



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Alan Cesar Nunes de Moraes

**Efeitos tardios no tecido ovariano de ratas Wistar após tratamento com
Docetaxel e Ciclofosfamida**

Rio de Janeiro

2015

Alan Cesar Nunes de Moraes

**Efeitos tardios no tecido ovariano de ratas Wistar após tratamento com Docetaxel e
Ciclofosfamida**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M828 Moraes, Alan Cesar Nunes de.
Efeitos tardios no tecido ovariano de ratas Wistar após tratamento com Docetaxel e
Ciclofosfamida / Alan Cesar Nunes de Moraes – 2015.
54 f.

Orientadora: Ana Carolina Stumbo Machado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e
Experimental.

1. Mamas - Câncer - Teses. 2. Quimioterapia - Teses. 3. Insuficiência Ovariana
Primária. 4. Menopausa Precoce. 5. Ciclofosfamida. I. Machado, Ana Carolina Stumbo.
II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 618.19-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alan Cesar Nunes de Moraes

**Efeitos tardios no tecido ovariano de ratas Wistar após tratamento com Docetaxel e
Ciclofosfamida**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de agosto de 2015.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Vinícius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele eu nada seria.

Aos meus pais, Euro Cesar e Carmen Lúcia, minha irmã Aline, por toda compreensão nos momentos de estresse e ausência.

A minha orientadora, Ana Carolina Stumbo Machado por toda ajuda.

Ao professor Jorge Carvalho por todo apoio em todos os momentos da minha caminhada na UERJ.

As amigas, Ana Lucia Rosa Nascimento e Cherley Borba por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e dando forças para continuar essa árdua caminhada, que é o Mestrado.

Aos amigos Wilian Lannes e Luiz Lannes por me proporcionarem momentos de diversão.

Aos amigos do DHE.

O maior Juiz de seus atos deve ser você mesmo e não a sociedade, aprenda as regras e quebre algumas.

Dalai Lama

RESUMO

MORAES, Alan Cesar Nunes de. *Efeitos tardios no tecido ovariano de ratas Wistar após tratamento com Docetaxel e Ciclofosfamida*. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Sabe-se que a maior incidência de CM ocorre nas mulheres pós-menopausa, entretanto é crescente o número de mulheres jovens acometidas por esta doença. O tratamento do CM pode incluir: quimioterapia, radioterapia e/ou hormonioterapia. A quimioterapia, por se ser um tratamento sistêmico, pode causar importantes efeitos colaterais, entre eles a falência ovariana induzida por quimioterapia (FOIQ). As principais consequências da FOIQ são a infertilidade, além de complicações tardias relacionadas à diminuição do estrogênio, como a osteoporose e doenças cardiovasculares. O regime quimioterápico TC, adota a associação do docetaxel com a ciclofosfamida, como uma opção por fármacos que resultem numa taxa de sobrevida livre do câncer, e menores efeitos colaterais. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos tardios no ovário causados pelo tratamento com a associação dos quimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida (TC), em modelo animal com ratos Wistar. Para verificar o sinergismo desses quimioterápicos e assim analisar o efeito da administração conjunta, ratos Wistar fêmeas foram divididos em dois grupos: um grupo controle e um grupo que recebeu quimioterapia (TC). Os animais foram submetidos a eutanasia cinco meses após o fim do tratamento, e foram recolhidos o plasma e os ovários. Foram observadas alterações importantes. O nível de estradiol no plasma foi significativamente reduzido no grupo de TC em comparação com o grupo controle. Além disso, o número de núcleos apoptóticos foi maior no grupo TC. O papel da resposta inflamatória no desenvolvimento da lesão ovariana foi também investigado, e notou-se um aumento do número de mastócitos, e aumento da expressão de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) no grupo TC. O envolvimento de fibrose nesse processo, foi também investigado. Os resultados mostraram que níveis de expressão de Fator de Crescimento Tumoral- β 1 (TGF- β 1), Colágeno Tipo I (Col-I) e Colágeno Tipo III (Col-III) estavam maiores no grupo TC em comparação com o grupo de controle. A análise ultraestrutural revelou a presença de feixes de colágeno no grupo tratado, e mostrou que a arquitetura do tecido do ovário estava mais desorganizada neste grupo comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a combinação de ciclofosfamida e docetaxel, um recente regime quimioterápico proposto para o tratamento do CM, pode levar a importantes alterações no ovário. O processo inflamatório, desencadeado pela administração dos quimioterápicos, estimula a apoptose e liberação de TGF- β no estroma ovariano, que induz a produção de matriz extracelular e subsequente, substituição do tecido sadio por tecido fibrótico. A principal consequência deste processo é a diminuição, ou perda, da função ovariana, levando à menopausa precoce e possível infertilidade. É importante compreender os mecanismos envolvidos na infertilidade provocada pelo regime TC, a fim de estudar novos métodos que evitem este efeito indesejável em mulheres submetidas a tratamento do CM.

Palavras-chave: Câncer de mama. Quimioterapia. Falência ovariana. Menopausa precoce.

ABSTRACT

MORAES, Alan Cesar Nunes de. *Late effects in ovarian tissue of Wistar rats after Docetaxel and Cyclophosphamide treatment*. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Breast cancer (BC) is the second most common cancer worldwide. It is known that the highest incidence of BC occurs in postmenopausal women, however an increasing number of young women have been affected by this disease. CM treatment may include: chemotherapy, radiotherapy and/or hormonotherapy. Chemotherapy is a systemic treatment that can cause significant side effects, including the ovarian failure induced by chemotherapy (CIOF). The main consequences of CIOF are infertility, and late complications related to the reduction of estrogen, such as osteoporosis and cardiovascular disease. The chemotherapy regimen TC, adopts the combination of docetaxel with cyclophosphamide as an option by drugs that result in rate of survival free cancer, and fewer side effects. This study aimed to determine the late effects in the ovary caused by the treatment with the combination of two chemotherapy agents: docetaxel and cyclophosphamide (TC), using an animal model with Wistar rats. To check the synergism of these chemotherapy agents and thus analyze the effect of co-administration, Wistar female rats were divided into two groups: a control group and a TC group. They were subjected to euthanasia five months after the end of treatment, and their plasma and ovaries were collected. Important alterations were noted. The plasma estradiol level was significantly reduced in the TC group compared with the control group. Additionally, the number of apoptotic nuclei was higher in the TC group. The role of the inflammatory response in the development of ovarian damage was investigated, and we found an increased number of mast cells and increased expression of Tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the TC group. The involvement of fibrosis was also investigated. The results showed that the TC group had increased expression levels of Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Collagen Type I (col-I) and Collagen Type III (col-III) compared with the control group. Ultrastructural analysis revealed the presence of collagen bundles in the treated group and showed that the ovarian tissue architecture was more disorganized in this group than in the control group. The results of this study indicate that the combination of cyclophosphamide and docetaxel, a recent proposed chemotherapy regimen for the treatment of CM can lead to significant changes in the ovary. The inflammatory process, triggered by the administration of chemotherapy, stimulates apoptosis and release of TGF- β 1 in ovarian stroma, which induces extracellular matrix production, and subsequent, replacement of healthy tissue by fibrous tissue. The main consequence of this process is the reduction or loss of ovarian function, leading to early menopause and possible infertility. It is important to understand the mechanisms involved in the infertility provoked by the TC treatment, in order to study new methods which avoid this undesirable effect on women submitted to BC treatment.

