outros locais do corpo, como a retina, corpo ciliar da íris, glândulas harderianas e lacrimais, linfócitos e intestino grosso. Essas outras fontes teriam contribuição mínima para a concentração plasmática, porém, seriam importantes para ação local onde foram produzidas. (Maganhin et al., 2008).

A produção da melatonina na pineal obedece a um ritmo circadiano, ou seja, oscila durante o período de 24h. É sincronizada pela luz, pela fotoperiodicidade ambiental (Moore et al., 1974), tendo sua biossíntese nos pinealócitos e nos demais tipos celulares estimulada durante o período escuro e inibida na presença de luz (Falcón et al., 2009). Sua secreção é controlada pelo núcleo supraquiasmático que constitui o relógio biológico dos mamíferos (Maganhin et al., 2008). Salienta-se que o ritmo circadiano e a grande concentração noturna desse hormônio são determinados pela síntese na pineal (Dubocovich et al., 2003). Há menor concentração sérica durante o dia e maior durante a noite, período em que a melatonina exerce o efeito de diminuir o ritmo da digestão, a temperatura, a frequência cardíaca e a pressão arterial (Maganhin et al., 2008).

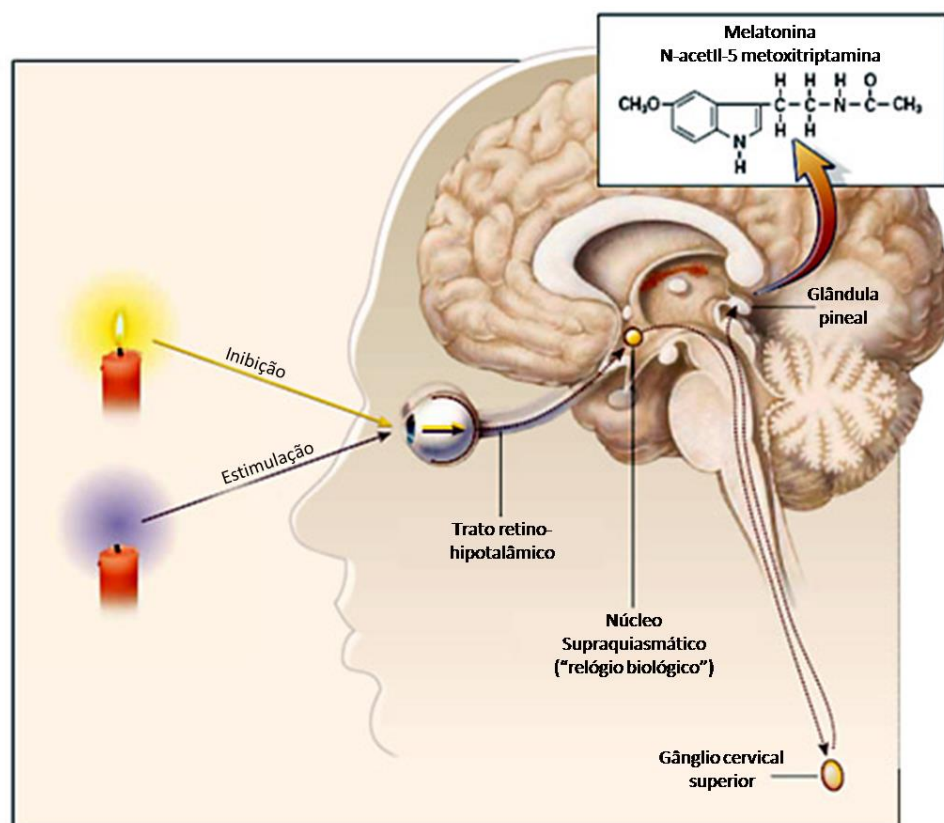


Figura 1 – Fisiologia da secreção de melatonina. Esta indolamina é produzida na glândula pineal. A produção deste hormônio está sob controle de mecanismos que tem sua origem em fibras nervosas oriundas da retina que passam pelo trato retino-hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático (relógio biológico). Este irá processar esta informação, em seguida, transmitirá pulsos para o gânglio cervical superior e, finalmente, com a terminação nervosa pós-ganglionar irá controlar a função da pineal. Este sistema neuronal é ativado pela escuridão e inibido pela luz. A ativação dos receptores  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ -adrenérgicos na glândula pineal aumenta AMP cíclico e concentrações de cálcio e ativa n-Acetil-Transferase (NAT), incrementando a síntese das indolaminas (adaptada de Brzezinski et al., 1987).

Esta indolamina deriva de várias reações bioquímicas, envolvendo o aminoácido triptofano como precursor, que é convertido em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano-hidroxilase. O produto formado, 5-hidroxitriptofano, sofre reação de descarboxilação pela 5-hidroxitriptofano-descarboxilase, formando a serotonina. Esta, sob a ação da enzima arilalquilamina-N-acetil-transferase, é convertida em N-acetil serotonina, que por sua vez é metilada formando a melatonina pela enzima hidroxindol-*o*-metil-transferase (Figura 2). Essa é a etapa limitante para a síntese da melatonina (Maganhin et al., 2008; Pandi-Perumal et al., 2008).



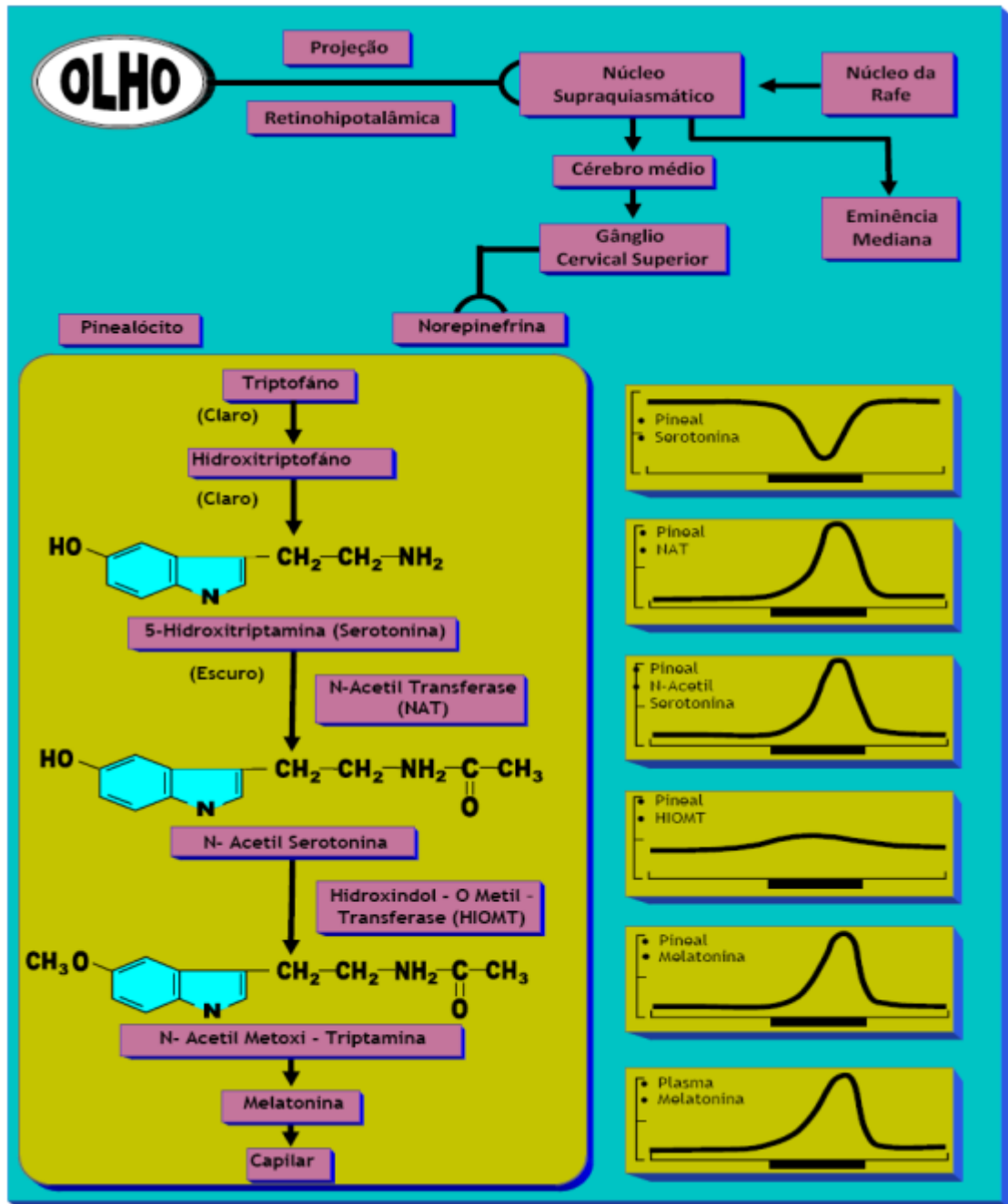


Figura 2 – Esquema mostrando a síntese de melatonina na glândula pineal e seu controle. A síntese da hidroxitriptamina a partir do triptofano é estimulada pela luz, enquanto a atividade da enzima N-Acetil-Transferase é estimulada pela escuridão. As barras escuras indicam a fase escura do ciclo luz-escuro (Adaptado de Masana et al., 2001).

A melatonina exerce suas funções biológicas por meio de receptores específicos MT1 e MT2, os quais são acoplados à proteína G e atuam via redução de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Masana et al., 2001; Maganhin et al., 2008). Os receptores

MT1 e MT2 são expressos em diversos tecidos, como sistema nervoso central (SNC), ovários (Soares-Jr et al., 2003), testículos, glândulas mamárias, retina, tecido coronariano, útero e células do sistema imunológico (Macchi et al., 2004; Valenzuela et al., 2015). Os receptores do tipo MT3 são localizados nos rins, fígado, cérebro, coração, pulmões, intestino, tecido muscular e adiposo (Pandi-Perumal et al., 2008). A melatonina também é capaz de se ligar diretamente a proteínas intracelulares como a calmodulina, calreticulina e tubulina ou ainda a receptores nucleares, modulando a ação de enzimas citoplasmáticas (Johnston et al., 2015). A melatonina, por meio do receptor MT1, diminui o acúmulo de AMP cíclico intracelular, o qual é importante em várias etapas da esteroidogênese ovariana (Soares-Jr et al., 2003). Outra via de tradução de sinal desse receptor se faz pelo aumento da fosforilação de algumas quinases envolvidas com o sinal de proliferação celular, tais como proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1 e ERK 2) (Figura 3).

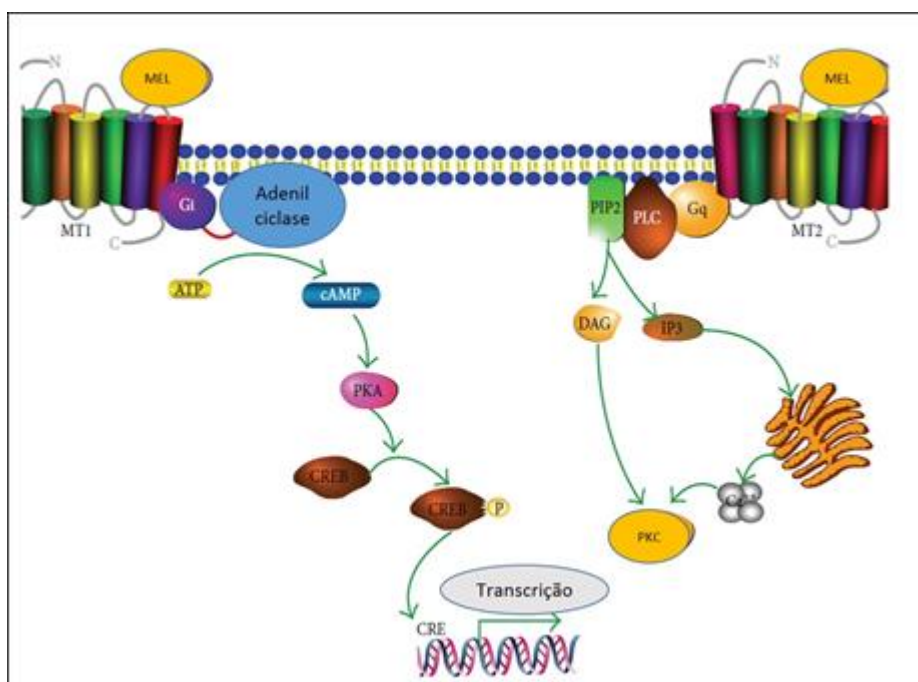


Figura 3 – Esquema mostrando os mecanismos de ação da síntese de melatonina através de receptores de melatonina localizados na membrana plasmática (adaptado de Valenzuela et al., 2015).

O receptor de melatonina está ainda envolvido com a regulação de canais iônicos, como o de cálcio e o de potássio. Por exemplo, ativação de proteínas G não sensíveis à toxina Pertussis ligada a este receptor na “pars tuberalis” da hipófise de ovelhas aumenta

o cálcio intracelular, agindo diretamente na regulação do canal iônico. Já em ratos, ocorre o inverso: inibição do influxo de cálcio intracelular na hipófise. Este pode ser um dos mecanismos que diferenciam os animais sazonais dos não sazonais em relação à reprodução (Maganhin et al., 2008; Reiter et al., 2010, Carlomagno et al., 2011). Os canais de potássio podem também sofrer a ação dos receptores de melatonina através do complexo beta-gama da proteína G inibitória (sensível à toxina Pertussis) (Masana et al., 2001).

Os receptores MT2 interagem com alguns mecanismos, que incluem o AMP cíclico, como também diminuem o acúmulo de um segundo mensageiro, a guanosina 3'-5' monofosfato cíclico (GMP cíclico). Outras vias de atuação envolvem o aumento da proteína quinase C (PKC), demonstrada em experimentos usando o sistema nervoso central, bem como a ação na atividade da fosfolipase C e do diacilglicerol. Fisiologicamente, o receptor MT2 tem várias funções: modular a liberação de dopamina na retina de coelhos (Masana et al., 2001; Dubocovich et al., 2007); promover o avanço no ritmo circadiano (Masana et al., 2001); aumentar a imunidade tipo humoral e também a mediada por células (Dubocovich et al., 2003); inibir a movimentação em rolamentos dos leucócitos na microvasculatura (Masana et al., 2001); inibir a proliferação do coriocarcinoma humano (Shiu et al., 2000); modificar o metabolismo da glicose no tecido adiposo (Masana et al., 2001); modular a atividade neuronal no hipocampo (Soares-Jr et al., 2003) e mediar a vasodilatação arterial (Erşahin et al., 2002).

Teoricamente, existe um terceiro tipo de receptor de membrana para a melatonina, o qual não foi ainda clonado em mamíferos. De fato, alguns autores acreditam que não seja um receptor, mas uma enzima semelhante à quinona redutase 2 devido às suas propriedades farmacológicas (Masana et al., 2001; Dubocovich et al., 2003; Pandi-Perumal et al., 2008). Contudo, vários mecanismos da melatonina ainda são desconhecidos, sobretudo quanto a sua atuação nos mecanismos gênicos no sistema reprodutor.

No sistema reprodutor feminino, foram identificados RNAm para os receptores MT1 e MT2 em células da granulosa ovarianas (Soares-Jr et al., 2003). Isto sugere que este hormônio pode ter uma ação sobre a esteroidogênese dessas células e sobre a função folicular (Soares-Jr et al., 2003). Após estudar células da granulosa-luteais humanas, (Woo et al., 2001) mostrou-se que a melatonina pode regular a produção de progesterona e a expressão gênica para receptores de GnRH e LH. Além disso, em células ovarianas,

fatores como estrógenos endógenos regulam a atividade funcional dos receptores de melatonina (Masana et al., 2005).

Alguns estudos mostram que a melatonina está mais de três vezes aumentada no líquido folicular do que na circulação sanguínea, sugerindo um papel deste hormônio na maturação folicular (Rönnberg et al., 1990). Além disso, as células da granulosa de ovários de ratas expressam os receptores de melatonina do tipo I e II com ação dependente dos níveis de estrogênio no meio de cultura, podendo ter uma ação estimulatória ou inibidora sobre o AMP cíclico, modulando o metabolismo intracelular (Soares-Jr et al., 2003). Na sinalização intracelular do AMP, podemos destacar proliferação celular, mitose, esteroidogênese e angiogênese (Berisha et al., 2016). Alterações do nível sérico desse hormônio estão relacionadas a distúrbios ovulatórios tanto em ratas como em humanos (Maganhin et al., 2008). Em ratas privadas de melatonina, observa-se ciclo estral contínuo e anovulatório, abertura vaginal precoce, hipertrofia ovariana e aumento da cornificação das células vaginais. Por outro lado, a reposição dessa substância promove a reversão de tais efeitos. Encontra-se em concentração crescente no folículo ovariano, conforme ocorre o desenvolvimento, atingindo maior concentração em comparação com o plasma no folículo pré-ovulatório (Reiter et al., 2009; Tamura et al., 2012; Cruz et al., 2014). A redução da melatonina ainda diminui a implantação embrionária em ratas (Maganhin et al., 2008). Assim, sua ação parece ser ampla no sistema reprodutor, podendo também atuar diretamente na fisiologia.