Keywords: Breast cancer. Chemotherapy. Ovarian failure. Early menopause.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema de um corte histológico do ovário.....	16
Figura 2 –	Variação dos hormônios LH, FSH, estrogênio e progesterona durante o ciclo menstrual.....	17
Tabela 1 –	Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.....	25
Figura 3 –	Exemplo de imagem utilizada para a análise estereológica através do STEPanizer.....	29
Figura 4 –	Média da massa do útero normalizada pela massa corporal dos animais dos grupos controle e TC.....	32
Figura 5 –	Média da massa do ovário direito normalizada pela massa corporal dos animais dos grupos controle e TC.....	33
Figura 6 –	Média da concentração sérica de estradiol dos animais dos grupos controle e TC.....	34
Figura 7 –	Análise da expressão de TNF- α	35
Figura 8 –	Contagem de mastócitos no estroma ovariano.....	36
Figura 9 –	Análise da Caspase-3 no estroma ovariano.....	37
Figura 10 –	Análise de núcleos apoptóticos no estroma ovariano, pela técnica de TUNEL.....	38
Figura 11 –	Análise de colágeno tipo I no estroma ovariano.....	39
Figura 12 –	Análise de colágeno tipo III no estroma ovariano.....	40
Figura 13 –	Análise de TGF- β no estroma ovariano.....	41
Figura 14 –	Análise ultraestrutural do estroma ovariano.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA –	Comitê de Ética para o cuidado e Uso de Animais experimentais
CM –	Câncer de Mama
CMF –	Ciclofosfamida, Metotrexato e Fluorouracil
CTO –	Centro de Terapia Oncológica
DAB –	Diaminobenzidina
DHEA-S –	Sulfato de Dehidroepiandrosterona
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
E1S –	Sulfato de Estrona
EPM –	Erro Padrão da Média
FF –	Feixes de Fibras de Colágeno
FOIQ –	Falência Ovariana Induzida por Quimioterapia
FSH –	Hormônio Folículo Estimulante
IARC –	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA –	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IP –	Intraperitoneal
LH –	Hormônio Luteinizante
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET –	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NaCl –	Cloreto de Sódio
PBS –	Tampão Fosfato-Salino
PBS/BSA –	Tampão Fosfato-Salino/Albumina Sérica Bovina
RIA –	Radioimunoensaio Específico
TC –	Docetaxel e Ciclofosfamida
TGF- β –	Fator Transformante de Crescimento beta
TNF- α –	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TUNEL –	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick and Labeling

LISTA DE SÍMBOLOS

mg –	Miligrama
Kg –	Quilograma
ml –	Mililitro
μm –	Micrometro
$^{\circ}\text{C}$ –	Graus Celsius
pH –	Potencial de Hidrogênio
CO_2 –	Gás Carbônico
mm^2 –	Milimetro Quadrado
M –	Massa
pg –	Picograma
μg –	Micrograma
ng –	Nanogram
β –	Beta
α –	Alfa
μm^2 –	Micrometro Quadrado

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	Câncer de mama	13
1.2	A Quimioterapia e o Câncer de Mama	14
1.3	Histologia e Fisiologia do Ovário	15
1.3.1	<u>Ciclo Ovariano Humano</u>	16
1.4	Amnorréia e Quimioterapia	19
1.5	Falência Ovariana Induzida por Quimioterapia	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetvos específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Animais	23
3.2	Quimioterapia	23
3.3	Eutanásia	24
3.4	Avaliação da Massa Uterina e Massa do Ovário	24
3.5	Dosagem de Estradiol	24
3.6	Análises Histológicas	25
3.6.1	<u>Imunohistoquímica</u>	25
3.6.2	<u>Quantificação da Imunohistoquímica</u>	26
3.6.3	<u>Identificação de Mastócitos</u>	27
3.6.4	<u>Apoptose (Método TUNEL)</u>	27
3.6.5	<u>Quantificação de Núcleos Apoptóticos e de Mastócitos</u>	28
3.7	Análises Ultraestruturais	29
3.7.1	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	29
3.7.2	<u>Microscopia eletrônica de transmissão</u>	30
3.8	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Avaliação da Massa Uterina e da Massa do Ovário	32
4.2	Dosagem de Estradiol	33
4.3	Análise do Processo Inflamatório	34
4.4	Análise da Apoptose	36

4.5	Análise da Fibrose	38
5	DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – Confirmação de Submissão de Artigo a Revista Journal of Microscopy.....	53
	ANEXO B – Comitê de Ética em Pesquisa.....	54

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde mundial, e a cada ano sua incidência cresce, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento, por exemplo, o Brasil.

A maioria das diretrizes nacionais para o CM invasivo no estágio inicial recomenda a quimioterapia adjuvante. A quimioterapia, por se ser um tratamento sistêmico, pode causar importantes efeitos colaterais, entre eles a falência ovariana induzida por quimioterapia (FOIQ).

Estudos prévios de Byrne e colaboradores (1992) mostraram que a ciclofosfamida tem um efeito gonadotóxico significativo, apresentando altas taxas de falência ovariana em pacientes tratadas antes da menopausa.

Em relação aos taxanos, como o docetaxel, os estudos realizados por Reh e colaboradores (2008) demonstrou que seus efeitos na fertilidade das pacientes são limitados. Embora ensaios clínicos anteriores, realizados por Davis et al (2005) e Fornier et al (2005) não mostram nenhum efeito dos taxanos sobre a menstruação, um estudo mais recente realizado por Petrek e colaboradores (2006), com mais pacientes, mostrou um aumento nas taxas de amenorréia em pacientes tratadas com docetaxel.

Os estudos para caracterizar os efeitos no ovário dos diferentes regimes quimioterápicos são ainda inconclusivos, provavelmente devido às diferentes definições do estado menstrual pós-quimioterapia, diferenças na duração do acompanhamento das pacientes, dose-dependência do efeito causado e características particulares relacionadas com o tratamento. Tais avaliações ainda são insipientes para fármacos recentemente utilizados na terapia adjuvante como o docetaxel. Desta forma, nota-se que são necessários maiores estudos sobre os efeitos do tratamento quimioterápico na falência ovariana, utilizando ciclos que envolvam os taxanos, como o ciclo TC.

Como alguns estudos anteriores já demonstraram efeitos dos quimioterápicos ciclofosfamida e docetaxel de forma separada e foi visualizado resultados para estes isoladamente, o objetivo deste trabalho é verificar o sinergismo desses quimioterápicos e assim analisar o efeito da administração conjunta deles.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de Mama

De acordo com as estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), o câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo, sendo o mais frequente entre as mulheres, com uma estimativa de 1,67 milhões de novos casos de CM diagnosticados em 2012 (25% de todos os cânceres). O CM é ainda o tipo mais comum tanto nas regiões mais desenvolvidas (794.000) quanto nas menos desenvolvidas (883.000 casos) (1, 2). Em relação ao Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou, para o ano de 2015, 57.120 novos casos de CM (3).

Embora muitos fatores possam aumentar o risco do desenvolvimento do CM, ainda não se conhecem os mecanismos que levam estes fatores a induzirem as células saudáveis a se transformarem em células neoplásicas (4). Os fatores de risco podem ser divididos em fatores de risco não-modificáveis e fatores de risco relacionados ao estilo de vida. Fatores de risco não-modificáveis são: o sexo, idade, fatores genéticos, histórico familiar, história pessoal de câncer de mama, tecido mamário denso, períodos menstruais, incidência de radiação ionizante, entre outros. Os fatores de risco relacionados ao estilo de vida são: nuliparidade, gravidez em idades tardias, não amamentar, uso de anticoncepcionais, de terapia de reposição, consumo de álcool, excesso de peso ou obesidade, falta de exercício, e outros (5-11). No entanto, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos. Após essa idade, o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença (3).

Sabe-se que a maior incidência de CM ocorre nas mulheres pós-menopausa, entretanto é crescente o número de mulheres jovens acometidas por esta doença, em diversas partes do mundo (12). Uma preocupação é que as mulheres mais jovens tendem a apresentar pior prognóstico, necessitando de uma abordagem de tratamento mais intensiva (12). O tratamento para CM pode incluir cirurgia, quimioterapia, radioterapia e/ou hormonioterapia. Embora o tratamento aumente a expectativa de vida das pacientes, ele pode causar consequências não

desejadas, em curto ou longo prazo, como linfopenia, cardiopatias, danos ovarianos e amenorréia (13-15).

1.2 A Quimioterapia e o Câncer de Mama

Os tratamentos sistêmicos para o CM, que incluem a quimioterapia e/ou hormonioterapia, melhoram significativamente a sobrevida global e livre da doença, mas estão associados a diversos efeitos adversos. Estes podem influenciar negativamente a qualidade de vida. A decisão sobre a terapia adjuvante sistêmica envolve, portanto, um estudo minucioso entre os benefícios esperados e os riscos potenciais (16).

A maioria das diretrizes nacionais para o CM invasivo no estágio inicial recomenda a quimioterapia adjuvante. A exceção a essas diretrizes refere-se a casos em que os tumores são muito pequenos, onde apenas a cirurgia é realizada. Assim, a maioria das mulheres jovens diagnosticadas com CM no estágio precoce passará por quimioterapia (17).

Ao longo dos últimos anos, um grande número de ensaios clínicos sobre quimioterapia tem sido conduzido na tentativa de encontrar as melhores estratégias terapêuticas para o CM. Estes ensaios têm normalmente como objetivo selecionar o melhor agente quimioterápico de cada classe; a melhor dose de cada agente; diferentes sequências de combinações entre os agentes; diferentes intervalos de tempo de administração da droga e o papel dos novos agentes encontrados (18).

Dentre os agentes quimioterápicos mais utilizados até hoje está a doxorrubicina, da classe dos antracíclicos. Porém, seu uso é limitado devido ao seu efeito cardiotóxico. Outros fármacos vêm sendo usados na tentativa de se obter a mesma taxa de sobrevida livre do câncer, e menores efeitos colaterais. Um dos fármacos sugeridos na substituição da doxorrubicina é o docetaxel (19, 20). O docetaxel, da classe dos taxanos, é um potente agente anti-microtúbulo, promovendo a estabilização dos microtubulos, impedindo desta forma a mitose, uma vez que nesse processo os microtubulos devem se desestabilizar, utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres, inclusive no CM. Os taxanos, docetaxel e paclitaxel, estão entre os agentes mais eficazes para o tratamento do CM precoce (21). Dentre os regimes quimioterápicos que adotam o docetaxel está o regime TC, da sua associação com outro fármaco, a ciclofosfamida (22). A ciclofosfamida é classificada como agente alquilante, sua

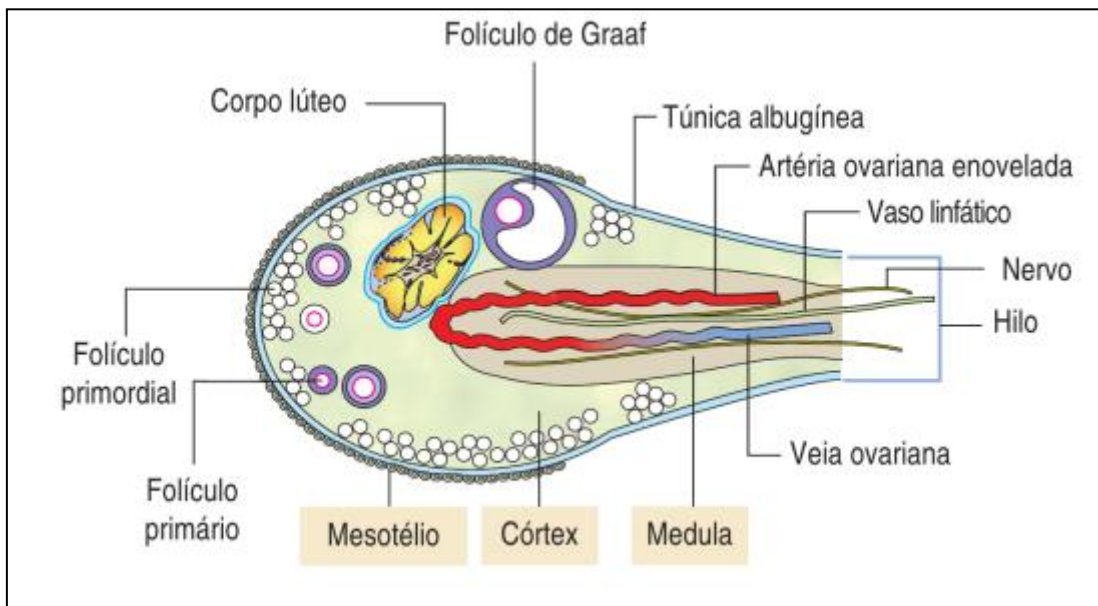
ação é através da alquilação de constituintes celulares, promovendo ligações cruzadas entre DNA ou DNA-proteína. Essas alterações prejudicam as funções celulares, impedindo sua replicação (23).

1.3 Histologia e Fisiologia do Ovário

Os ovários têm a forma de amêndoas, medindo aproximadamente 3 cm de comprimento, 1,5 cm de largura e 1 cm de espessura. A sua superfície é coberta por um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, o epitélio germinativo. Sob o epitélio germinativo há uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Abaixo da túnica albugínea há uma região chamada cortical, na qual predominam os folículos ovarianos. A parte mais interna do ovário é a região medular, que contém tecido conjuntivo frouxo com um rico leito vascular. O limite entre a região cortical e a medular não é muito distinto (24).

O ovário é revestido por diferentes tipos celulares: epitélio cúbico a pavimentoso simples na superfície e abaixo, há uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Em um corte histológico é possível identificar duas regiões distintas: o córtex e a medula, conforme mostra a Figura 1. No córtex predominam os folículos ovarianos inseridos no tecido conjuntivo da região cortical (estroma). A medula é constituída por tecido conjuntivo frouxo, células intersticiais, nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. O estroma ovariano, entre as estruturas medulares e corticais, possui algumas células fusiformes, denominadas células intersticiais ou de Leydig. Essas células respondem aos estímulos das gonadotrofinas e produzem hormônios sexuais, principalmente androgênios. A hiperplasia destas células pode ser vista em afecções ovarianas relacionadas ao hiperandrogenismo (hirsutismo), como na síndrome dos ovários policísticos. Na região cortical, dependendo da fase e da idade, podem-se identificar: folículos ovarianos, corpo lúteo e corpos a *albicans* (24).

Figura 1 - Esquema de um corte histológico do ovário



Fonte: Kierszenbaum, 2012.

As funções do ovário são: produção do gameta feminino; secreção de estrogênio e progesterona; regulação do crescimento pós-natal dos órgãos genitais e o desenvolvimento das características sexuais secundárias. O tecido ovariano é um órgão endócrino funcional, mesmo depois da menopausa ou falência ovariana prematura, que continua a produzir esteróides críticos sexuais, como a testosterona e o estrogênio (24, 25).

1.3.1 Ciclo Ovariano Humano

A vida reprodutiva feminina é caracterizada por variações mensais dos hormônios femininos, e correspondentes alterações nos ovários e nos órgãos sexuais, que duram em média 28 dias por ciclo (26).