A melatonina é rapidamente metabolizada principalmente pelo fígado, onde é hidroxilada pela citocromo P450 monooxigenase e/ou conjugada a sulfato para formar 6-hidroxi-melatonina e 6-sulfatoxi-melatonina, respectivamente (Valenzuela et al., 2015). Este hormônio também pode ser metabolizado no encéfalo, onde é convertido a N-acetil-formilmetoxiquinurenamina que é logo degradada à N-acetil-5-metoxiurenamina. Outra via metabólica de menor contribuição e presente em vários tipos celulares é aquela em que há formação dos produtos N-acetilserotonina e 2-hidroxi-melatonina (Macchi et al., 2004; Valenzuela et al., 2015).

A melatonina tem ação abrangente e reconhecida em diversas funções biológicas, como o controle do ciclo circadiano, sistema reprodutivo (atividade ovariana, gravidez e parto) (Reiter et al., 2009; Cruz et al., 2014) neuroendocrinologia, cardiologia, neuroimunologia e anti-câncer (Tamura et al., 2012). A melatonina regula várias funções celulares. Entre estas, ressaltam-se: modulação da imunidade tipo humoral e também da

mediada por células; controle do metabolismo de glicose no tecido adiposo; atuação sobre a atividade neuronal no hipocampo; ação sobre o tônus vascular; regulação da função reprodutiva de animais que apresentam período fértil sazonal ou fotoperiódico em mamíferos (Maganhin et al., 2008; Reiter et al., 2010, Carlomagno et al., 2011) Entretanto, este hormônio afeta também a reprodução dos não fotoperiódicos, o que inclui o ser humano. Outro ponto a ser salientado é que a melatonina é produzida em maior quantidade durante a infância, diminuindo rapidamente pouco antes da puberdade e acentuadamente na velhice, levando-se a crer que possa atuar no controle do ciclo da vida, bem como no controle do crescimento e da apoptose (Maganhin et al., 2008).

No que se refere a neoplasias, encontra-se em concentrações diminuídas em mulheres com tumores proliferativos. Tem ação inibitória sobre a atividade da telomerase, enzima atuante na mitose e proliferação celular (Maganhin et al., 2008), bem como sobre o VEGF e o antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA) (Romeu et al., 2011). Há referências sobre sua ação anti-estrogênica em tumores ginecológicos, uma vez que inibe a aromatase e receptores alfa de estrogênio. Por fim, essa indolamina inibe a proliferação e poder de invasão de células no câncer de mama (Maganhin et al., 2008), demonstrando por fim sua atuação em mecanismos anti-neoplásicos.

A melatonina diminui a lesão causada pelo radical livre em diversas doenças, e também inibe a via apoptótica mitocondrial ao reduzir a expressão de Bcl-2 e a atividade da caspase-3 (Ferreira et al., 2010; Friedman et al., 2012). A melatonina tem ação anti-oxidante mais intensa que a das vitaminas C e E, uma vez que mesmo seus metabólitos também atuam na depuração de radicais livre, denominado efeito em cascata (Wang et al., 2013; Cruz et al., 2014). Além da ação direta contra radicais-livre, a melatonina também ativa enzimas anti-oxidantes, como a super-óxido dismutase, glutathionaperoxidase e catalase (Ferreira et al., 2010; Wang et al., 2013; Cruz et al., 2014). O excesso de radicais livres interage com lipídeos, proteínas e ácido nucleico, resultando em perda da integridade da membrana, alterações funcionais e estruturais de proteínas e lesão de ácido nucléico (Tamura et al., 2012; Cruz et al., 2014; figura 4). O equilíbrio entre radicais livres e anti-oxidantes no folículo ovariano parece ser fundamental para o bom funcionamento do oócito e células da granulosa (Reiter et al., 2009; Tamura et al., 2012; Cruz et al., 2014). Além disso, há pesquisas que sugerem seu benefício frente a lesão de isquemia-reperfusão (Reiter et al., 2009).

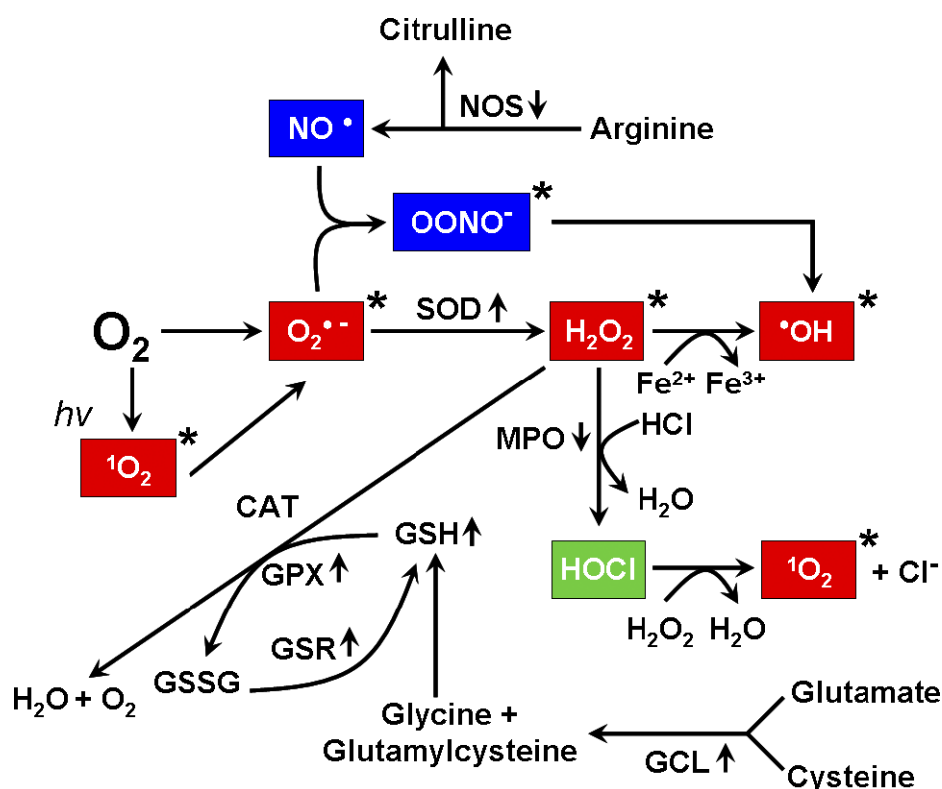


Figura 4- Radicais livres oxidativos baseados em oxigênio em vermelho; radicais livres oxidativos baseados em nitrogênio em azul. Melatonina atua diretamente como antioxidante nos radicais marcados com asterisco\* e estimula enzimas anti-oxidantes: glutaciona peroxidase (GPX), glutaciona-redutase (GSR), superóxido-dismutase (SOD); estimula a enzima glutamil-cisteína-ligase (GCL), aumentando síntese do potente anti-oxidante glutaciona (GSH); inibe enzimas pró-oxidativas óxido-nítrico-sintase (NOS) e mieloperoxidase (MPO); NO óxido nítrico; CAT catalase; O<sub>2</sub> oxigênio; <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, dioxigênio; O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, radical superóxido; GSSG glutaciona oxidada; hv energia luminosa. Adaptado de Reiter et al., 2009

A criopreservação de ovário é uma técnica promissora, mas revela limitações, entre elas o dano após descongelamento, possivelmente, devido ao acúmulo de radicais livres. Dessa forma, esta tese pretende avaliar os possíveis benefícios da melatonina adicionada ao meio de cultura de enxertos ovarianos de ratas pré-criopreservação.

## **2. Objetivos**

**2.1 Geral:** Avaliar os efeitos da melatonina na criopreservação do tecido ovariano de ratas.

### **2.2 Específicos:**

- a) Avaliação funcional por meio da retomada do ciclo estral;
- b) Avaliação da dinâmica dos folículos e estudo histomorfométrico do tecido ovariano criopreservado;
- c) Avaliação por imunistoquímica dos marcadores de proliferação, atividade hormonal e apoptose do tecido ovariano

### 3. Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP). O estudo foi realizado no Laboratório da Disciplina de Ginecologia (LIM 58) do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A amostra consistiu em 26 ratas Wistar adultas de três meses de idade (*Ratus norvegicus albinus*) com peso aproximado de 250g. Os animais foram mantidos em condições adequadas de higiene, temperatura e alimentação no laboratório, bem como submetidos a regime de luz controlado 12/12h. Foram incluídos apenas os animais que apresentaram três ciclos estrais regulares.

Os animais foram distribuídos em dois grupos de estudo (n=13 cada): Grupo 1 - controle e; Grupo 2 – tratado com melatonina. No grupo 1 (controle), a criopreservação lenta foi realizada conforme protocolo padrão com Meio M2 e DMSO (Guanasena et al.,1997), enquanto no grupo 2, o mesmo procedimento ocorreu, com a melatonina (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA) acrescentada na concentração de 0,1  $\mu$ molar no meio de cultura (Wang et al., 2013; Reiter et al., 2009), manipulada em ambiente de penumbra. Em ambos os grupos, os ovários foram criopreservados por congelamento lento e mantidos em N<sub>2</sub> líquido por 24h. Após esse período, o descongelamento foi realizado em temperatura ambiente (25°C). Os ovários de seus respectivos doadores foram reimplantados no retroperitônio, um de cada lado dos grandes vasos (veia cava inferior e aorta), sem anastomose vascular, fixados por meio de um ponto simples com fio inabsorvível (náilon 4-0). Em três animais de cada grupo foi realizado estudo histológico dos ovários imediatamente após a criopreservação e descongelamento para verificar eventuais diferenças entre os grupos, induzidas pelo processo de criopreservação.

#### 3.1 Controle de ciclo estral



Antes do início do experimento, foram coletados esfregaços vaginais diários, sempre no mesmo horário (8-10h) para caracterização do ciclo estral pela técnica de *Shorr-Harris*. Utilizaram-se apenas os animais que apresentaram ciclos estrais regulares de 4-5 dias e padronizou-se a fase diestro para os procedimentos operatórios (ooforectomia para criopreservação e eutanásia).

No 15º PO do transplante, iniciaram-se coletas de esfregaços vaginais diários, sempre no mesmo horário (8-10h) até o 30º PO, quando se efetuou eutanásia conforme os animais se encontraram na fase diestro do ciclo estral (30º ao 35º dia).

A coleta do material foi feita por meio de um esfregaço embebido em solução fisiológica, em lâmina padrão, sempre com os animais imobilizados (Junqueira et al., 2008), para posterior coloração pela técnica de *Shorr-Harris*, conforme descrição a seguir: 1) Álcool 70%; 2) Água destilada; 3) Hematoxilina de Harris – por 1 minuto e 30 segundos; 4) Água corrente; 5) Álcool amoniacal por 1 minuto; 6) Água destilada; 7) Álcool 70%; 8) Álcool 96%; 9) *Shorr* durante 8 minutos; 10) Álcool absoluto; 11) Xilol; 12) Montagem das lâminas (Damous et al., 2009a).

As lâminas foram posteriormente analisadas em microscópio de luz, em aumentos de 10 e 40 vezes. Consideraram-se as seguintes fases do ciclo estral, de acordo com a proporção de células observadas nos esfregaços: 1) Proestro: predomínio de células epiteliais nucleadas; 2) Estro: predomínio de células queratinizadas anucleadas; 3) Diestro: mesma proporção de leucócitos e células epiteliais nucleadas e queratinizadas (Marcondes et al., 2002).

### **3.2 Protocolo de anestesia e laparotomia**

Após pesagem, os animais foram anestesiados mediante administração de xilazina 15mg/kg e ketamina 60mg/kg, aplicados via intraperitoneal. O animal foi considerado em plano anestésico ao ocorrer perda dos reflexos córneo-palpebral e de retirada da pata traseira contra-lateral ao estímulo doloroso por preensão. As ratas foram acomodadas em bancada cirúrgica equipada com colchão térmico, mantido em 37°C durante todo o experimento. Os animais foram fixados com fita adesiva à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, sendo realizada tricotomia e anti-sepsia da região abdominal com álcool-iodado e

colocação de campo fenestrado. Realizou-se laparotomia na linha mediana, a partir do segundo par de glândulas mamárias, no sentido crânio-caudal, com extensão de 6cm. Aplicaram-se 2 pontos com fio de náilon, um em cada lado da parede abdominal, que foram fixados com fita adesiva à bancada cirúrgica. Esses procedimentos foram efetuados com auxílio de instrumentos e microscópio cirúrgico de aumento de 16 vezes. A síntese da parede abdominal dos animais foi realizada em dois planos: peritônio-músculo-aponeurótico e pele, ambos com fio monofilamentar de náilon 5-0.

### **3.3 Protocolo de ooforectomia**

Após a abertura da cavidade abdomino-pélvica, os ovários foram identificados, seus pedículos clampeados e imediatamente ligados com fio de náilon 4-0 para identificação do sítio. Em seguida, os ovários foram removidos bilateralmente na junção dos cornos uterinos seguida de revisão da hemostasia. Em sequência, os ovários foram lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e ressecados os oviductos com os fragmentos de gordura periovarianos.

### **3.4 Protocolo de criopreservação**

A criopreservação dos ovários foi realizada conforme protocolo a seguir: o ovário íntegro foi imediatamente congelado em freezer de congelação lenta. Os ovários foram colocados em criotubos de 1,2 mL com 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 1,4M como crioprotetor em solução tampão TL-HEPES e mantidos em temperatura ambiente por cinco minutos. Os criotubos foram colocados em freezer com taxas programáveis (CL-8800, *Cryogenesis software, Freezer Control*) e congelados 1°C/minuto de 25 a 10°C, então de 0,5°C/minuto até -7°C, e finalmente mantidos em -7°C por 5 minutos. O tecido foi congelado em -55°C a taxas de 0,5°C/minuto, colocados em nitrogênio líquido a -196°C, e mantidos por 24h (Guanasena et al., 1997).

Para descongelamento, o criotubo foi mantido em temperatura ambiente até que todo o gelo estivesse derretido (15 a 20 minutos) e, em seguida, o tecido foi transferido para 5 mL de TL-HEPES 5 mL em temperatura ambiente por 10 minutos, agitando suavemente para promover o efluxo de DMSO do tecido. O tecido foi mantido em TL-HEPES a 37°C até o transplante (Guanasena et al., 1997).

### **3.5 Protocolo de transplante de ovário**

Após o descongelamento, os ovários íntegros foram implantados no retroperitônio por meio de um ponto com fio de náilon 4-0, próximo aos grandes vasos (aorta e veia cava inferior), um de cada lado no músculo psoas, sem anastomose vascular.

### **3.6 Coleta e análise do material**

Uma vez anestesiados, os animais tiveram a pele incisada sobre a cicatriz anterior e, após localização dos enxertos ovarianos, estes foram ressecados e divididos ao meio para as respectivas análises. Após a coleta das peças, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose letal dos anestésicos utilizados.

Realizaram-se as seguintes análises: 1) histomorfológica: histológica; 2) histomorfométrica: avaliação dos folículos (imaturos e maduros), de corpos lúteos; 3) análise de fibrose no estroma ovariano (quantificação de fibras de colágeno por Picrosirius); 4) imunohistoquímica: avaliação da proliferação celular (Ki-67), apoptose (caspase-3 clivada, TUNEL), neoangiogênese (fator VIII – von Willebrand) e expressão hormonal (receptor para estrogênio e progesterona).

Para avaliação do desenvolvimento folicular, os folículos ovarianos foram contados e classificados em dois grupos: folículos em desenvolvimento, independente do estágio a que pertencessem, e folículos atresícos. Os folículos em desenvolvimento foram ainda classificados, de acordo com o grau de maturidade, como: folículos imaturos (incluindo primordial, primário e secundário) e folículos maduros (com único antro volumoso), além

dos corpos lúteos. Para contagem, foram considerados folículos (tanto os viáveis como atrésicos) e corpos lúteos (tanto os regulares como os degenerados) (Junqueira et al., 2008).

Consideraram-se folículos atrésicos aqueles que apresentaram zona pelúcida enrugada e células foliculares desarranjadas e com núcleos picnóticos, independentemente do seu tamanho. Os folículos viáveis foram aqueles que não apresentaram alterações degenerativas e foram classificados em: folículo primordial, aquele que apresentar apenas oócito e uma camada de células indiferenciadas; folículo primário, com oócito e desenvolvimento de camada granulosa com células cilíndricas; folículo em desenvolvimento: antral (com lúmen) e não-antral ou secundário (sem lúmen). O folículo terciário ou maduro foi considerado como aquele que apresentou oócito com antro volumoso (Junqueira et al., 2008).