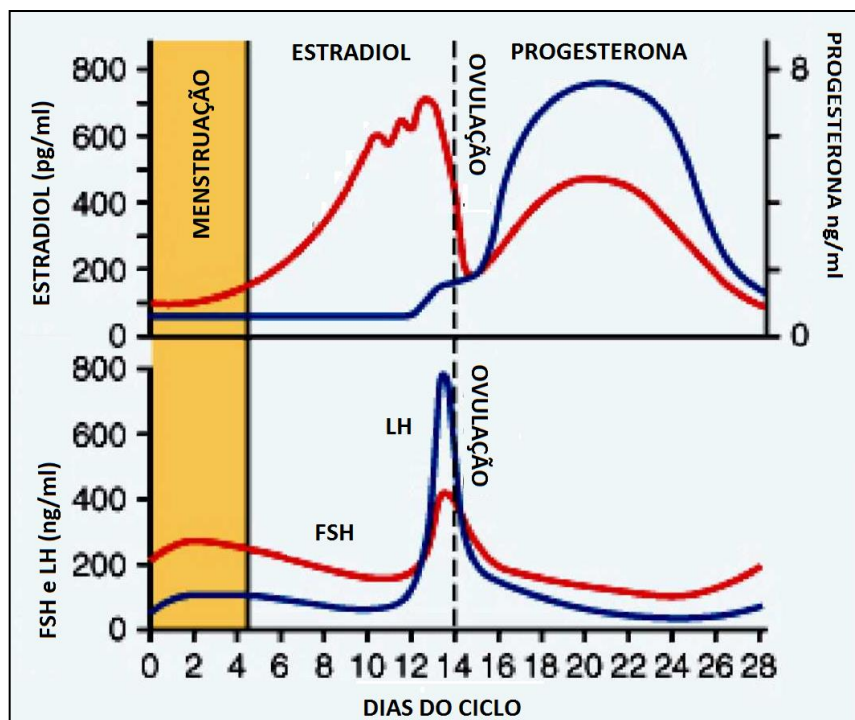
As alterações dos ovários no ciclo menstrual dependem exclusivamente dos hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), secretados pela adeno-hipófise. As três fases do ciclo ovariano são: folicular, ovulatória e luteínica (26).

A fase folicular consiste no desenvolvimento do folículo primordial em um folículo maduro. Os folículos primordiais estão parados em uma fase de repouso desde o início do desenvolvimento no ovário embrionário. Quando estes folículos saem do repouso, por ação do aumento da secreção do FSH e do LH, eles crescem e são chamados de folículos primários (24).

A fase ovulatória, em uma mulher com ciclo regular de 28 dias, se inicia 14 dias após o início da menstruação. O LH é necessário para o crescimento folicular final e para a ovulação. Nos dias que precedem a ovulação ocorre um pico tanto do LH, quanto do FSH. Neste momento a produção de estrogênio diminui, e a de progesterona se inicia (26).

Na fase luteínica, que segue a ovulação, a camada de células foliculares residuais se pregueia e se torna parte do corpo lúteo, que secreta grandes quantidades de estrogênio e progesterona. O estrogênio, e em menor parte a progesterona, exercem um *feedback* negativo na adeno-hipófise, resultando na diminuição da secreção de LH e FSH, o que causa a involução do corpo lúteo. Esta involução acontece próximo ao 26º dia do ciclo, 2 dias antes da menstruação (24). As variações hormonais durante o ciclo menstrual podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 - Variação dos hormônios LH, FSH, estrogênio e progesterona durante o ciclo menstrual



Fonte: Jankowski, 2013.

Os hormônios ovarianos são os estrógenos e os progestógenos. O estrógeno mais importante é o estradiol, e o progestógeno mais importante é a progesterona. Em uma mulher não gestante, somente os ovários secretam quantidades significativas de estrogênio. No plasma sanguíneo destas mulheres apenas três estrógenos apresentam níveis significativos: β -estradiol, estrona e estriol, sendo o β -estradiol o principal. A mais importante função dos estrógenos é estimular a proliferação e crescimento dos tecidos dos órgãos sexuais, e de outros tecidos relacionados com a reprodução (26).

Todos os hormônios esteroides, entre eles o estradiol, são lipídios que têm o colesterol como seu substrato precursor. Como o colesterol possui 27 átomos de carbono e os esteróides possuem 21, a síntese de hormônios esteroides sexuais a partir do colesterol envolve uma série de etapas na remoção de uma unidade de seis carbonos para formar a pregnenolona. A síntese de estradiol requer a atividade de membros da família de enzimas do citocromo P450, e uma segunda família de enzimas, as hidroxisteróides desidrogenases, que catalisam as reações envolvidas tanto na biossíntese quanto à inativação dos hormônios esteroides (25).

Ao atingir os 40-50 anos de idade, os ciclos menstruais tornam-se irregulares, e em muitos deles não ocorre a ovulação. Ao decorrer de meses ou alguns anos os ciclos cessam completamente. A este período durante o qual os ciclos cessam, e a produção de hormônios sexuais é ínfima, denomina-se menopausa (26).

A causa da menopausa é a exaustão dos ovários. Aos 45 anos, em média, restam apenas alguns folículos primordiais para serem estimulados pelo FSH e LH, e a produção de estrógenos pelo ovário decresce à medida que o número de folículos primordiais se aproxima de zero. Durante a menopausa o FSH e LH são produzidos continuamente (26).

A acentuada diminuição de estrógenos provoca alterações fisiológicas importantes na mulher, como: irritabilidade, fadiga, sensação de calor extrema, e diminuição da resistência e calcificação de todos os ossos do corpo (26).

A síntese de estradiol no ovário de mulheres na pré-menopausa requer a participação de, pelo menos, dois tipos de células que sintetizam seus produtos, quando estimuladas por mecanismos independentes. Nas células da teca interna do folículo que ovulou, a pregnenolona sofre uma conversão enzimática para androstenediona. Como não existe aromatase P450 no tecido da teca, a conversão final de estradiol ocorre nas células da granulosa, o que requer a presença da 17β -HSD1 para a conversão de androstenediona em testosterona (28). Esta via é denominada "via da aromatase" para a síntese de estradiol.

Na fase lútea do ciclo ovulatório, as células da teca e as células do corpo lúteo (teca luteínica) atuam em conjunto com as células grânulo-luteínicas para produzir quantidades substanciais de estradiol e progesterona. Durante o ciclo, o sulfato de estrona (E1S) e o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S - disponíveis em pequenas concentrações no ovário de mulheres na pré-menopausa), podem também sofrer conversão em estrona e DHEA, respectivamente, através das sulfatases. Esta é "a via da sulfatase" para a síntese de estradiol (28).

Após a menopausa os níveis de estradiol no sangue periférico são mantidos devido principalmente à contribuição das glândulas supra-renais e à aromatização dos androgênios em estrogênio, por ação da aromatase, no tecido adiposo e na pele. Estudos mostram que o aumento do índice de massa corporal está diretamente ligado ao aumento da produção de estradiol (29). Porém, existem evidências de que mesmo após a menopausa o ovário retém a capacidade de produzir ambos o androgênio e o estrogênio (25, 30).

1.4 Amenorreia e Quimioterapia

Entre os tipos de CM recém-diagnosticados, 7% ocorrem em mulheres com menos de 40 anos de idade, e 25% ocorrem em mulheres na pré-menopausa (31). A quimioterapia pode prolongar a taxa de sobrevivência das pacientes, e é um tratamento sistêmico padrão importante para a maioria das mulheres com CM, principalmente para as mulheres jovens na pré-menopausa. Porém, como consequência da quimioterapia, as mulheres que estão na pré-menopausa poderão desenvolver amenorreia transitória ou permanente induzida pelos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento (32). O principal impacto da amenorreia na vida das mulheres é a infertilidade (33).

Embora a amenorreia não diminua a expectativa de vida da paciente tratada para o CM, ela afeta negativamente a qualidade de vida destas mulheres, principalmente das mais jovens, e que ainda desejam ter filhos. Desta forma, é essencial que o oncologista considere este efeito colateral na escolha do regime quimioterápico ideal para a paciente (34).

A incidência de amenorreia induzida pela quimioterapia está associada com o tipo, a duração, a programação, e a dose de quimioterapia utilizada, e está relacionada também à idade da paciente. Pacientes com idade superior a 40 anos têm mais chances de

desenvolverem amenorreia quando comparados com mulheres mais jovens (35). No entanto, ainda não se sabe o impacto individual de cada quimioterápico na indução da amenorreia (32, 36).

Alguns estudos reportam que regimes quimioterápicos contendo antracíclicos causam menor incidência de amenorreia quando comparados com regimes como o CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil), que não contém antraciclina (37). Martin et al mostrou em seu estudo (38) maiores incidências de amenorreia em regimes que continham o docetaxel. O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Zhao et al (31). Porém resultados opostos, onde regimes contendo docetaxel causavam menores incidências de amenorreia, foram reportados em outros estudos (39, 40). Ou seja, a relação entre o docetaxel e amenorreia ainda é controversa.

A principal causa da amenorreia induzida por quimioterapia é a diminuição do número de folículos ovarianos, devido a danos causados no ovário. Os ovários contêm uma reserva finita de folículos primordiais, que são progressivamente liberados a cada ovulação durante a vida reprodutiva da mulher (41). Estes folículos não podem se regenerar, e alguns antineoplásicos aceleram a perda dos folículos, levando à falência ovariana e subsequente infertilidade e menopausa precoce. Porém os mecanismos exatos sobre como estes danos são causados nos ovários ainda não estão esclarecidos (33, 42).

1.5 Falência Ovariana Induzida por Quimioterapia

A Falência Ovariana Induzida por Quimioterapia (FOIQ) é uma consequência grave do tratamento para o CM, que afeta de 53 a 89% das pacientes (12). Os sintomas comuns da FOIQ podem incluir amenorreia (transitória ou definitiva), atrofia dos órgãos sexuais, diminuição do nível de estrogênio, e vários graus de sintomas peri-menopausa, como calores, colpoxerose e diminuição da libido (43). As principais consequências da FOIQ são a infertilidade, além de complicações tardias relacionadas à diminuição do estrogênio, como a osteoporose e doenças cardiovasculares (44). Dentre as preocupações dos oncologistas para a FOIQ estão definir um biomarcador para a doença, e esclarecer os mecanismos que a causam (45).

De uma forma generalizada, pode-se dizer que a quimioterapia aumenta em 10 anos a vida do ovário, em termos de função reprodutiva, pois leva à rápida depleção dos folículos ovarianos (46). Porém, não apenas os folículos são afetados, como também o estroma ovariano (47). A quimioterapia pode induzir a apoptose dos ovócitos, destruir a estrutura dos folículos, e levar à atresia folicular, além da necrose e fibrose dos tecidos ovarianos (48).

Os ovários são sensíveis a estímulos internos e externos, e podem sofrer danos por diversos fatores físicos e/ou químicos. Mulheres com câncer, na pré-menopausa, tratados por quimioterapia podem desenvolver FOIQ devido à baixa especificidade dos quimioterápicos às células cancerosas. Por esta razão as células sadias podem também sofrer danos, especialmente as células germinativas, com alta taxa de mitose (43).

Alguns agentes quimioterápicos mostraram-se prejudiciais à fertilidade, porém a extensão do dano é dependente do fármaco usado, e da dose aplicada no paciente (49). Estudos prévios mostraram que a ciclofosfamida tem um efeito gonadotóxico significativo, apresentando altas taxas de falência ovariana em pacientes tratadas antes da menopausa (50). Em relação aos taxanos, como o docetaxel, os estudos sobre seus efeitos na fertilidade das pacientes são limitados (51). Embora ensaios clínicos anteriores não mostrem nenhum efeito dos taxanos sobre a menstruação (52, 53), um estudo mais recente, com mais pacientes, mostrou um aumento nas taxas de amenorréia em pacientes tratadas com docetaxel (54).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo estudar os efeitos tardios no ovário causados pelo tratamento com a associação dos quimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida, em modelo experimental com ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Após o tratamento com os quimioterápicos, foi realizada:

- a) Avaliar a massa uterina e dos ovários;
- b) Dosar o nível sérico de estradiol;
- c) Caracterizar a resposta inflamatória no tecido ovariano;
- d) Identificar a apoptose no tecido ovariano;
- e) Avaliar o processo de fibrose no estroma ovariano.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade aproximada de três meses (jovens adultas), pesando entre 190 e 210 gramas foram mantidas em biotério, com ciclo de luminosidade e temperatura controladas. Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas, contendo serragem, e receberam água potável e ração *ad libitum*. As ratas foram divididas em dois grupos, cada um contendo 10 ratas: grupo controle e grupo TC (ratas tratadas com quimioterapia). Esse número foi adotado em virtude do tamanho de amostra ser suficiente para se testar a normalidade dos dados, dentro de cada amostra e, dessa forma, se escolher o teste estatístico apropriado para análise dos resultados. A distribuição dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi realizada de forma randômica. Porém todos os animais encontravam-se na fase estro do ciclo estral, o que foi verificado através de esfregaço vaginal diário, durante 1 semana antes do início do tratamento. Os animais foram manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, com protocolo aprovado CEUA/033/2013.

3.2 Quimioterapia

No grupo TC, os quimioterápicos docetaxel e ciclofosfamida foram administrados separadamente pela via intraperitoneal (ip), com os animais previamente anestesiados com ketamina/xilazina (80/15mg/kg). Foram realizados 4 ciclos TC, com intervalo de 7 dias entre eles. Cada animal recebeu 50mg/Kg de ciclofosfamida e 12,5 mg/Kg de docetaxel. A dose administrada para cada uma das drogas, em cada ciclo, foi calculada adequadamente para ser equivalente à dose por ciclo de quimioterapia em humanos (55). O grupo controle recebeu volume de solução NaCl 0,9% equivalente ao volume de quimioterápico, também em 4 ciclos espaçados por 7 dias. A quimioterapia nos animais foi realizada no Centro de Terapia Oncológica (CTO), em Petrópolis, RJ.

3.3 Eutanásia

Após a administração de quimioterápicos (grupo TC) ou de solução salina (grupo controle), os animais retornaram às caixas de origem e permaneceram sob observação constante até a data da eutanásia (5 meses após o tratamento), com 9 meses de idade. A data foi escolhida, pois nesta idade as ratas são adultas, em período fértil, e os efeitos dos quimioterápicos avaliados serão tardios (56). No dia da eutanásia os animais foram anestesiados Ketamina/Xilazina (80/15mg/kg) e pesados. Posteriormente o útero e o ovário esquerdo foram retirados e pesados, o ovário esquerdo foi seccionado e guardado em fixadores específicos para a preparação das amostras, de acordo com a técnica a ser empregada. Além da coleta de sangue para análise sérica de estradiol.

3.4 Avaliação da massa uterina e massa do ovário

Após a retirada do útero e do ovário esquerdo, estes foram separadamente pesados pelo método de Scherle (57), em uma balança analítica (Digipeso DP-3000, Denver Instrument AA- 160). Foi feita então a relação, por animal, da massa do útero/massa corporal e da massa do ovário (esquerdo)/massa corporal.