Corpo lúteo regular foi o que apresentou células lúteas integras, com núcleo volumoso e rodeadas por capilares sanguíneos. Já o corpo lúteo em degeneração foi aquele que apresentou entre suas células infiltrado inflamatório de leucócitos e macrófagos, em especial neutrófilos. O infiltrado inflamatório foi considerado intenso quando o número de leucócitos superou o número de células presentes no tecido normal (Junqueira et al., 2008).

A captura e as medições foram realizadas com auxílio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Carl Zeiss), adaptado a uma câmera de alta resolução (AxioCam MRC da Carl Zeiss) e monitor de vídeo colorido. As medidas foram obtidas utilizando-se o programa de análise de imagens AxionVisionREL 4.6 da Carl Zeiss. As contagens foram realizadas sempre em quatro campos por animal em aumento de 10x.

Para avaliação de fibrose, as lâminas foram coradas por Picrosirius tomando-se medidas em oito campos por animal no estroma ovariano, com magnificação de 400 vezes, e os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (unidade/mm<sup>2</sup>).

Lâminas com cortes dos enxertos ovarianos foram coradas por imunistoquímica para medir angiogênese, analisando-se expressão para fator de von Willebrand para células endoteliais (AB6994, 1:100, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA); proliferação por meio de expressão de Ki-67 (M724001-2, 1:100, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, EUA); apoptose avaliando-se expressão de caspase-3 clivada (SANT-SC-1226, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e ensaio TUNEL

(terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling, Roche, Indianapolis, IN, EUA). Expressão de receptores hormonais para estrogênio (E1644, 1:50, SpringBioscience Corporation, Pleasanton, CA, EUA) e progesterona (AB51896, 1:30, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) também foram estudados.

As lâminas foram desparafinadas com xilol quente (65°C) por 15 minutos e 3 banhos com xilol frio. Em seguida foram lavadas com dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95%, um banho de álcool 70% e hidratadas em água corrente. Também foi realizado um banho de 3 minutos em ácido fórmico, sendo em seguida novamente lavadas em água corrente e ultrapura. Seguiu-se a recuperação antigênica realizada através de alta temperatura em Panela Pascal, com tampão citrato pH 6. A temperatura e o tempo de recuperação foram de 125°C e 1 minuto respectivamente. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e ultrapura. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volume 3% e metanol volume a volume, por 2 vezes de 10 minutos cada. Na sequência, procedeu-se a lavagem em água corrente, ultrapura e PBS. Após a realização dos bloqueios, os anticorpos primários foram diluídos em tampão de diluição e aplicados sobre as amostras e controles positivos. Para o controle negativo foi utilizado apenas o diluente. Em seguida as lâminas foram incubadas a 4°C. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e utilizado como anticorpo secundário o Kit VectastainABC biotinizado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

Todas as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB) líquido, por 5 minutos, (nesta etapa foi preciso acompanhar a revelação no microscópio). As lâminas foram lavadas de forma abundante em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha).

Para o ensaio TUNEL, as lâminas foram desparafinadas em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada (um a 60°C e dois a temperatura ambiente), reidratadas em gradiente de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e incubadas em proteinase K por 15 a 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem por 2 banhos de 3 minutos cada em tampão fosfato (PBS), foram incubadas em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3% e em metanol por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir foram lavadas 2 vezes em PBS e, após secagem da área em torno da amostra, foi pipetado 50µL da mistura de reação TUNEL

(5 $\mu$ L da solução de enzima, mais 45 $\mu$ l da solução de marcador). Em seguida, foram incubadas as amostras em câmara úmida a 37°C por 60 minutos e então lavadas 3 vezes em PBS. Secou-se a área em torno da amostra, para pipetar 50 $\mu$ L do conversor de peroxidase no qual a fluoresceína incorporada é detectada por um anticorpo anti-fluoresceína obtido em cabras, conjugado com soro de cavalo através da peroxidase. Em seguida, as amostras foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e lavadas 3 vezes em PBS, por 3 minutos cada. A reação foi revelada através de diaminobenzidina (DAB) (0,2% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,05% em PBS). Em seguida foram lavadas 3 vezes em PBS por 3 minutos cada. Na sequência as amostras foram contra coradas por verde de Metila, após lavagem em água destilada, desidratação por etanol e banho em xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount.

Imagens dos cortes foram obtidas usando-se programa de análise de imagens e morfometria (Leica DM2500), e quantificações foram realizadas com o programa LeicaQWin V3. A coloração vermelho-marrom do citoplasma e núcleo das células da granulosa e folículos antrais (para apoptose e Ki-67) ou estroma (para fibrose e expressão de células endoteliais) foi considerada como expressão positiva e qualquer outra cor, como negativa. Receptores hormonais foram avaliados tanto no estroma como nas células foliculares. A avaliação foi realizada em oito diferentes campos por animal com aumento de 400 vezes, e os resultados foram expressos como porcentagem da área positiva (unidade/mm<sup>2</sup>). As leituras foram realizadas por dois investigadores independentes e cegos para identificação dos grupos de estudo.

### **3.7 Análise estatística**

Após obtenção dos dados em cada grupo de animais, os resultados foram submetidos a análise estatística, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas, utilizando-se testes T não-pareados, e fixando-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

### 4.1 Enxertos de ovários congelados e descongelados

Três animais de cada grupo foram analisados logo após o processo de congelamento e descongelamento. Comparando-se os grupos controle (G1) e melatonina (G2), a avaliação histológica de folículos imaturos (G1  $10,33 \pm 2,90$  G2  $4,66 \pm 0,88$   $p=0,13$ ), folículos maduros (G1  $11,00 \pm 3,51$  G2  $5,33 \pm 1,20$   $p=0,20$ ), corpos lúteos (G1  $10,00 \pm 3,46$  G2  $10,33 \pm 4,70$   $p=0,95$ ) e vasos sanguíneos (G1  $4,66 \pm 1,45$  G2  $2,66 \pm 1,76$   $p=0,43$ ) não mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 1, gráfico 1). A avaliação imunohistoquímica do grupo congelado e descongelado não mostrou diferença estatisticamente significativa para a atividade de caspase (estroma G1  $1,61 \pm 0,32$  G2  $1,95 \pm 0,33$   $p=0,48$ ; folículos G1  $3,39 \pm 0,75$  G2  $2,37 \pm 0,33$   $p=0,18$ ) e TUNEL (estroma G1  $0,05 \pm 0,01$  G2  $0,21 \pm 0,09$   $p=0,05$ ; folículos G1  $0,04 \pm 0,01$  G2  $0,07 \pm 0,01$   $p=0,26$ ) entre controle e melatonina (tabela 2, gráfico 2).

Tabela 1- análise histológica de contagem de folículos, corpos lúteos e vasos sanguíneos (média±desvio padrão) comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo)

	<b>Controle</b>	<b>Melatonina</b>	<b>p</b>
<b>Folículos imaturos</b>	$10,33 \pm 2,90$	$4,66 \pm 0,88$	0,13
<b>Folículos maduros</b>	$11,00 \pm 3,51$	$5,33 \pm 1,20$	0,20
<b>Corpos lúteos</b>	$10,00 \pm 3,46$	$10,33 \pm 4,70$	0,95
<b>Vasos sanguíneos</b>	$4,66 \pm 1,45$	$2,66 \pm 1,76$	0,43

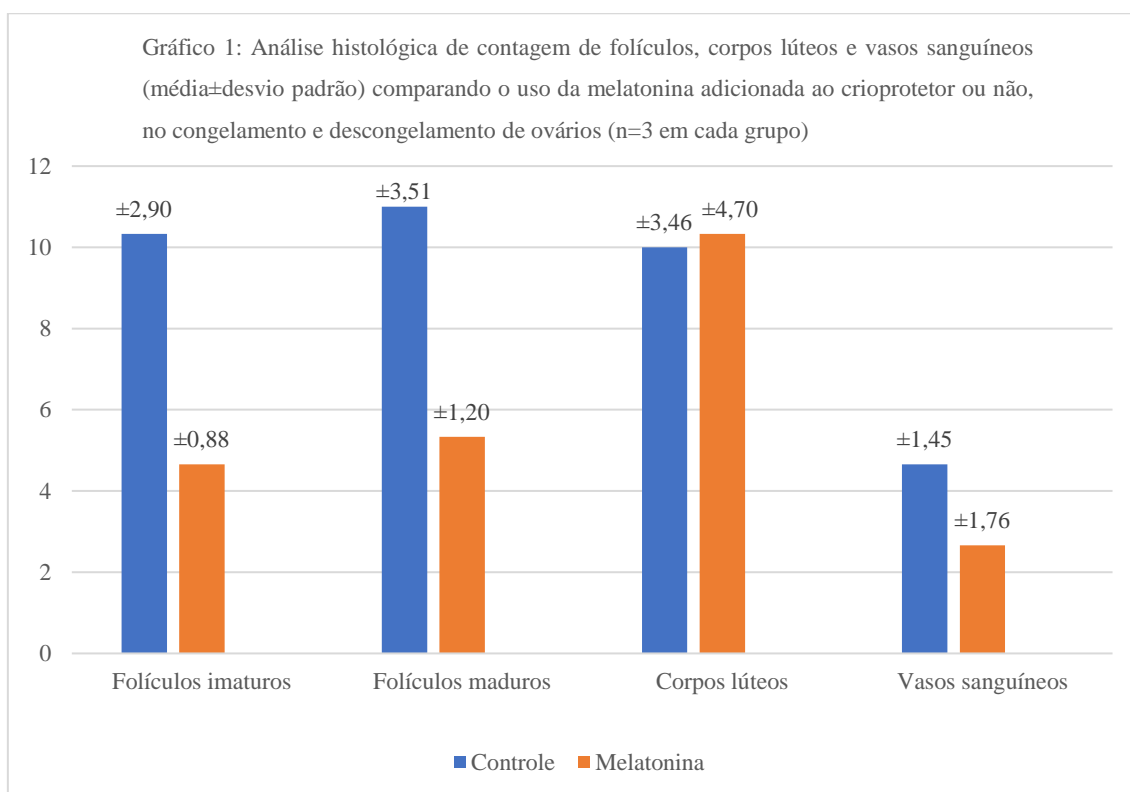
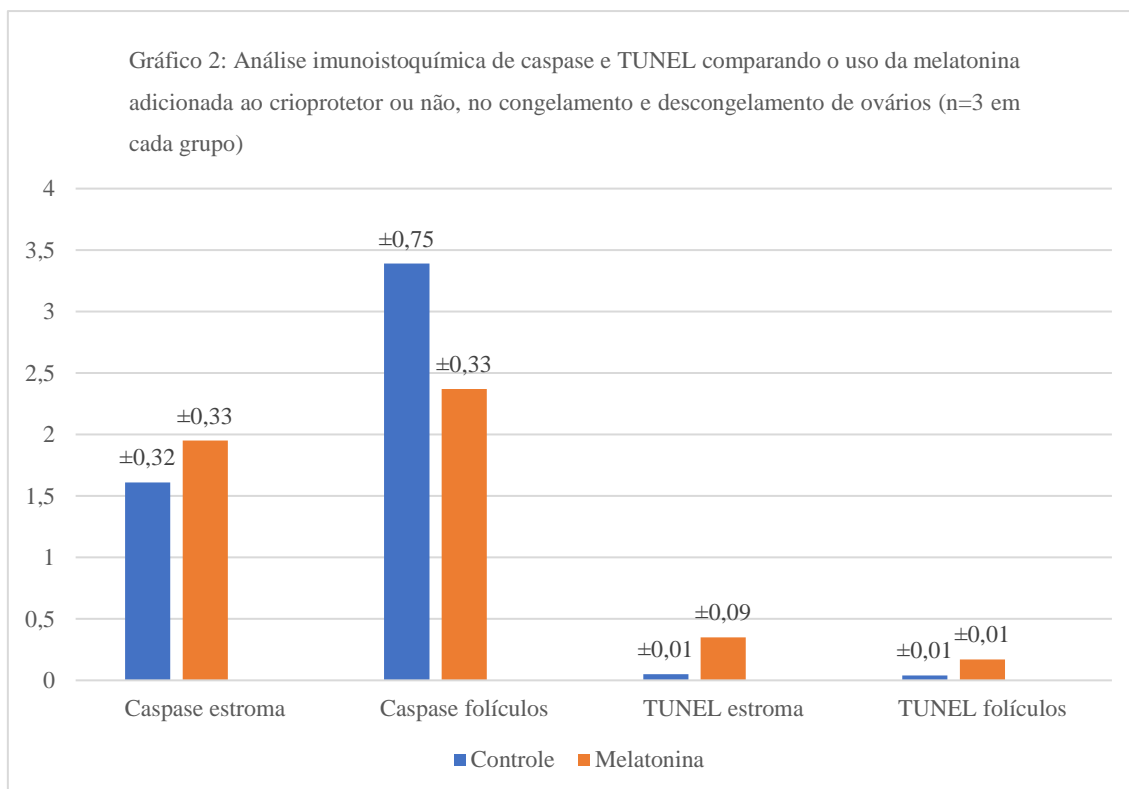


Tabela 2- análise imunohistoquímica de caspase e TUNEL comparando o uso da melatonina adicionada ao crioprotetor ou não, no congelamento e descongelamento de ovários (n=3 em cada grupo)

	Controle	Melatonina	p
<b>Caspase estroma</b>	1,61 ± 0,32	1,95 ± 0,33	0,48
<b>Caspase folículos</b>	3,39 ± 0,75	2,37 ± 0,33	0,18
<b>TUNEL estroma</b>	0,05 ± 0,01	0,21 ± 0,09	0,05
<b>TUNEL folículos</b>	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,26





## 4.2 Enxertos de ovários submetidos a transplante

### 4.2.1 Ciclo estral

Em todos os 20 animais transplantados, caracterizou-se a fase estral do ciclo estral. O grupo 2 (G2- ratas submetidas ao transplante com uso de melatonina) apresentou reinício precoce do ciclo estral em dias pós-operatórios comparado com o grupo 1 (G1- controle). A análise pelo teste “T” de *Student* não pareado revelou diferença significativa entre os grupos (controle  $20,75 \pm 1,89$  dias versus melatonina  $16,22 \pm 0,50$  dias;  $p < 0,05$ ) para o ressurgimento do ciclo estral.

### 4.2.2 Macroscopia e histomorfometria

Ambos grupos revelaram enxertos facilmente identificáveis com aspecto macroscópico preservado. Na histologia, observaram-se folículos ovarianos viáveis em diversos estágios de desenvolvimento e corpos lúteos intactos. Os dados da histomorfometria estão resumidos na Tabela 3. O grupo 2 (melatonina) teve maior número de folículos ovarianos maduros ( $8,75 \pm 2,02$ ) quando comparado ao grupo 1 (controle,  $3,01 \pm 0,91$ ;  $p < 0,05$ ). O grupo melatonina, em relação ao controle, não mostrou diferença significativa no número de folículos ovarianos imaturos (G1 -  $7,20 \pm 3,23$ , G2 -  $6,00 \pm 2,55$ ;  $p = 0,66$ ) e nos corpos lúteos (G1 -  $7,86 \pm 1,71$ ; G2 -  $5,22 \pm 1,05$ ;  $p = 0,34$ ). Contagem de vasos sanguíneos (G1  $20,13 \pm 3,66$  G2  $18,63 \pm 3,65$ ;  $p = 0,99$ ) também não mostrou diferença relevante (tabela 3).