3.5 Dosagem de Estradiol

A dosagem de β -estradiol foi realizada por radioensaio específico (RIA) nas amostras de plasma obtidas dos animais de ambos os grupos. Todas as análises de β -estradiol (MP Biomedicals, Inc., CA, USA) foram executadas em duplicata, conforme indicação do fabricante. A detecção da radioatividade foi efetuada em contador gamma (Gamma-C12, USA). As concentrações plasmáticas desses hormônios foram expressas em pg/mL. A dosagem deste hormônio foi realizada no Laboratório de Análises Morfofuncionais,

no Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

3.6 Análises histológicas

Após a pesagem, conforme descrito no item 3.4, fragmentos dos ovários esquerdos foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em cortes de 5 μm de espessura em micrótomo, marca Microm modelo HM 325. As imagens digitais foram adquiridas usando a câmera de alta resolução Zeiss AXIOCAM HRc (Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio Zeiss AXIO SCOPE A.1 (Jena, Alemanha).

3.6.1 Imunohistoquímica

Foi realizada imunohistoquímica para anticorpos específicos, conforme ilustrado na tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica

ANTICORPO	FABRICANTE	DILUIÇÃO	CÓDIGO
Caspase 3	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Sc 2022140
TGF-β1	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Sc146
TNF-α	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Sc 1350
Col-I	Abcam	1:200	Ab292
Col-III	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Sc 28888

TGF- β 1, Fator Transformador de Crescimento β 1; TNF- α , Fator de Necrose Tumoral; Col I, colágeno tipo I; Col III, colágeno tipo III.

Os cortes de ovários foram obtidos conforme especificado no item 3.6 e recolhidos em lâminas. Após a desparafinização em estufa a 37°C por 30 min, as lâminas passaram por 3 banhos em xileno (por 2 minutos cada). Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes de etanol. (100%, 90% e 70%) e água destilada (2 minutos cada

banho). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15 minutos, com peróxido de hidrogênio 3%. A retirada do excesso de peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada com 3 banhos em tampão fosfato salino (PBS) de 5 minutos cada. Foi realizada recuperação antigênica, onde as lâminas ficaram imersas na solução tampão tripsina pH 8,0 a 60°C. As amostras foram incubadas com tampão fosfato salino/albumina sérica bovina (PBS/BSA) a 3% por 20 minutos para que ocorresse o bloqueio de sítios inespecíficos. Após este intervalo de tempo ocorreu a incubação da amostra com o anticorpo primário específico, diluído na proporção citada na tabela 1, em PBS/BSA a 1%, overnight a 4°C. Em seguida foi realizada a incubação do anticorpo secundário, conjugado com biotina (DAKO®, K400611, Califórnia, USA) durante 30 minutos.

Posteriormente foi feita a incubação com streptavidina (K400611, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), por 40 minutos. E após a lavagem com PBS, foi aplicada uma gota de 3,3-diamino-benzidine (DAB) (K3466, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Após 20 segundos a reação com o diaminobenzidina (DAB) foi interrompida com água destilada. O material foi contra corado com Hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA), e visualizadas com o equipamento descrito no item 3.6

3.6.2 Quantificação da Imunohistoquímica

Para quantificar a expressão das proteínas descritas na tabela 1, foram capturados 10 campos por lâmina montadas de acordo com o item 3.6.1, sendo analisadas 3 lâminas para cada cada um dos 5 animais por grupo, ou seja, um total de 30 campos capturados por animal, os campos escolhidos foram aleatórios incluindo tanto a região de córtex como a de medula. Os campos foram capturados e visualizados com o equipamento descrito no item 3.6, com uma objetiva de 100x. As imagens foram quantificadas utilizando-se o software Image Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD). No Image Pro Plus, após obtenção das imagens, em cada imagem foi selecionada a cor referente à imunomarcção (acastanhado) e utilizada a ferramenta máscara, que transforma a cor selecionada em branco e o restante em preto. Após isso foi feita a verificação da porcentagem de branco na imagem, que é equivalente a

porcentagem da imunomarcação. Os dados da quantificação das expressões das proteínas foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

3.6.3 Identificação de Mastócitos

A coloração com o corante azul de toluidina permite a visualização de mastócitos. Esta célula contém, no seu citoplasma, numerosos e pequenos grânulos que armazenam grande quantidade de proteoheparina e histamina. A heparina, altamente sulfatada, é revelada pelo azul de toluidina produzindo o fenômeno da metacromasia (58).

Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) e água destilada (2 minutos cada banho). As lâminas foram então incubadas em solução aquosa de azul de toluidina a 0,2% (Sigma-Aldrich, MA, USA), e acidificadas por 2-3 minutos até que o pH fosse de 2.3. As lâminas foram lavadas em água destilada, e rapidamente desidratadas em um banho de álcool 95%, e dois banhos de álcool 100% (30 segundos cada). As secções então foram diafanizadas em xileno, e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA). Os mastócitos adquiriram cor púrpura/violeta, e o fundo da lâmina permanece levemente azulado. As imagens foram obtidas conforme descrito no item 3.6.

3.6.4 Apoptose (método TUNEL)

A detecção de apoptose foi realizada através do método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit ApopTag® Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit (Merck Millipore, MA, USA)

Após a desparafinização, os cortes foram hidratados com banhos decrescentes etanol (100%, 90% e 70%) e água destilada (2 minutos cada banho). Após o banho de água destilada, as lâminas foram transferidas para câmara úmida. A permeabilização da membrana nuclear foi realizada através de dois pré-tratamentos, um com Triton (Sigma-Aldrich, MA,