Tabela 3 – densidade de folículos, corpos lúteos e vasos sanguíneos (média±desvio padrão) comparando adição da melatonina ao crioprotetor ou não, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)

	<b>Controle</b>	<b>Melatonina</b>	<b>p</b>
<b>Folículos imaturos</b>	$7,20 \pm 3,23$	$6,00 \pm 2,55$	0,66
<b>Folículos maduros*</b>	$3,01 \pm 0,91$	$8,75 \pm 2,02$	0,04
<b>Corpos lúteos</b>	$7,86 \pm 1,71$	$5,22 \pm 1,05$	0,34
<b>Vasos sanguíneos</b>	$20,13 \pm 3,66$	$18,63 \pm 3,65$	0,99

\*teste T  $p < 0,05$

#### 4.2.3 Imunoistoquímica

A Tabela 4 resume os resultados da imunoistoquímica nos ovários dos dois grupos estudados. As Figuras de 5 a 11 mostram imagens representativas das reações imunoistoquímicas entre os dois grupos. O emprego de melatonina, em relação ao controle, promoveu aumento em: colágeno tipo I (G2 -  $8,52 \pm 1,04$  versus G1 -  $5,75 \pm 0,52$ ;  $p = 0,02$ ), células endoteliais (fator de von Willebrand) (G2 -  $3,20 \pm 0,38$  versus G1 -  $1,69 \pm 0,28$ ;  $p = 0,002$ ), proliferação celular (Ki-67) em folículos (G2 -  $4,08 \pm 0,55$

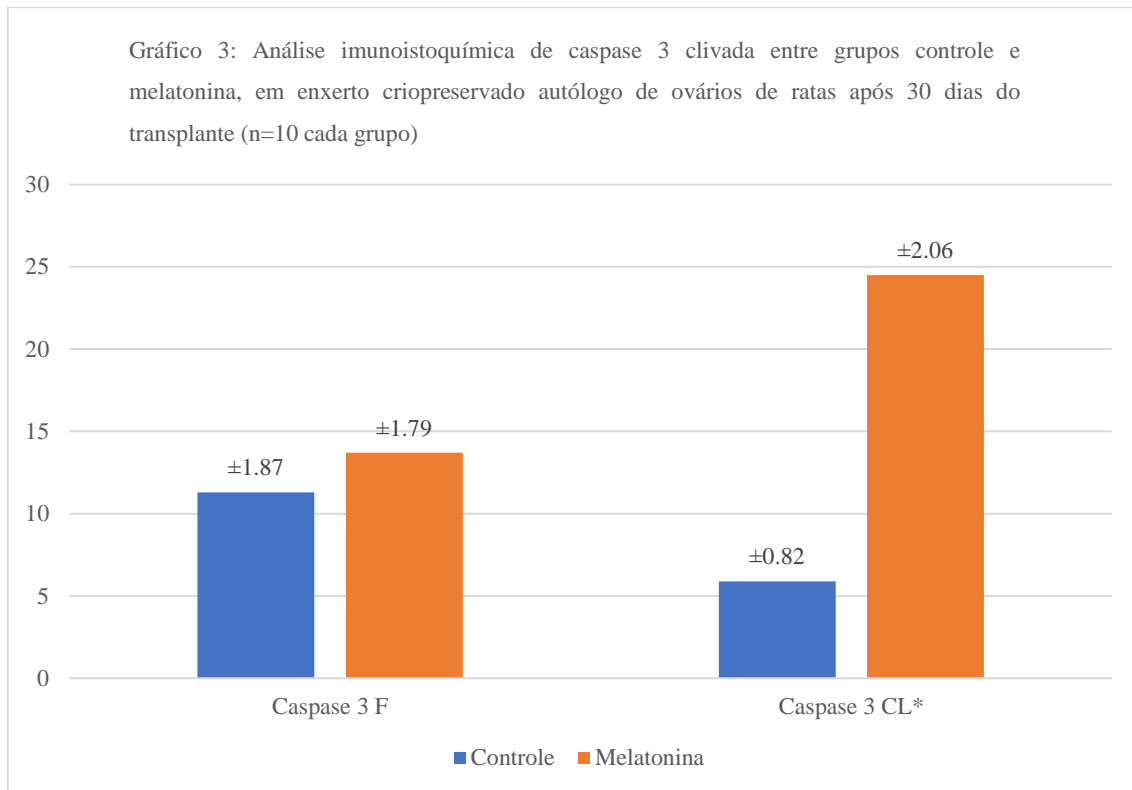
versus G1 -  $1,46 \pm 0,29$ ;  $p=0,002$ ) e corpos lúteos (G2 -  $5,27 \pm 0,54$  versus G1 -  $1,67 \pm 0,33$ ;  $p=0,001$ ), receptores de estrogênio tanto em folículos (G2 -  $5,37 \pm 0,73$  versus G1 -  $2,41 \pm 0,93$ ;  $p=0,03$ ) como corpos lúteos (G2 -  $6,43 \pm 0,85$  versus G1 -  $2,25 \pm 0,38$ ;  $p<0,001$ ) e apoptose por caspase em corpos lúteos (G2 -  $24,50 \pm 2,06$  versus G1 -  $5,88 \pm 0,82$ ;  $p<0,0001$ ).

O grupo melatonina revelou redução, comparado com o controle, em colágeno tipo III (G2  $1,49 \pm 0,15$  versus G1 -  $3,53 \pm 0,28$ ;  $p<0,001$ ) e apoptose por TUNEL em folículos (G2 -  $0,04 \pm 0,02$  versus G1 -  $0,40 \pm 0,14$ ;  $p<0,001$ ) e nos corpos lúteos (G2 -  $0,10 \pm 0,03$  versus G1 -  $1,58 \pm 0,23$ ;  $p<0,001$ ). O grupo melatonina, comparado com o controle, não mostrou diferença estatisticamente significativa na expressão da caspase 3 clivada em folículos (G2 -  $13,70 \pm 1,79$  versus G1 -  $11,30 \pm 1,87$ ;  $p=0,38$ ), nem em receptores de progesterona em folículos (G2 -  $4,65 \pm 1,13$  versus  $4,26 \pm 0,54$ ;  $p=0,77$ ) ou nos corpos lúteos (G2 -  $13,47 \pm 1,72$  versus G1 -  $16,62 \pm 1,07$ ;  $p=0,14$ ).

Tabela 4 – análise imunoistoquímica de caspase 3 clivada, TUNEL, ki-67, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, fator de von Willebrand e colágenos tipo I e III entre grupos controle e melatonina em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)

	<b>Controle</b>	<b>Melatonina</b>	<b>P</b>
<b>Caspase 3 clivada F</b>	$11,30 \pm 1,87$	$13,70 \pm 1,79$	0,38
<b>Caspase 3 clivada CL</b>	$5,88 \pm 0,82$	$24,50 \pm 2,06$	<0,001*
<b>TUNEL F</b>	$0,40 \pm 0,14$	$0,04 \pm 0,02$	<0,001*
<b>TUNEL CL</b>	$1,58 \pm 0,23$	$0,10 \pm 0,03$	<0,001*
<b>Ki-67 F</b>	$1,46 \pm 0,29$	$4,09 \pm 0,55$	0,002*
<b>Ki-67 CL</b>	$1,67 \pm 0,33$	$5,27 \pm 0,54$	<0,001*
<b>Receptor estrogênio F</b>	$2,41 \pm 0,93$	$5,37 \pm 0,73$	0,02*
<b>Receptor estrogênio CL</b>	$2,25 \pm 0,38$	$6,43 \pm 0,85$	<0,001*
<b>Receptor progesterona F</b>	$4,26 \pm 0,53$	$4,65 \pm 1,13$	0,77
<b>Receptor progesterona CL</b>	$16,62 \pm 1,07$	$13,47 \pm 1,72$	0,14
<b>Fator von Willebrand</b>	$1,69 \pm 0,28$	$3,19 \pm 0,38$	0,003*
<b>Colágeno tipo I</b>	$5,75 \pm 0,52$	$8,52 \pm 1,04$	0,03*
<b>Colágeno tipo III</b>	$3,53 \pm 0,28$	$1,49 \pm 0,15$	<0,001*

\*  $p < 0,05$ ; F = folículo; CL = corpo lúteo



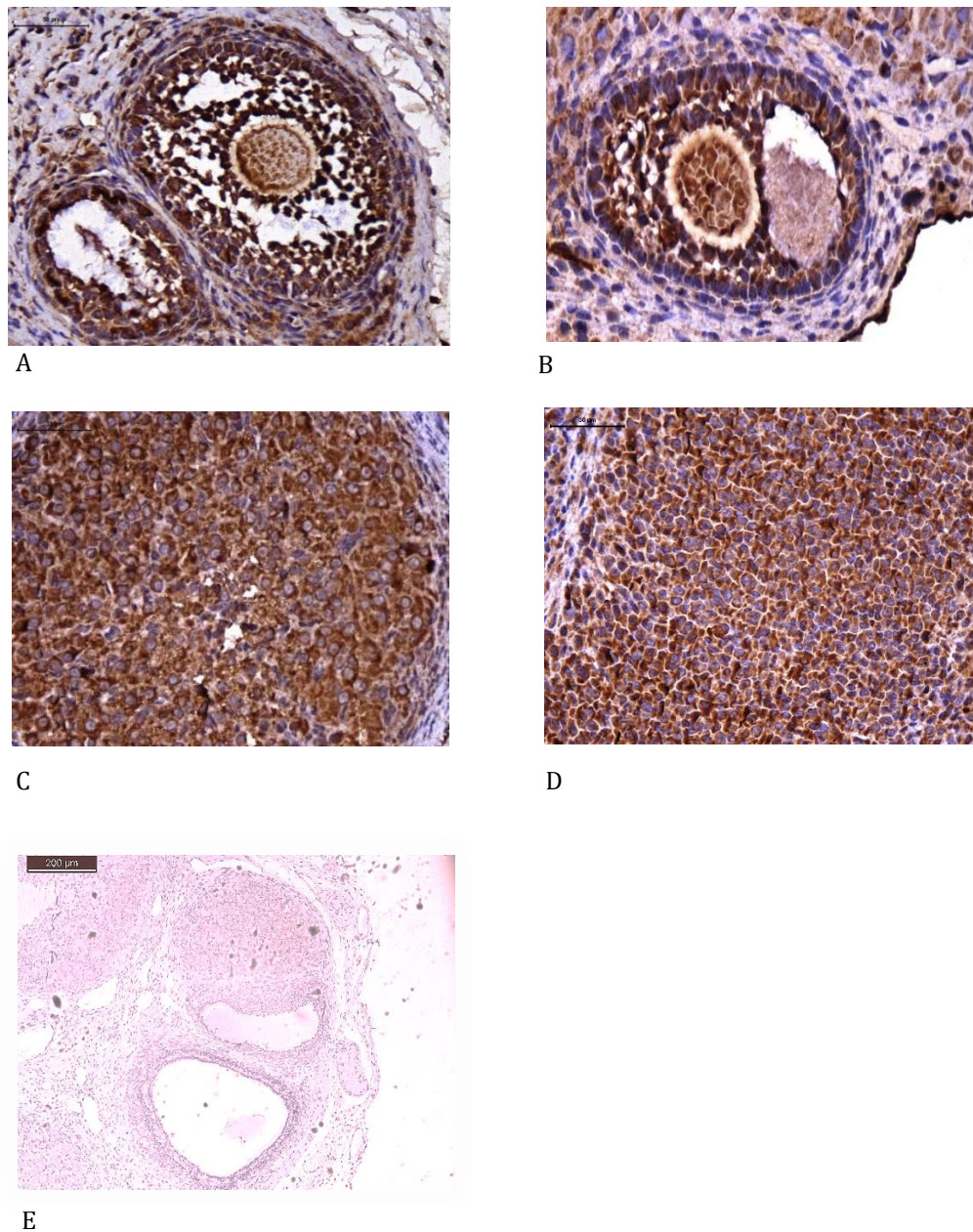
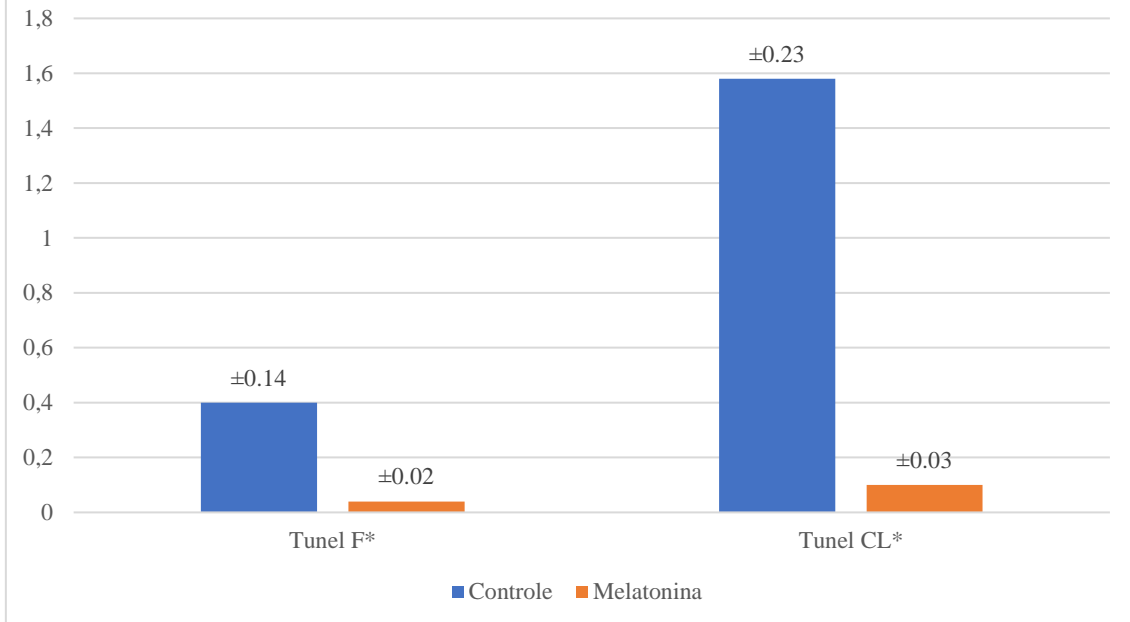


Figura 5 – Reação de imunistoquímica da caspase 3 clivada em folículos ovarianos (A, B) e nos corpos lúteos (C, D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x

Gráfico 4: Análise imunoistoquímica de TUNEL entre grupos controle e melatonina, em enxerto criopreservado autólogo de ovários de ratas após 30 dias do transplante (n=10 cada grupo)



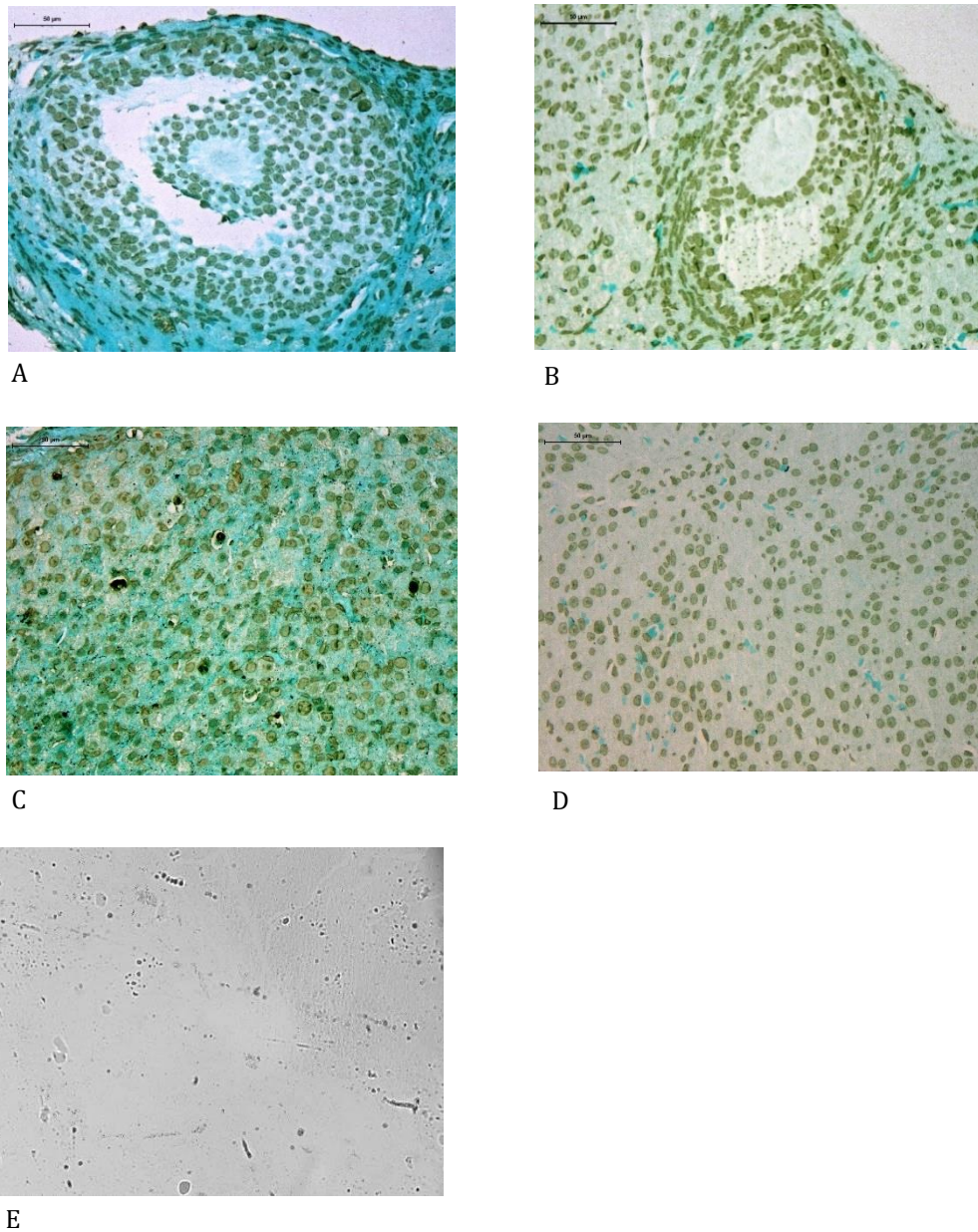
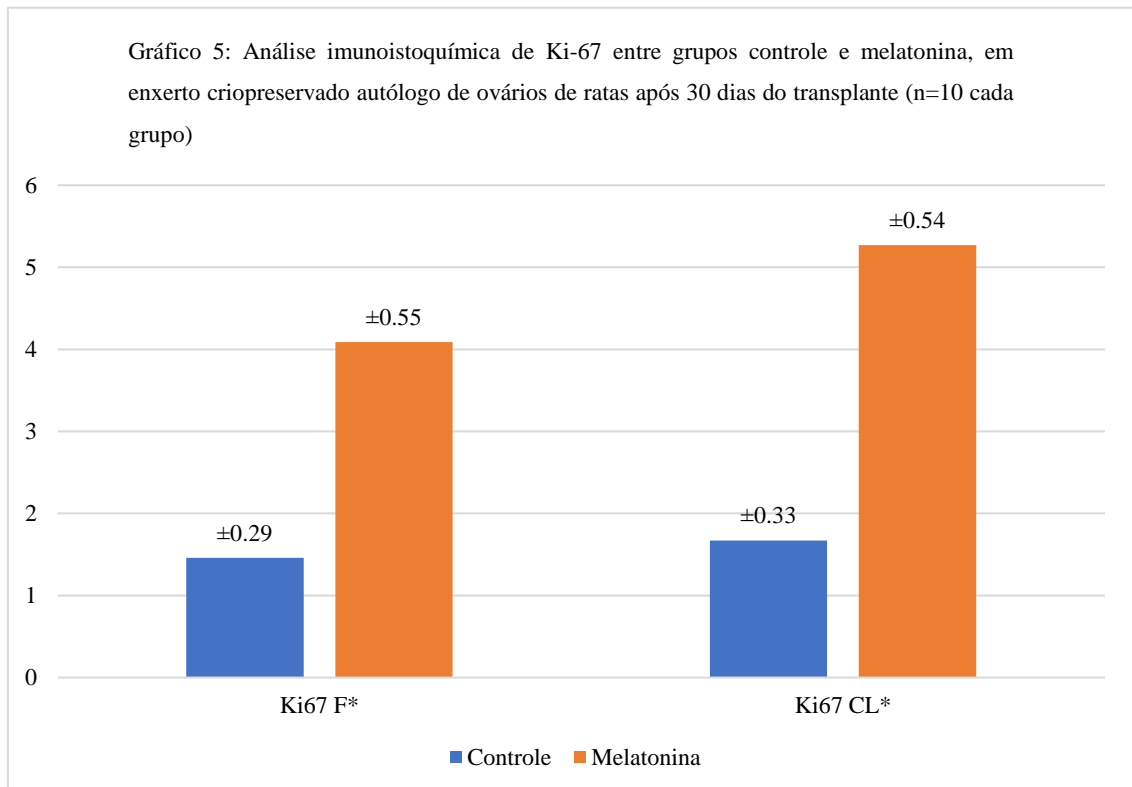


Figura 6 – Reação de imunistoquímica de TUNEL em folículos ovarianos (A e B) e nos corpos lúteos (C e D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x





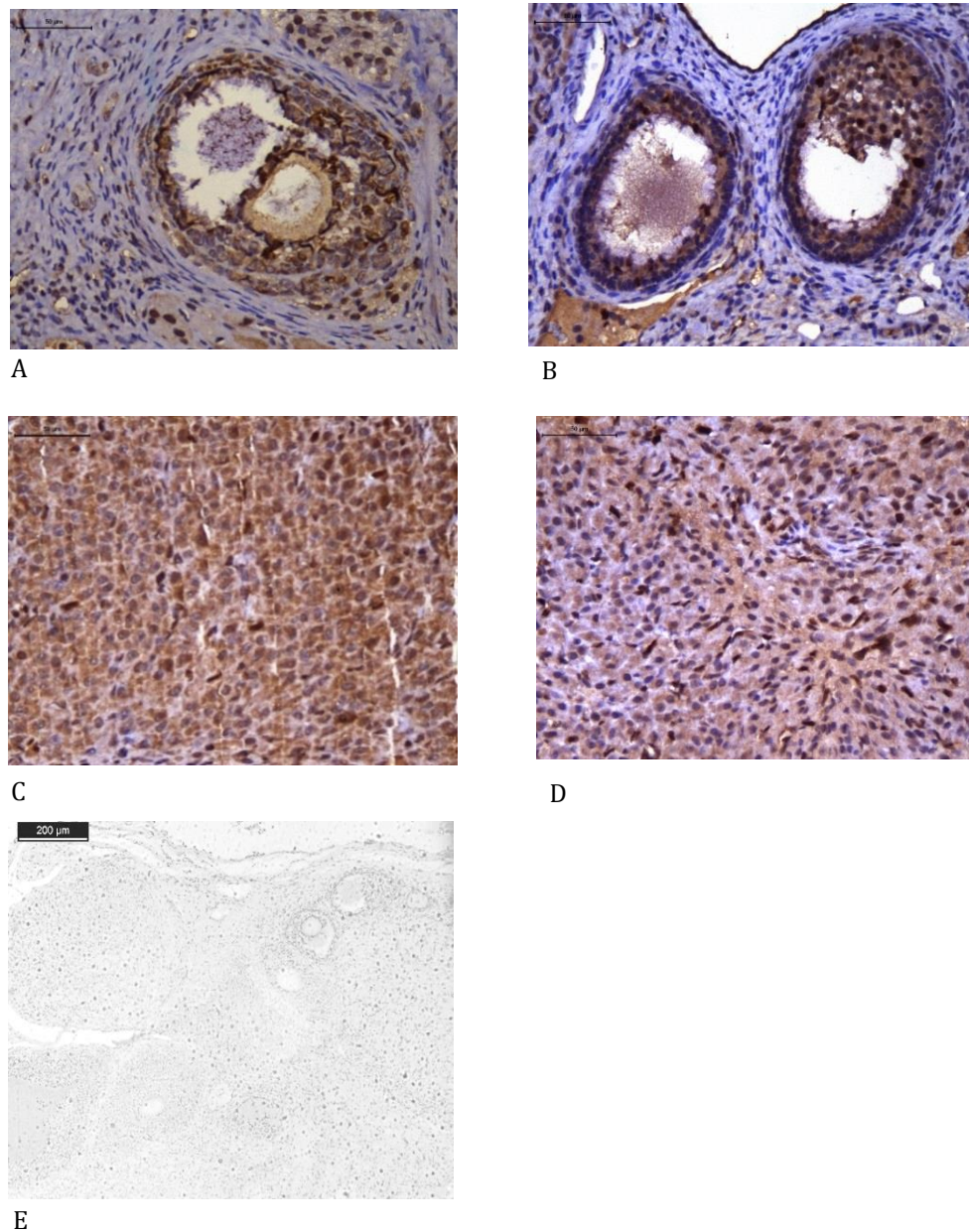
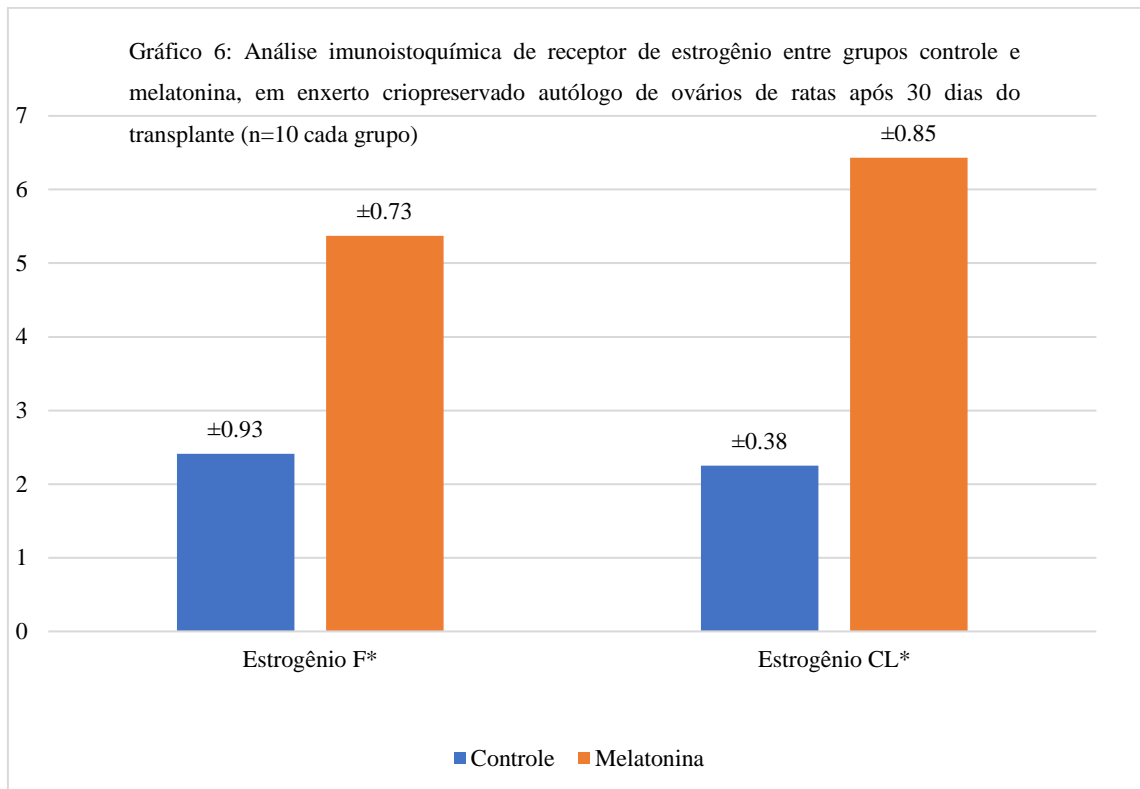


Figura 7 – Reação de imunohistoquímica de Ki-67 em folículos ovarianos (A e B) e nos corpos lúteos (C e D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x



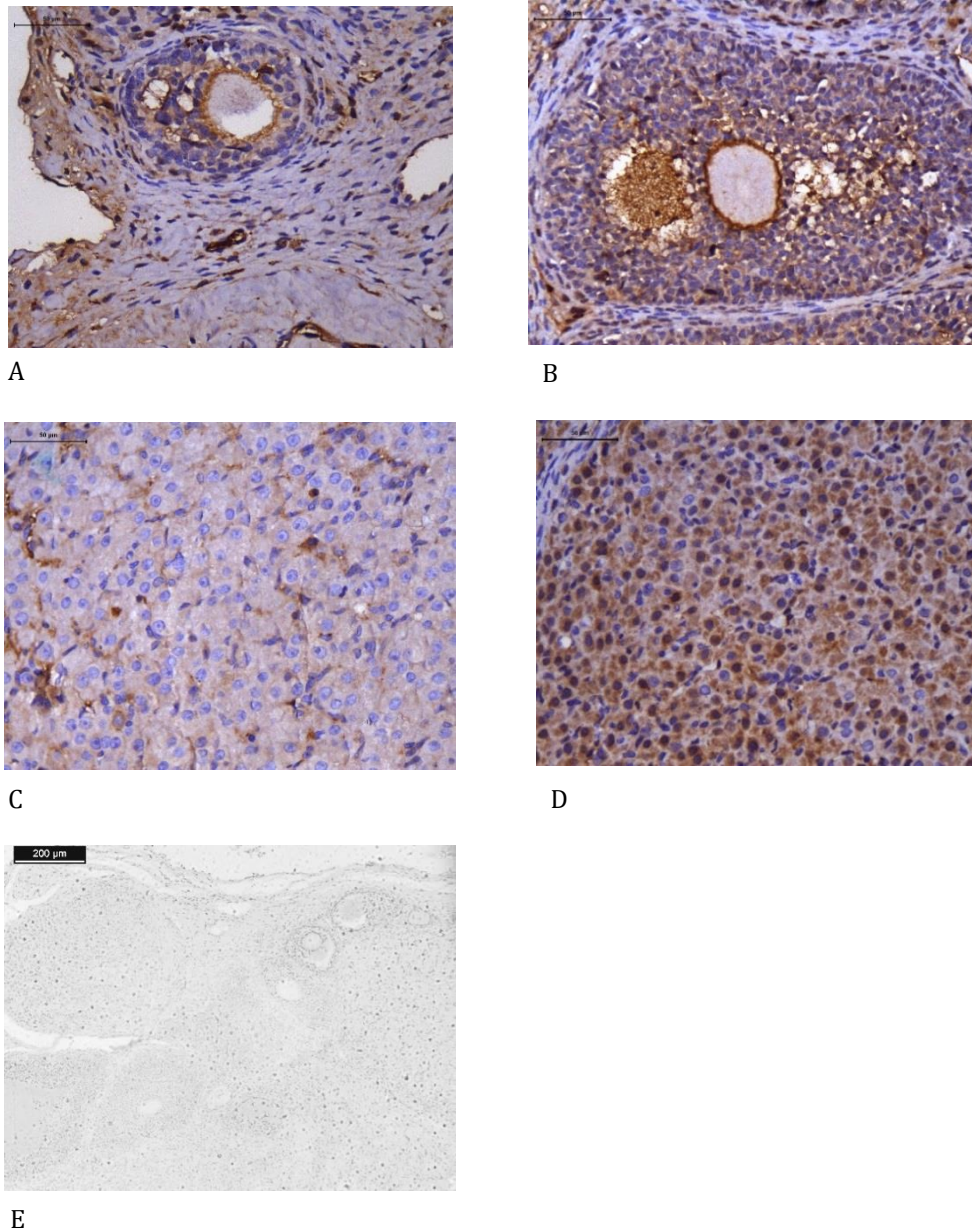
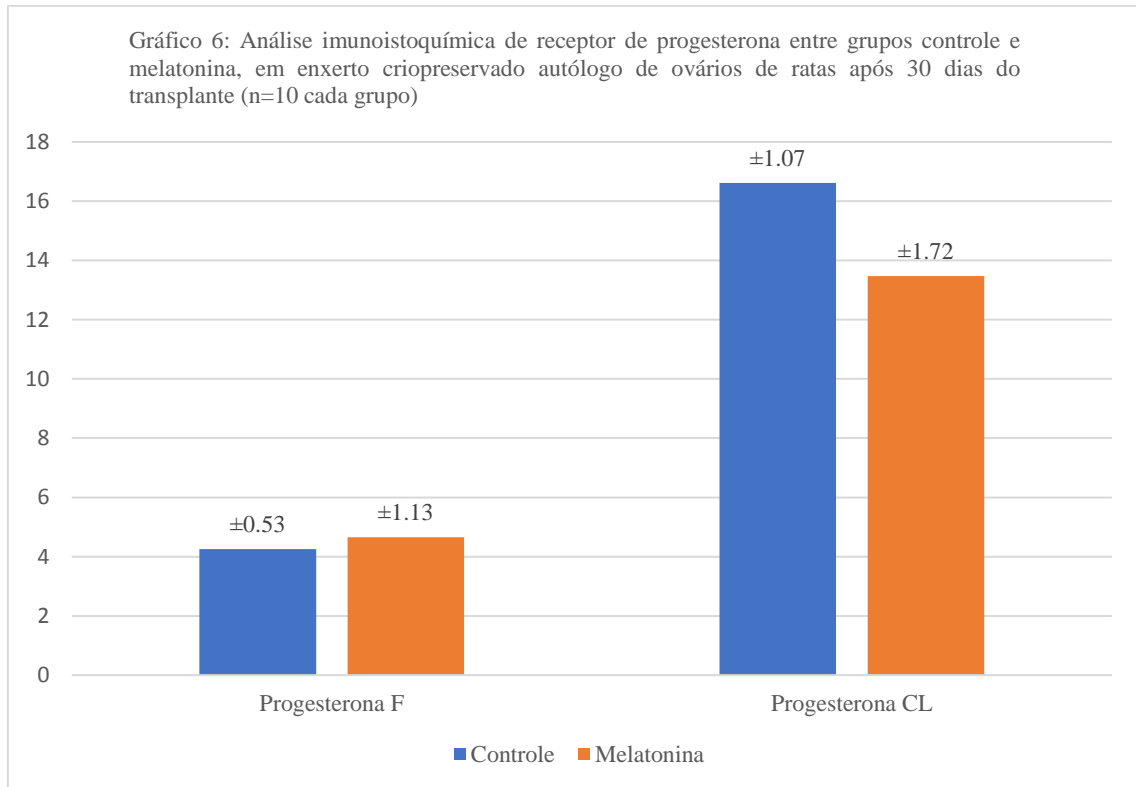
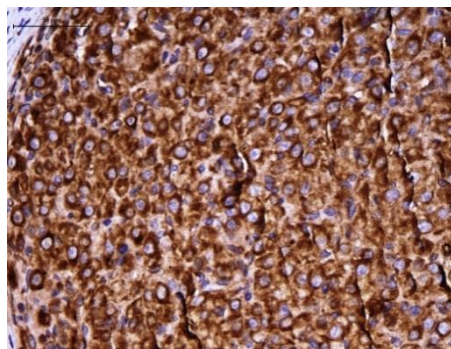
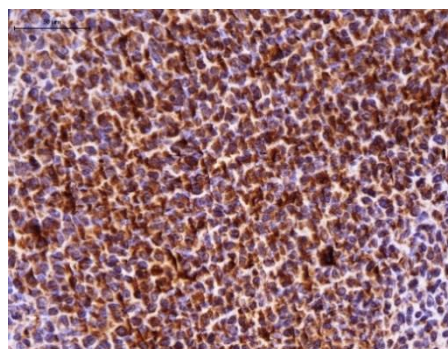