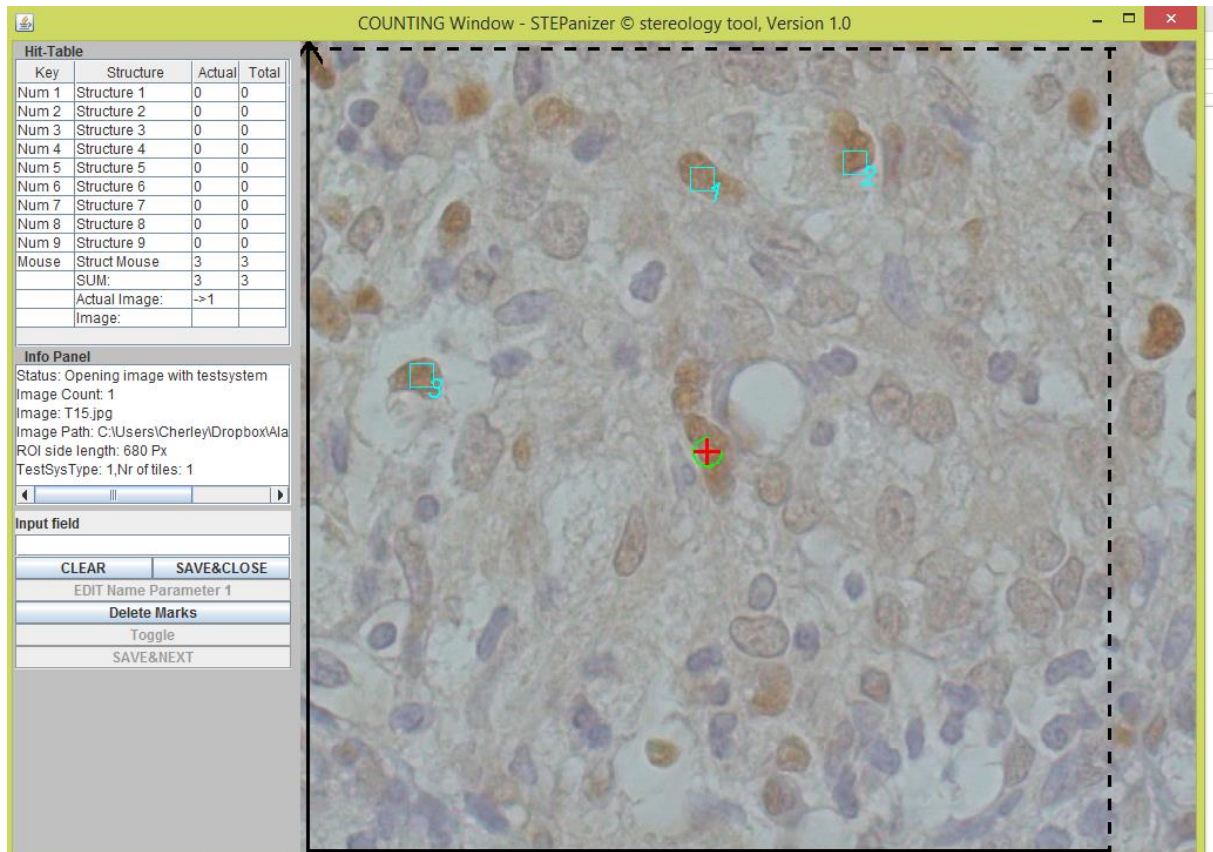
USA) 100x 0,1% em 0,1% de citrato de sódio por 2 minutos no gelo e outro com proteinase K (Sigma-Aldrich, MA, USA) por 15 minutos, entre os pré-tratamentos foram realizados 3 banhos em tampão PBS de 5 minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por 15 minutos, através do peróxido de hidrogênio a 3%. Foi utilizado o *Equilibration Buffer* (fornecido pelo fabricante) por 10 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas o anticorpo primário deoxynucleotidyl transferase (TDT, fornecido pelo fabricante) em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após esta etapa foi aplicado o *Stop/Wash Buffer* (fornecido pelo fabricante) por 10 minutos, a retirada do excesso de solução foi feita através de 3 banhos em tampão PBS de 1 minuto cada. Seguidamente foi realizada a incubação com o anticorpo secundário *anti-digoxigenin* (fornecido pelo fabricante) durante 1 hora, e retirado o excesso do anticorpo secundário através de 3 banhos em tampão PBS de 2 minutos cada. Após essas lavagens foi aplicada uma gota de DAB (K3466, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), durante 20 segundos. A reação com o DAB foi interrompida através da colocação das lâminas em água destilada. O material foi contra corado com Hematoxilina por 1 minuto. Após a contra coloração as amostras foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan (Merck Millipore, MA, USA). O resultado final desta técnica mostra os núcleos apoptóticos nos cortes, com coloração marrom/castanho. As lâminas foram visualizadas com o equipamento descrito no item 3.6.

3.6.5 Quantificação de núcleos apoptóticos e de mastócitos

Utilizou-se a técnica de estereologia com o objetivo quantificar os núcleos apoptóticos e os mastócitos. Desta forma, para cada grupo foram analisados 5 animais, para cada animal 3 lâminas, e para cada lâmina, foram obtidas imagens digitais de 10 campos aleatórios, incluindo área de córtex e medula, de forma a permitir a análise estatística correta. As imagens digitais foram adquiridas no equipamento mencionado no item 3.6. Para o cálculo dos parâmetros estereológicos foi utilizada uma área teste, com duas linhas proibidas, conforme figura 3. As análises foram realizadas online, através do sistema STEPanizer (www.stepanizer.com)(59). Foi realizada a contagem de mastócitos e de núcleos apoptóticos, separadamente, na área teste em todos os campos capturados. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo de núcleos por área (Q_A):

$$Q_A = \frac{n^{\circ} \text{ núcleos na área teste}}{\text{área teste } (\mu\text{m}^2)}$$

Figura 3 - Exemplo de imagem utilizada para a análise estereológica através do STEPanizer (as linhas proibidas são as linhas contínuas)



Fonte: O autor, 2015.

3.7 Análises Ultraestruturais

3.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a eutanásia, fragmentos de cada ovário esquerdo foram fixados em glutaraldeído 2,5% e após 48 horas de fixação passou por 3 banhos em tampão cacodilato de 15 minutos cada. Foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio durante 60 minutos. Decorrido os 3 banhos de tampão cacodilato, foi realizada uma etapa de

desidratação das amostras com banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%). A partir da desidratação foram realizadas as etapas de ponto crítico (que consiste na substituição do solvente por CO₂) no aparelho Critical Point Dryer CPD2 e metalização (camada fina de material condutor sobre a amostra) no aparelho Sputter Coater 108 Cressington. Após essas etapas o material foi visualizado no microscópio eletrônico de varredura LEO 1450 VP.

3.7.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após a eutanásia, fragmentos de cada ovário esquerdo foram fixados em glutaraldeído 2,5% e após 48 horas de fixação passou por 3 banhos em tampão cacodilato de 15 minutos cada. Foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio durante 60 minutos. Decorrido 3 banhos de tampão cacodilato, foi realizada uma etapa de desidratação das amostras com banhos de 30 minutos em concentrações crescentes de acetona P.A. (30%, 50%, 70%, 90% e dois banhos de 100%). Após a etapa de desidratação ocorreu o processo de infiltração da resina EPOXI no material, através de banhos em concentrações crescentes da resina EPOXI e acetona P.A. (1:2; 1:1 e 2:1, respectivamente) por 2 horas cada. Posteriormente foram realizados 2 banhos de resina pura, onde o primeiro fica overnight e o segundo dura 6 horas, após isso incluiu-se o material em formas de silicones com a resina e os mesmos foram colocados na estufa a 60°C por 48 horas para ocorrer a polimerização da resina. Após a polimerização foram realizados os cortes semifinos (Leica Microsystems - USA), para escolha da região a ser analisada, em seguida foram feitos cortes ultrafinos (Leica Microsystems - USA), esses cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente visualizados no microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss do Brasil modelo EM 906.

3.8 **Análise Estatística**

Os dados foram expressos como a média e seu erro padrão associado (EPM). A homogeneidade das variâncias foi confirmada através do teste de Bartlett. As diferenças entre

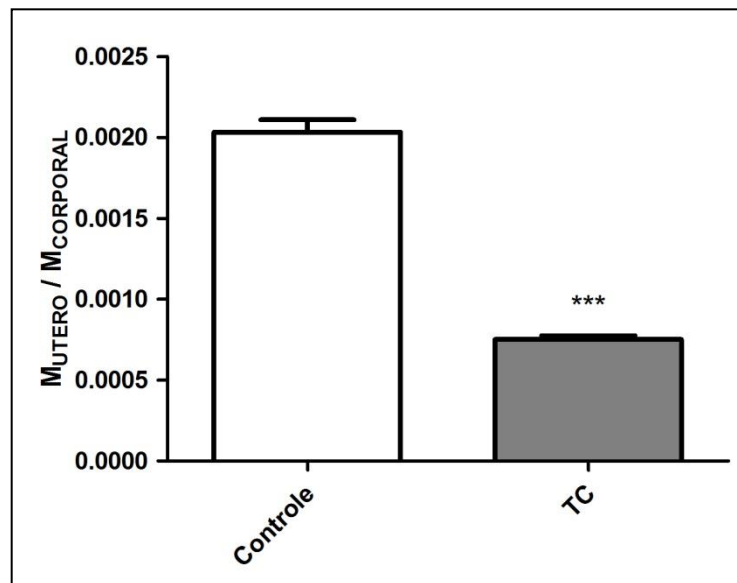
os grupos foram analisadas através do teste t-Student, bicaudal, não pareado. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism, versão 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da massa uterina e massa do ovário

Foram obtidas as massas dos úteros e dos ovários esquerdos, normalizadas pelas massas corporais correspondentes, dos animais de ambos os grupos. Conforme se pode observar na Figura 4, houve uma redução significativa de 67% na massa dos úteros dos animais do grupo TC ($0,0007 \pm 0,0001$) em relação ao controle ($0,0021 \pm 0,0001$). Em relação aos ovários, conforme ilustra a Figura 5, não houve alteração significativa.