Figura 8 – Reação de imunistoquímica de receptor de estrogênio em folículos ovarianos (A e B) e nos corpos lúteos (C e D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x

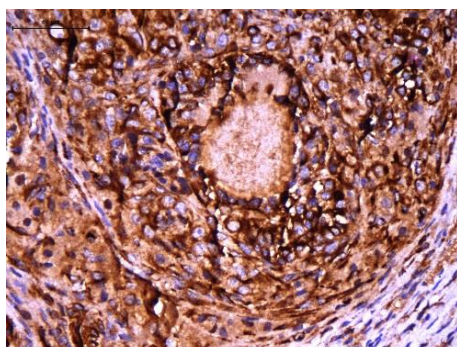




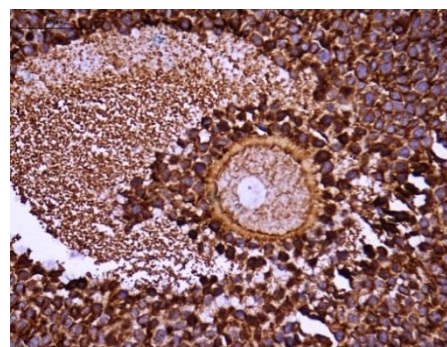
A



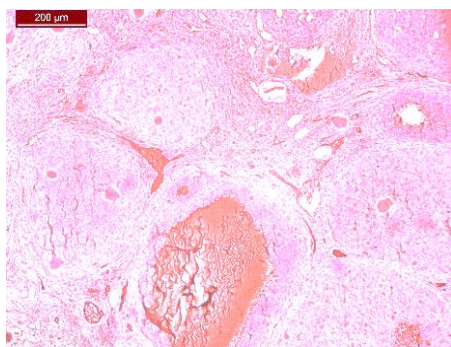
B



C

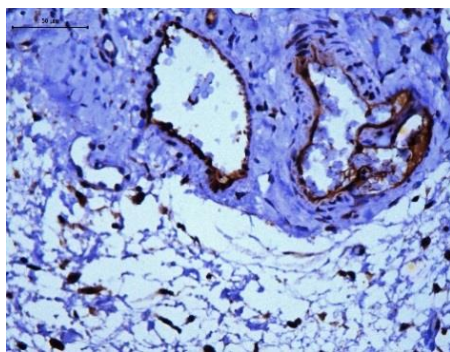
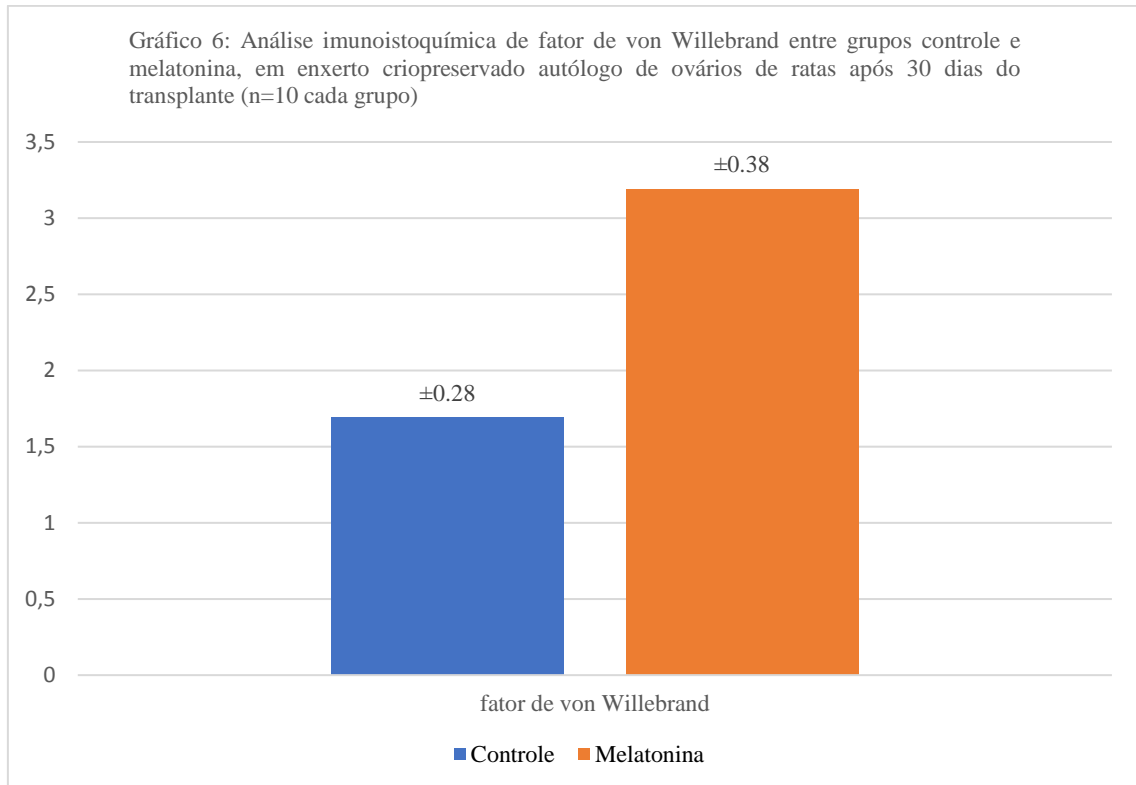


D

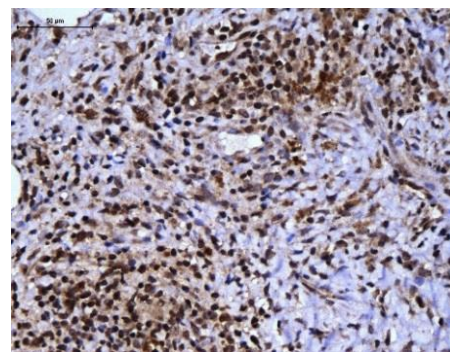


E

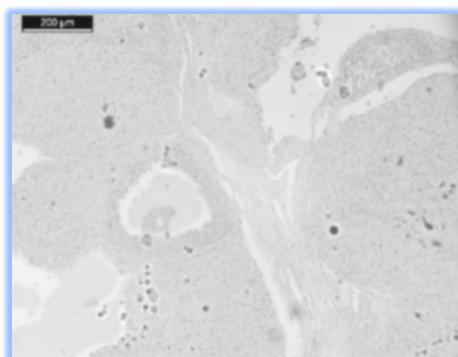
Figura 9 – Reação de imunohistoquímica de receptor de progesterona em folículos ovarianos (A e B) e nos corpos lúteos (C e D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando folículo ovariano; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando folículo ovariano; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle, mostrando corpo lúteo; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina, mostrando corpo lúteo; E – corte histológico de controle negativo, 100x



A

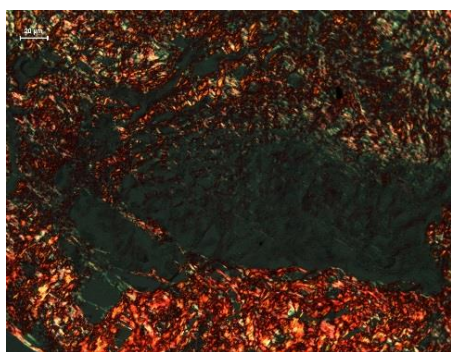
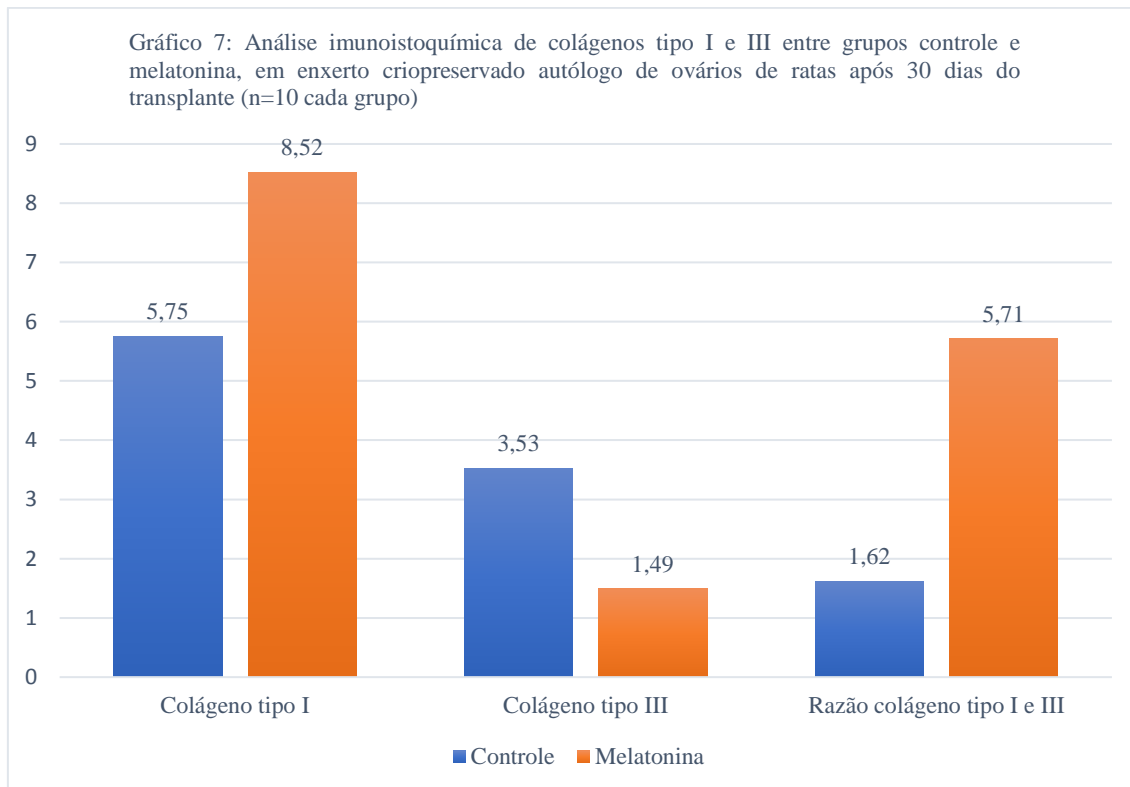


B

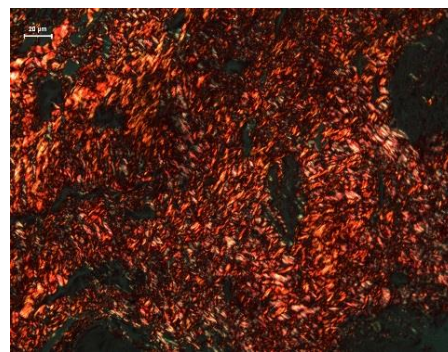


C

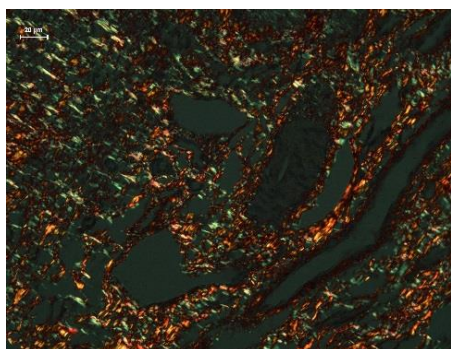
Figura 10 – Reação de imunoistoquímica de fator de von Willebrand (A e B) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina; C – corte histológico de controle negativo, 100x



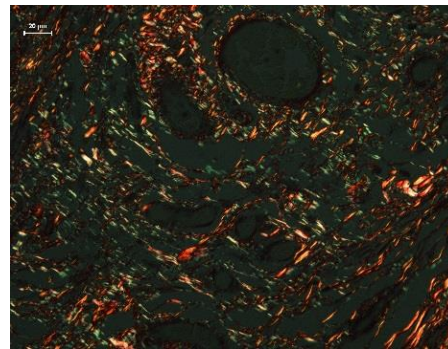
A



B



C



D

Figura 11 – Reação de Picrosirius para colágeno tipo I (A e B), e colágeno tipo III (C e D) 400x. A – corte histológico de ovário de rata do grupo controle; B - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina; C – corte histológico de ovário de rata do grupo controle; D - corte histológico de ovário de rata do grupo melatonina

## 5. Discussão

O transplante de ovário é uma das principais opções para preservar a fertilidade das pacientes em tratamento não somente de câncer, mas também de doenças benignas, como lúpus eritematoso sistêmico (Chehab et al., 2019), que pode exigir uso de agente gonadotóxico, como ciclofosfamida, e anemia falciforme (Lavery et al., 2016), que pode necessitar de irradiação de medula óssea. No entanto, a taxa de sucesso da técnica experimentada em humanos é somente de 25% aproximadamente, com tempo médio de duração do enxerto entre 4 e 5 anos (Nakano et al., 2020). Esses dados com baixo desempenho indicam a necessidade de aprimoramentos do transplante de ovário, que devem ser testados primeiramente em modelos animais, antes de serem estudados no ser humano.

Vários animais são utilizados em modelos experimentais (Fagundes et al., 2004). A vaca é um animal de grande porte, o que traz dificuldades em sua criação, manutenção e manuseio. A porca é outro modelo com órgãos de dimensões similares aos humanos (Schanaider et al., 2004; Damasio et al., 2016), mas restrições da Vigilância Sanitária em São Paulo limitam seu emprego em nosso Biotério. A ovelha poderia ser uma opção viável, mas trata-se de animal com ciclo reprodutor sazonal, dificultando a comparabilidade com a fisiologia ovariana humana. A coelha tem a desvantagem de implicar custos elevados e alta mortalidade (DaMatta, 2010). As ratas são animais de baixo custo de manutenção, tem ciclo reprodutor não-sazonal e são de pequeno porte, facilitando o manuseio. A atividade ovulatória das ratas relaciona-se ao ciclo estral, que é dividido em quatro fases: proestro, estro, metestro e diestro. A ovulação ocorre no proestro. A prolactina, o LH e o FSH elevam-se no final da fase proestro. O estradiol começa a elevar no metestro, atingindo o pico no proestro e retornando ao nível basal no estro. A progesterona aumenta durante o metestro e diestro e a seguir começa a reduzir-se. Depois, a progesterona volta a aumentar e tem um segundo pico no final do proestro. Exceto pelo duplo pico de progesterona, a dinâmica hormonal tem similaridade com a humana. Esses animais têm a vantagem de apresentar ciclo estral curto, com duração média de 4 a 5 dias, facilitando a análise da função reprodutora (Marcondes et al., 2002). As ratas são, portanto, um bom modelo experimental para avaliar a fertilidade, reprodução e o transplante de ovário, sendo assim o que temos maior experiência.

Em nosso meio, testamos algumas terapias sobre o enxerto ovariano com o intuito de



aumentar sua resistência à hipóxia inicial. Estudamos o pré-condicionamento isquêmico remoto do ovário em duas situações no auto-transplante a fresco de ratas, que resultaram em efeitos discordantes: *in vivo* (Damous et al., 2008) mostrou resultados benéficos, com aumento de folículos e VEGF; *in vitro* (Damous et al., 2014) revelou-se lesivo ao tecido ovariano, retardando a retomada do ciclo estral, reduzindo expressão de folículos e corpos lúteos e aumentando apoptose evidenciada pela caspase 3. Para induzir angiogênese, testamos a terapia celular com células tronco derivadas de tecido adiposo de ratas. Observamos que no enxerto fresco houve retorno precoce do ciclo estral e promoção de angiogênese (aumento da expressão gênica e imunexpressão de VEGF e do número de vasos sanguíneos) (Damous et al., 2015a), enquanto no enxerto criopreservado este tratamento não foi tão benéfico (Damous et al., 2015b). Estudos prévios já haviam mostrado que o retorno funcional no tecido criopreservado é mais tardio do que no fresco (Damous et al., 2009). Estes dados parecem controversos. Portanto, há necessidade de continuar pesquisando sobre estas diferenças, de modo a otimizar o transplante de ovário criopreservado. Uma hipótese para os resultados obtidos seria a existência de fatores que podem interferir com a resposta do tecido, entre os quais se salienta grande quantidade de radicais livres decorrentes do procedimento (Demeestere et al., 2009). Assim, a diminuição destas substâncias poderia melhorar a qualidade do tecido.

Entre os agentes com maior poder anti-oxidante que se conhece na Natureza, destaca-se a melatonina. Estudo de Wang et al., 2013 avaliou em murinos o emprego de melatonina em diversas concentrações (1mM, 10 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 1nM e 10pM) adicionada ao meio de cultura M16 de embriões pronucleares e evidenciou que a diluição 0,1 $\mu$ M foi a que resultou em maior taxa de clivagem celular, formação de blastocisto, qualidade de blastocisto, número de blastômeros e menor apoptose. Ainda avaliou a evolução de embriões cultivados com melatonina 0,1 $\mu$ M comparada com controles, revelando maior taxa de gravidez, nascimento, sobrevivência da ninhada, aumento de superóxido dismutase, bcl-2 (relacionado a anti-apoptose) e redução de caspase 3 e p53 (relacionados a apoptose). Sugeriu-se, assim, que a concentração ideal de melatonina a ser empregada para otimização da fertilidade e reprodução seria 0,1 $\mu$ M.

Revisão sistemática sobre a influência da melatonina em transplante de ovário na literatura internacional compilou a análise de 5 artigos, envolvendo total de 503 animais, publicados nos últimos 12 anos (Shiroma et al., 2016). Houve análise de morfologia, apoptose, resposta imunológica, revascularização, estresse oxidativo e sobrevivência do

enxerto. No entanto, somente um estudo avaliou o transplante autólogo, mas sem o estudo dos efeitos do congelamento e descongelamento do enxerto, etapa obrigatória na preservação de fertilidade humana. Nenhum empregou a concentração de 0,1  $\mu$ molar tampouco aplicou melatonina na solução de criopreservação como experimento.

O primeiro relato do uso experimental de melatonina em autotransplante ovariano de ratas demonstrou benefícios com a administração intraperitoneal da indolamina a 20mg/kg por 15 minutos antes do procedimento, comparado com controle não tratado (Sapmaz et al., 2003). Houve diminuição da necrose ovariana, do nível tecidual e plasmático de malondialdeído além de aumento de agentes anti-oxidativos: superóxido dismutase e glutathiona-peroxidase. Estes dados sugerem uma proteção promovida pela melatonina sobre o tecido ovariano. Esse estudo não avaliou o processo de congelamento e descongelamento, inerente à preservação da fertilidade humana, nem a atividade do enxerto, seja do ponto de vista funcional, histológico ou imunoistoquímico. Portanto, tais análises foram contempladas na presente pesquisa.

Em outra publicação, animais submetidos a xenotransplante (enxertos de ovários de humanos implantados em ratas) e tratados com melatonina via oral, dissolvida na água ingerida pelas receptoras a 240mg/L, mostraram melhora na qualidade do enxerto ovariano, representados por menor contagem de folículos atrésicos, e menor índice de apoptose, representado por análise de TUNEL (Friedman et al., 2012) comparados a grupos controle. Ainda que o fator de congelamento e descongelamento foi uma das etapas nesse estudo, não houve transplante autólogo.

Tendo em vista a experiência já publicada na literatura internacional, o presente estudo é o primeiro a avaliar o transplante autólogo, incluindo o processo de congelamento e descongelamento, mimetizando o que é realizado em humanos, e testando assim a adição de melatonina a 0,1 $\mu$ M ao meio de criopreservação, que se mostrou a mais fisiológica em reprodução experimental.

A rápida difusão da melatonina foi evidenciada por nosso grupo, mesmo quando aplicada indiretamente por meio de substrato de gelatina esponjosa e em diferentes concentrações: 10  $\mu$ molar; 1  $\mu$ molar; 0,1  $\mu$ molar (Botelho et al., 2016). Nesse estudo, aplicando-se melatonina a gelatina esponjosa, evidenciou-se a presença da indolamina tanto no material sobrenadante como no triturado do substrato em todas as concentrações testadas. Essa análise aponta que a melatonina aplicada ao meio de criopreservação

permite que o tecido do enxerto ovariano seja impregnado pela indolamina e possa sofrer ação biológica consequente.

Os resultados do braço congelamento-descongelamento mostram que os dois grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto a contagem de folículos maduros, imaturos, corpos lúteos e vasos sanguíneos. Não houve diferença também quanto a expressão de caspase e TUNEL tanto no estroma quanto em folículos ovarianos. Esse achado indica que o processo de criopreservação não proporcionou danos significativos à arquitetura tecidual e que os grupos controle e melatonina apresentaram função e status oxidativo ovarianos semelhantes até o descongelamento. Esses resultados alinham-se com a hipótese de que os efeitos da melatonina são evidenciados somente após a implantação dos enxertos (Abir et al., 2017).

De fato, no braço de animais submetidos ao transplante, revelaram-se diferenças na análise entre os grupos controle e melatonina. A retomada do ciclo estral das ratas do grupo melatonina foi mais rápida em relação ao controle, com significância estatística. Isso indica que os enxertos submetidos a ação da melatonina podem apresentar condições mais favoráveis de retomada da atividade hormonal e ovulatória, o que é fundamental para o sucesso do transplante ovariano humano, no contexto da preservação da fertilidade. Vale ressaltar que todas as 20 ratas do estudo, independentemente do grupo, retomaram o ciclo estral, mostrando que a técnica de auto-transplante ovariano após criopreservação em nitrogênio líquido e descongelamento, com enxerto avascular em músculo psoas da rata revela-se viável, semelhante à técnica pesquisada em humanos. O tempo médio de retomada do ciclo estral, de 16 a 20 dias, equivale a cerca de 4 a 5 ciclos estrais do animal. Esse tempo se assemelha aos estudos experimentais em humanos (Donnez et al., 2013)

Após 30 a 35 dias do transplante, a análise da macroscopia dos enxertos de ambos grupos também revelou-se preservada, reforçando a viabilidade da técnica empregada. A contagem de folículos maduros mostrou incremento em relação ao controle. Tal achado alinha-se à retomada mais precoce do ciclo estral no grupo melatonina, reafirmando que a indolamina pode ter otimizado as condições para uma melhor função ovulatória. Resultados similares foram encontrados em estudo prévio (Hemadi et al., 2011), em que ovários de ratas neonatas descongelados foram implantados sob transplante heterólogo em subcutâneo de ratas adultas, comparando-se grupo tratado com melatonina injetada intraperitoneal (20mg/kg/dia por 2 dias) e adicionada a 100µM na solução tampão que banhou o enxerto descongelado com grupo controle sem o tratamento. Nessa pesquisa, o

grupo tratado com melatonina reportou maior expressão de folículos secundários em comparação com o controle.

No presente estudo, a contagem de corpos lúteos não mostrou diferença significativa. A rata apresenta ciclos estrais de curta duração (média de 4 a 5 dias) e corpos lúteos de vários ciclos podem permanecer visíveis à análise pontual de microscopia. Dessa maneira, a comparação de contagem de corpos lúteos entre os grupos pode não refletir a função ovulatória do momento da análise, constituindo um ponto de limitação do nosso estudo.

A contagem de vasos sanguíneos também não demonstrou diferença estatisticamente significativa, a despeito de o marcador imunistoquímico de proliferação vascular de von Willebrand ter mostrado aumento no grupo melatonina em relação ao controle, o que indicaria efeito benéfico no contexto de neovascularização do enxerto. O fator de Von Willebrand é uma glicoproteína cuja expressão gênica é específica dos tecidos e está confinada a células endoteliais e a megacariócitos (Ruggeri et al., 1993), sendo portanto um importante marcador de neovascularização. Talvez a análise de maior tempo após o transplante possa elucidar a real tendência do grupo melatonina quanto à vascularização. Estudos prévios que reportaram o efeito da melatonina sobre a vascularização, ainda que com modelos experimentais diversos do atual estudo, também mostraram resultados controversos. Revelou-se diminuição de expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em ovários de ratas pinealectomizadas tratadas com melatonina intramuscular em comparação com grupo similar não tratado (Romeu et al., 2011). Por outro lado, apontou-se maior vascularização em transplante heterólogo de ovário de ratas tratadas com melatonina intraperitoneal, comparado com grupo controle não tratado (Hemadi et al., 2009). Estes dados sugerem que a melatonina exerce modulação da angiogênese, dependendo do modelo estudado, atuando assim na homeostase do sistema vascular.

O antígeno ki-67 é uma proteína nuclear relacionada a proliferação das células, especificamente ligada a transcrição do RNA ribossomal (Scholzen et al., 2000). Essa proteína está presente em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas ausente durante a fase de repouso quiescente, G0 (Bruno et al., 1992). O presente estudo revelou que o grupo melatonina expressou maior intensidade de ki-67 comparado ao controle, tanto em folículos como corpos lúteos, inferindo-se que a melatonina pode estar relacionada a maior atividade de proliferação celular no enxerto ovariano, o que pode ser

interpretado como efeito positivo para a implantação e função do órgão transplantado. Estudo prévio com ovários de ratas a fresco, sem analisar congelamento de tecido ou transplante, apontou que ratas pinealectomizadas e tratadas com melatonina dissolvida na água bebida a 0,4µg/mL mostraram redução de expressão de ki-67 em folículos ovarianos quando comparadas com grupo controle de ratas pinealectomizadas sem tratamento com a indolamina (Maganhin et al., 2013). Como o presente estudo é o primeiro a analisar o ki-67 no contexto de criopreservação e transplante ovariano, mais pesquisas possam consolidar esse possível efeito proliferativo relacionado à melatonina.

A expressão de receptor de estrogênio também teve incremento no grupo melatonina, tanto em folículos como corpos lúteos, em relação ao grupo controle. Esse dado vem ao encontro da maior expressão de folículos ovarianos maduros, que são os maiores produtores de estrogênio no ovário. Pode-se ponderar que o aumento da expressão de receptor de estrogênio poderia ser secundário à maior proliferação dos folículos maduros ou por ação direta da melatonina incrementando a síntese do receptor em si. Tal resultado pode indicar que a melatonina possa otimizar a atividade hormonal folicular, que é a essência do funcionamento do enxerto ovariano, tanto para prover manutenção hormonal como para a função reprodutora. Estudo prévio (Maganhin et al., 2013) com modelo distinto, em ratas não submetidas a transplante ou criopreservação ovariana, mostrou que o grupo de animais pinealectomizados não demonstrou diferença na expressão de receptor para estrogênio comparado ao grupo pinealectomizado e tratado com melatonina (10µg via oral na água por 60 noites) ou grupos controles. Porém, revelou que o grupo pinealectomizado expressou menos receptor para progesterona em relação aos mesmos grupos de comparação.

A expressão de receptor de progesterona no estudo desta tese não demonstrou diferença entre os grupos estudados, tanto em folículos como corpos lúteos. Esse dado alinha-se com o fato do número de corpos lúteos também não ter revelado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tendo em vista que a síntese de progesterona ocorre principalmente nesse tipo de folículo. Da mesma forma, talvez a análise dos enxertos por mais tempo após o transplante possa indicar diferença entre os grupos a longo prazo.

A melatonina aparenta modular o mecanismo da apoptose celular, tanto estimulando como inibindo o processo (Rodrigues et al., 2013). Um dos mecanismos pelos quais a melatonina exerce efeito anti-apoptótico é por meio da depuração de radicais livres

oxidativos, como o ânion hidroxil (-OH), peroxil (ROO-) e superóxido (Sainz et al., 2003). Outra via de inibição da apoptose seria por ação imunológica, ao induzir a produção de citocinas, como a interleucina 4 (Maestroni, 1993) e também por estimular diretamente receptores nucleares que ativam expressão de genes anti-apoptóticos (Mediavilla et al, 1999). No presente estudo, avaliou-se a influência da melatonina sobre a apoptose por meio da expressão de caspase 3 e TUNEL.

A caspase 3 (Ellis et al., 1986) é membro da família das proteases de cisteína-aspartato. A ativação sequencial das caspases resulta na execução da apoptose celular. A caspase 3 especificamente integra a via final de cascata de enzimas apoptóticas (Hengartner, 2000). Na análise de caspase 3 em folículos, o grupo melatonina não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Já em corpos lúteos, evidenciou-se aumento da caspase 3 no grupo melatonina comparado com o controle. Os folículos ovarianos podem ter seu crescimento estimulado (ou apoptose inibida) pela melatonina na retomada da função do enxerto, o que pode ter contrabalanceado o efeito apoptótico esperado devido a necrose natural do tecido nos primeiros dias do transplante, anulando assim a diferença da caspase 3 entre os grupos estudados. Já em corpos lúteos, a melatonina pode ter contribuído para a degeneração dos corpos lúteos, que naturalmente tendem a se degradar, dentro do contexto do ciclo de desenvolvimento folicular, o que pode ter intensificado a expressão da caspase no grupo melatonina.

A técnica de TUNEL, marcação de cortes fita simples por deoxinucleotidil terminal transferase, é um método para detecção de fragmentação de DNA por meio de marcação da ponta terminal de ácidos nucleicos (Gavrieli et al., 1992). O método de TUNEL é utilizado normalmente para detectar a fragmentação do DNA resultante de cascatas de sinalização apoptóticas. Mas essencialmente, identifica unicamente células na última fase da apoptose (Negoescu a et al., 1998). Assim sendo, esse método pode marcar células que tenham sofrido dano severo ao DNA, mesmo não sendo fruto direto da cascata apoptótica. No presente estudo, a marcação de TUNEL mostrou-se reduzida no grupo melatonina, tanto em folículos como em corpos lúteos, com significância estatística, em relação ao grupo controle. Tal achado é relacionado à propriedade bioquímica da melatonina mais consolidada na literatura internacional nos diversos tecidos já estudados, que é o poder depurador de radicais livres oxidativos, que poderia reduzir assim a degradação do DNA, independente da via apoptótica. No transplante ovariano, o primeiro estudo que

investigou o efeito da melatonina (Sapmaz et al., 2003) já apontava tais benefícios promovidos pela indolamina. Nessa análise, pode-se salientar outra limitação do presente estudo, pela ausência de dosagem de radicais livres, seja no enxerto ou no sangue.

O colágeno é parte de um grande grupo de proteínas, compostas por pelo menos 19 tipos, que são constituídas pela combinação de três diferentes cadeias polipeptídicas em estrutura de hélice tripla, de modo a formar principalmente fibrilas ou redes na matriz extracelular (Lind, et al., 2006). Estudos experimentais já demonstraram que, durante o processo de ovulação, existe aumento de expressão de diversas metaloproteinases de matriz, que em maior parte degradam colágeno (Curry et al., 2003). O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular e grande parte da constituição da parede folicular também é composta por essa estrutura. Redução de colágeno no folículo já foi reportada durante a ovulação em ratas (Morales et al., 1983) e atividade colagenolítica aumenta após o pico de LH (Hirsch et al., 1993). Além disso, existe ruptura de colágeno folicular na fase pré-ovulatória, sendo que a superfície apical do folículo apresenta-se mais áspera e transparente, indicando uma ação localizada de quebra da matriz extracelular (Lofman et al., 2002). Em folículos ovarianos de ratas, colágeno tipo I e III foram identificados na teca externa da parede folicular, e colágeno IV foi apontado na membrana basal, separando a teca das células da granulosa (Palotie et al., 1984). O presente estudo apontou no grupo melatonina aumento da expressão do colágeno tipo I e redução do colágeno tipo III em comparação com o grupo controle. Esse achado corrobora a hipótese de que a melatonina promoveu maior atividade funcional e folicular do enxerto ovariano, uma vez que o processo de ovulação se relaciona com produção e quebra de colágeno de maneira concatenada para ocorrer em última análise a rotura do folículo e liberação do ovócito.

Por fim, apontamos como limitações do presente estudo a dificuldade de comparar contagem de corpos lúteos, devido à persistência dos mesmos por vários ciclos estrais; a falta de dosagem de melatonina e de agentes anti-oxidantes tanto no enxerto como no plasma; a ausência de análise da função reprodutiva das ratas após o implante dos enxertos ovarianos e a impossibilidade de averiguar o tempo de sobrevivência dos enxertos implantados.

Em síntese, a melatonina aplicada ao meio de criopreservação melhorou a função do enxerto de ovário de ratas, incrementando parâmetros funcionais, histológicos e imunoistoquímicos.

## 6. Conclusões

A aplicação de melatonina ao meio de criopreservação promoveu:

- a) retomada mais precoce do ciclo estral;
- b) maior número de folículos ovarianos maduros;
- c) maior proliferação celular (ki-67), vascular (fator de von Willebrand) e de expressão de receptores de estrogênio, bem como redução de marcador de apoptose.



**Anexo 1:** Aprovação do projeto em Comissão de Ética



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 024/15 intitulado: “Efeitos da Melatonina na Criopreservação do Tecido Ovariano” que utilizará 26 animais da espécie rato, apresentado pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794-8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: José Maria Soares Jr**

**Pesquisador (a) Executante: Marcos Eiji Shiroma**

**CEUA-FMUSP, 25 de Março de 2015**



**Dr. Eduardo Pompeu**

**Coordenador**

**Comissão de Ética no Uso de Animais**

**Anexo 2: Apresentação da tese em congressos**

**XXI** Congresso Paulista de  
Obstetrícia e Ginecologia  
25 a 27 de agosto de 2016  
Transamerica Expo Center • São Paulo, SP

# CERTIFICADO

Certificamos que  
**Shiroma, M.E.S.; Damous, L.L.; Botelho, N.M.; Carvalho, A.E.T.S.;**  
**Soares-Jr, J.M.; Baracat, E.C.**  
participaram do **XXI CONGRESSO PAULISTA DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**,  
realizado do dia 25 a 27 de Agosto de 2016, no Transamerica Expo Center,  
em São Paulo – SP, com o trabalho **G088 – “EFEITOS DA MELATONINA NA CRIOPRESERVAÇÃO  
DE TECIDO OVARIANO EM RATAS”** em forma de e-pôster.

  
Dr. Paulo Cesar Giraldo  
Presidente da SOGESP

  
Dr. Geraldo Rodrigues de Lima  
Diretor Científico da SOGESP

 **SOGESP**  
Associação de Obstetrizes e Ginecologistas do Estado de São Paulo

 Nova SOGESP  
cada vez mais FORTE

 **CENTRAL  
DE EVENTOS  
SOGESP**



### **P161. Melatonin effects on ovarian tissue cryopreserved transplantation**

*M E Shiroma (BR) [1], L L Damous (BR) [2], N M Botelho (BR) [3], A T Carvalho (BR) [4], E C Baracat (BR) [5], J M Soares-Jr (BR) [6]*

**CONTEXT:** Advances in cancer treatment have allowed young patients to enjoy longer survival. Consequently, new techniques to preserve the ovaries have been studied for the improvement of the success of reproduction.

**OBJECTIVE:** To evaluate the effects of melatonin added to the cryopreservation medium.

**METHODS:** The animals were distributed into two study groups (n=10 in each): 1) Control (CT); 2) Melatonin (MT).

**PARTICIPANTS:** Twenty adult females Wistar rats.

**INTERVENTIONS:** Rats were submitted to intact whole ovary freezing for 24h, using melatonin diluted to the medium, 10<sup>-7</sup>M in 15% of solution (MT) or not (CT). After thawing, grafts were implanted in the retroperitoneum, without vascular anastomosis, each on one side of the psoas muscle. The grafts were recovered between the 30th and 35th post-operative (PO) day.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Daily vaginal smears were collected after the 15th PO day; grafts were assessed for histology (follicle F and corpora lutea CL density), fibrosis analysis (collagen types I and III) and immunohistochemical staining for endothelial cells (von Willebrand factor - vWF), apoptosis (TUNEL, caspase), estrogen and progesterone receptor, and cellular proliferation (Ki-67).

**RESULTS:** In all animals, there were characterization of estrous phase of estrous cycle, viable ovarian follicles in several stages of development and intact, and functioning corpora lutea. The use of melatonin promoted an increase in: mature follicles, collagen type I, endothelial cells (vWF) on F, cellular proliferation (Ki-67) and estrogen receptors both on F and CL, apoptosis on F (caspase and TUNEL) and CL (TUNEL) (p<0.05). Collagen type III was reduced in MT (p<0.05). There were no difference on number of immature follicles, corpora lutea and apoptosis by caspase on F and progesterone receptor on F or CL.

**CONCLUSIONS:** Melatonin application to the cryopreservation medium may enhance structural and functional preservation of ovary graft. Future studies in humans shall confirm those findings and possibly indicate clinical application.

[1] Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, [2] Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, [3] Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, [4] Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, [5] Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, [6] Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo



**FIGO** WORLD CONGRESS OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS XXII • RIO

**CERTIFICATE**

**FIGO** International Federation of Gynecology and Obstetrics  
the Global Voice for Women's Health

We hereby certify that the paper entitled

**MELATONIN EFFECTS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CRYOPRESERVED OVARIAN AUTOGRAFTS**

by the authors **LUCIANA LAMARÃO DAMOUS; NARA MACEDO BOTELHO; MARCOS EIJI SHIROMA; ANA ELISA TEÓFILO SATURI DE CARVALHO; JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR; EDMUND C. BARACAT**

Was presented as an **E-POSTER** during the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) XXII FIGO World Congress 2018 at RioCentro, Brazil, from October 14 to 19, 2018.

*CN Purandare*  
CN Purandare  
FIGO President

*Luis Cabero*  
Luis Cabero  
Chair of Organizing Committee FIGO 2018

*Johan Vos*  
Johan Vos  
FIGO Chief Executive

**EMS**



**FIGO** WORLD CONGRESS OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS XXII • RIO

**CERTIFICATE**

**FIGO** International Federation of Gynecology and Obstetrics  
the Global Voice for Women's Health

We hereby certify that the paper entitled

**EFFECTS OF MELATONIN ON RAT OVARY CRYOPRESERVED TRANSPLANTATION**

by the authors **MARCOS EIJI SHIROMA; LUCIANA LAMARÃO DAMOUS; NARA MACEDO BOTELHO; ANA ELISA TEÓFILO SATURI DE CARVALHO; EDMUND C. BARACAT; JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR**

Was presented as an **ORAL PRESENTATION** during the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) XXII FIGO World Congress 2018 at RioCentro, Brazil, from October 14 to 19, 2018.

*CN Purandare*  
CN Purandare  
FIGO President

*Luis Cabero*  
Luis Cabero  
Chair of Organizing Committee FIGO 2018

*Johan Vos*  
Johan Vos  
FIGO Chief Executive

**EMS**

## Referências bibliográficas

1. Abir R, Fisch B, Jessel S, Felz C, Ben-Haroush A, Orvieto R. Improving posttransplantation survival of human ovarian tissue by treating the host and graft. *Fertil Steril* 2011;95:1205-10.
2. Abir R, Fisch B, Fisher N, Samara N, Lerer-Serfaty G, Magen R, Herman-Edelstein M, Ben-Haroush A, Stein A, Orvieto R. Attempts to improve human ovarian transplantation outcomes of needle-immersed vitrification and slow-freezing by host and graft treatments. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:633-644.
3. Berisha B, Schams D, Rodler D, Pfaffl MW. Angiogenesis in the ovary - the most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cow- an overview. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2016;45:124–130.
4. Botelho NM, Damous LL, Carvalho KC, Markus RP, Carvalho AETS, Soares-Jr JM, Baracat EC. Melatonina em esponja de gelatina absorvível. In: I Congresso Amazônico de Pesquisa Experimental, 2016; Belém, Pará, Brasil.
5. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992;25:31–40.
6. Carlomagno G, Nordio M, Chiu TT, Unfer V. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;159(2):267-72.
7. Chehab G, Krüssel J, Fehm T, Fischer-Betz R, Schneider M, Germeyer A, Suerdieck MB, Kreuzer V, Liebenthron J. Successful conception in a 34-year-old lupus patient following spontaneous pregnancy after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lupus* 2019;28:675-680.
8. Curry TE Jr, Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003;4:428-65.
9. Cruz MHC, Leal CLV, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 2014;82:925-32.
10. Damásio LC, Soares-Júnior JM, Iavelberg J, Maciel GA, de Jesus Simões M, Dos Santos Simões R, da Motta EV, Baracat MC, Baracat EC. Heterotopic ovarian

- transplantation results in less apoptosis than orthotopic transplantation in a minipig model. *J Ovarian Res* 2016;9:14.
11. DaMatta RA. Modelos animais na pesquisa biomédica. *Sci Med* 2010;20:210-1.
  12. Damous LL, Nakamuta JS, Soares-Jr JM, Maciel GA, Simões RS, MonteroEF, Krieger JE, Baracat EC. Females transplanted with ovaries subjected to hypoxic preconditioning show impair of ovarian function. *J Ovarian Res* 2014;7:34.
  13. Damous LL, Silva SM, Lopes RAM, Sakano CRSB, Simões MJ, Montero EFS. Study on the vaginal smear of rats submitted to autologous ovarian transplant: impact of remote ischemic preconditioning. *Acta Cir Bras* 2009a; 24:387-392.
  14. Damous LL, Silva SM, Simões RS, Morello RJ, Carbonel AAF, Simões MJ, et al. Remote ischemic preconditioning on neovascularization and follicle viability on ovary autotransplantation in rats. *Transplant Proc* 2008;40:861-4.
  15. Damous LL. Efeito do condicionamento isquêmico remoto no transplante autólogo de ovário fresco e criopreservado em ratas. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2009b.
  16. Damous LL, Nakamuta JS, Carvalho AE, Carvalho KC, Soares JM Jr, Simões Mde J, Krieger JE, Baracat EC. Does adipose tissue-derived stem cell therapy improve graft quality in freshly grafted ovaries? *Reprod Biol Endocrinol* 2015a;13:108.
  17. Damous LL, Nakamuta JS, Saturi de Carvalho AE, Carvalho KC, Soares JM Jr, Simões Mde J, Krieger JE, Baracat EC. Scaffold-based delivery of adipose tissue-derived stem cells in rat frozen-thawed ovarian autografts: preliminary studies in a rat model. *J Assist Reprod Genet* 2015b;32:1285-94.
  18. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update* 2009;15:649-65
  19. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Serrano MS, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* 2013;99:1503-13.

20. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003;8:1093-108.
21. Dubocovich ML. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med* 2007;8:34-42.
22. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817–829.
23. Erşahin C, Masana MI, Dubocovich ML. Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur J Pharmacol* 2002;439:171-2.
24. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19:59-65.
25. Falcón J, Besseau L, Fuentès M, Sauzet S, Magnanou E, Boeuf G. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1163:101-11
26. Ferreira CS, Maganhin CC, Simões RS, Girão MJBC, Baracat EC, Soares-Jr JM. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56:715-8.
27. Friedman OR, Orvieto R, Fisch B, Felz C, Freud E, Ben-Haroush A, Bir R. Possible improvements in human ovarian grafting by various host and graft treatments. *Hum Reprod* 2012;27:474-82.
28. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493–501.
29. Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril* 2012;97:1260-8.
30. Guanasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Crister ES, Crister JK. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 1997;57:226-31.
31. Hemadi M, Zargar M, Sobhani A, Sobhani A. Assessment of morphological and functional changes in neonate vitrified testis grafts after host treatment with melatonin *Folia Morphol (Warsz).* 2011;70:95-102.
32. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770–776.
33. Hirsch B, Leonhardt S, Jarry H, Reich R, Tsafiriri A, Wuttke W. In vivo

- measurement of rat ovarian collagenolytic activities. *Endocrinology* 1993;6:2761-5.
34. Johnston JD, Skene DJ. 60 years of neuroendocrinology: Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *J Endocrinol* 2015;226:187-98
  35. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008
  36. Labied S, Delforge Y, Munaut C, Blacher S, Colige A, Delcombel R, Henry L, Fransolet M, Jouan C, d'Hauterive SP, Noël A, Nisolle M, Foidart JM. Isoform 111 of vascular endothelial growth factor (VEFG<sub>111</sub>) improves angiogenesis of ovarian tissue xenotransplantation. *Transplantation* 2013;95:426-33.
  37. Lavery SA, Islam R, Hunt J, Carby A, Anderson RA. The medical and ethical challenges of fertility preservation in teenage girls: a case series of sickle cell anaemia patients prior to bone marrow transplant. *Hum Reprod* 2016;31:1501-7.
  38. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:10:2587.
  39. Lind AK, Weijdegård B, Dahm-Kähler P, Mölne J, Sundfeldt K, Brännström M. Collagens in the human ovary and their changes in the perifollicular stroma during ovulation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:1476-84.
  40. Lofman C, Zackrisson U, Mikuni M, Block M, Janson PO, Brannstrom M. A method for longitudinal microscopic in vivo examinations of morphology, vascularity, and motility in the ovary and the oviduct of the rat. *J Soc Gynecol Investig*. 2002;6:379-85.
  41. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25:177-95
  42. Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993;14:1-10.
  43. Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira-Junior IS, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC, Joares-Jr JM. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Rev Assoc Med Bras* 2008;54:267-71.
  44. Maganhin CC, Fuchs LFP, Simões RS, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Baracat EC, Soares-Jr JM. Effects of melatonina on ovarian follicles *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;166:178-184.



45. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002;62:609-14.
46. Masana MI, Dubocovich ML. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* 2001;(107):pe39.
47. Masana MI, Soares JM Jr, Dubocovich ML.  $17\beta$ -estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinol* 2005;81:87-95
48. Mediavilla MD, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci*. 1999;65:415-20.
49. Moore RY, Klein DC. Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N - acetyltransferase activity. *Brain Res* 1974;71:17-33.
50. Morales TI, Woessner JF Jr, Marsh JM, LeMaire WJ. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafian follicles during follicular growth and ovulation. *Biochim Biophys Acta* 1983;1:119-22.
51. Nakano MSL, Lobel ALS, Igami DZ, Serafini PC, Soares-Jr JM, Baracat EC. Live birth rate after ovarian tissue cryopreservation followed by autotransplantation in cancer patients: a systematic review (em publicação)
52. Palotie A, Peltonen L, Foidart JM, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of basement membrane components and interstitial collagen types in preovulatory rat ovarian follicles. *Coll Relat Res* 1984;4:279-87.
53. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008;5:335-53.
54. Panzan MQ, Mattar R, Maganhin CC, Simões RS, Rossi AGZR, Motta ELA, Baracat EC, Soares-Jr JM. Evaluation of FAS and caspase-e in the endometrial tissue of patients with idiopathic infertility and recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;167:47-52.
55. Reichlin S. The pineal gland. In: Wilson JD & Foster DW (Eds.) *Willians textbook of endocrinology*. 8th edition, Philadelphia: WB Saunders, 1992;240-53.
56. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and Reproduction Revisited. *Biol Reprod* 2009;81:445-56.
57. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog*

- Brain Res.* 2010;181:127-51.
58. Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertil Steril* 2014;102:321-8.
59. Rodriguez C, Martín V, Herrera F, García-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sánchez-Sánchez AM, Suárez S, Puente-Moncada N, Anítua MJ, Antolín I. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci* 2013;14:6597-613.
60. Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K. Options on fertility preservation in female cancer patients. *Cancer Treat Rev* 2012;38:354-61.
61. Romeu LRG, Motta ELA, Maganhin CC, Oshima CTF, Fonseca MC, Barrueco KF, Simões RS, Pellegrino R, Baracat EC, Soares-Jr JM. Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. *Fertil Steril* 2011;95:1379-84.
62. Rönnerberg L, Kauppila A, Leppäluoto J, Martikainen H, Vakkuri O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:493-6.
63. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J* 1993;7:308-16.
64. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1407-26.
65. Sapmaz E, Ayar A, Celik H, Sapmaz T, Kilic N, Yasar MA. Effects of melatonin and oxytetracycline in autologous intraperitoneal ovary transplantation in rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2003;24:350-4.
66. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras* 2004;19:441-7.
67. Shiroma ME, Botelho NM, Damous LL, Baracat EC, Soares JM Jr. Melatonin influence in ovary transplantation: systematic review. *J Ovarian Res.* 2016; 10;9:33
68. Shiu SY, Xi SC, Xu JN, Mei L, Pang SF, Yao KM, Wong JT. Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation in vitro and in vivo by melatonin. *Life Sci* 2000;67:2059-74.
69. Scholzen T, Gerdes J. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-22.

70. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020;70:7-30.
71. Soares-Jr JM, Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:694-702.
72. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee F, Tamura I, Maekawa R, Aasada H, Yamagata Y, Sugino N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res* 2012;5:5.
73. Teixeira CP, Simões RS, Santos MA, Calió ML, Soares JM Jr, Simões MJ, Bertoncini CR, Higa EM, Carbonel AF. Soybean concentrated extract counteracts oxidative stress in the uterus of rats. *Climacteric* 2014;17:402-9.
74. Valenzuela FJ, Vera J, Venegas C, Pino F, Lagunas C. Circadian System and Melatonin Hormone: Risk Factors for Complications during Pregnancy. *Obstet Gynecol Int* 2015;2015:1-10
75. Wang F, Tian XZ, Zhang L, Tan DX, Reiter RJ, Liu GS. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *J Pineal Res* 2013;55:267-7.
76. Woo MM, Tai CJ, Kang SK, Nathwani PS, Pang SF, Leung PC. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4789-97
77. Wurtman RJ, Axelrod J. The pineal gland. *Scient Amer* 1969:21