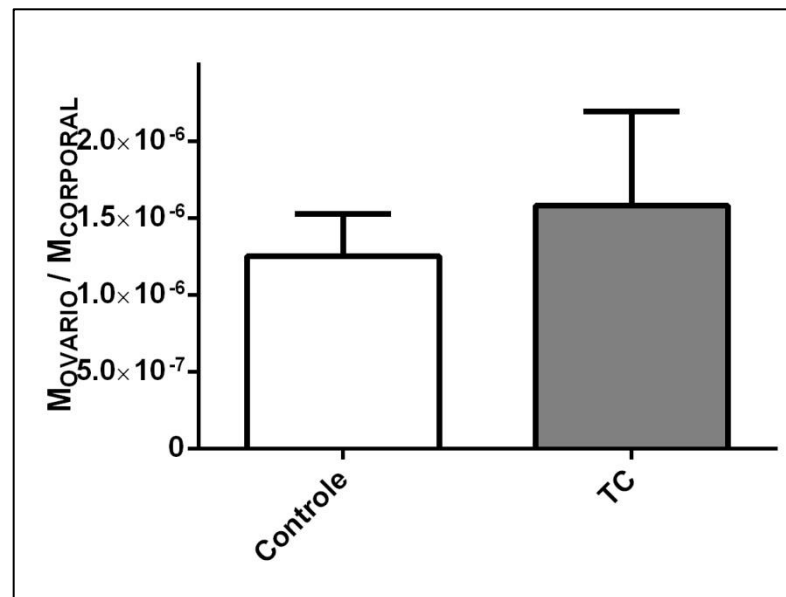
Figura 4 - Média da massa do útero normalizada pela massa corporal dos animais dos grupos controle e TC



Legenda: As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 5 - Média da massa do ovário esquerdo normalizada pela massa corporal dos animais dos grupos controle e TC

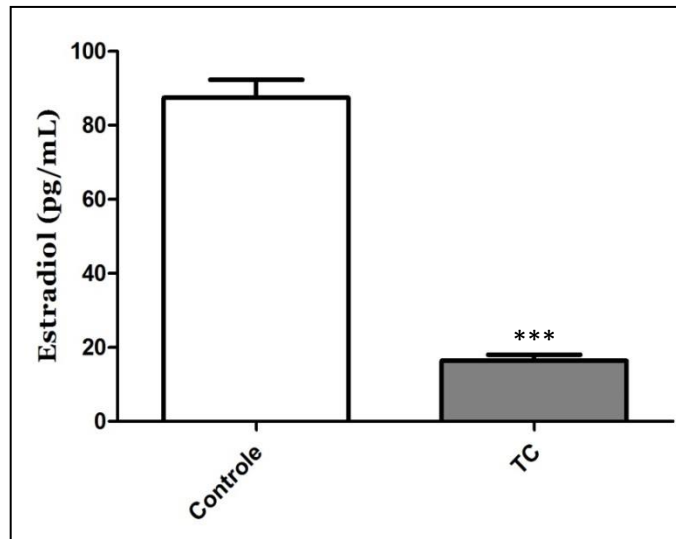


Legenda: As barras de erro representam o EPM.
Fonte: O autor, 2015.

4.2 Dosagem de Estradiol

Foi realizada a análise da concentração do hormônio β -estradiol sérico, através da técnica de RIA. Os resultados obtidos mostraram uma redução significativa de 83% na concentração deste hormônio no grupo TC ($13,50 \pm 1,44$) em relação ao grupo controle ($81,25 \pm 5,93$), conforme mostra a Figura 6.

Figura 6 - Média da concentração sérica de estradiol dos animais dos grupos controle e TC



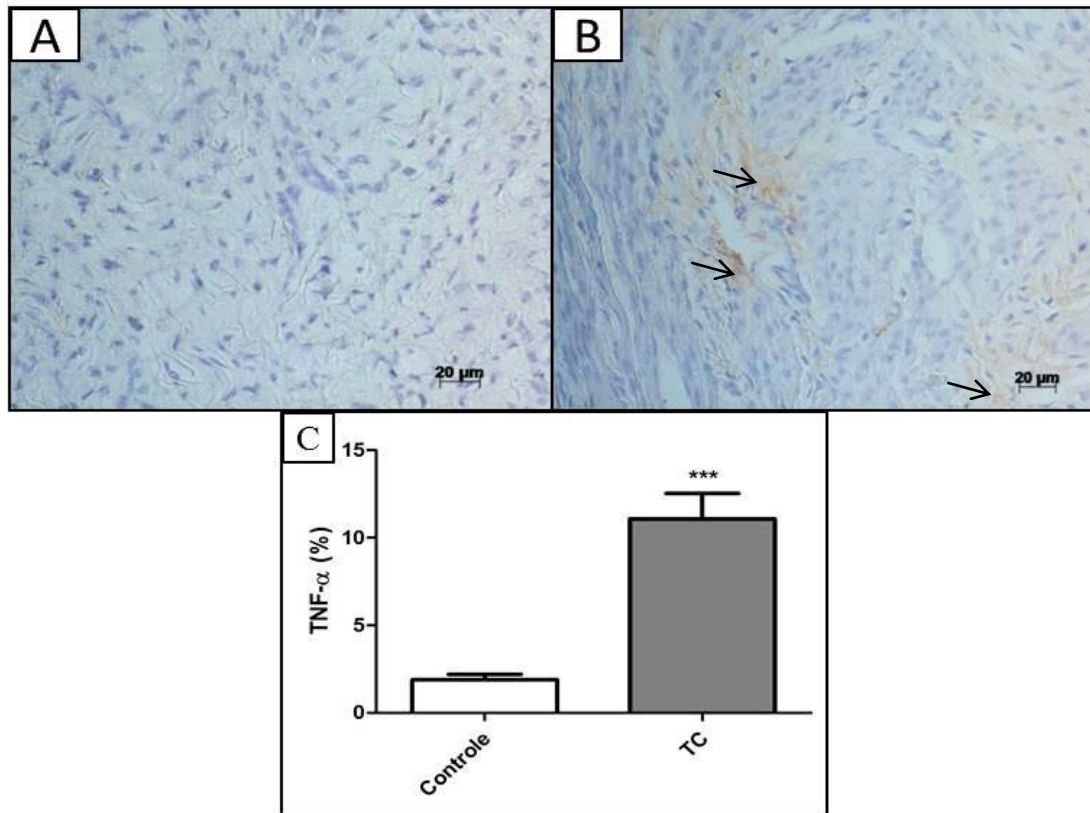
Legenda: As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015.

4.3 Análise do processo inflamatório

O processo inflamatório foi analisado mediante a avaliação da concentração de TNF- α , através de imunohistoquímica, e também da contagem de mastócitos, corados com a técnica de Azul de Toluidina, no estroma ovariano. O resultado obtido, conforme a Figura 7, mostra que houve um aumento significativo na concentração de TNF- α no grupo TC ($11,08 \pm 1,45$) quando comparado com o grupo controle ($1,89 \pm 0,29$).

Figura 7 - Análise da expressão de TNF- α

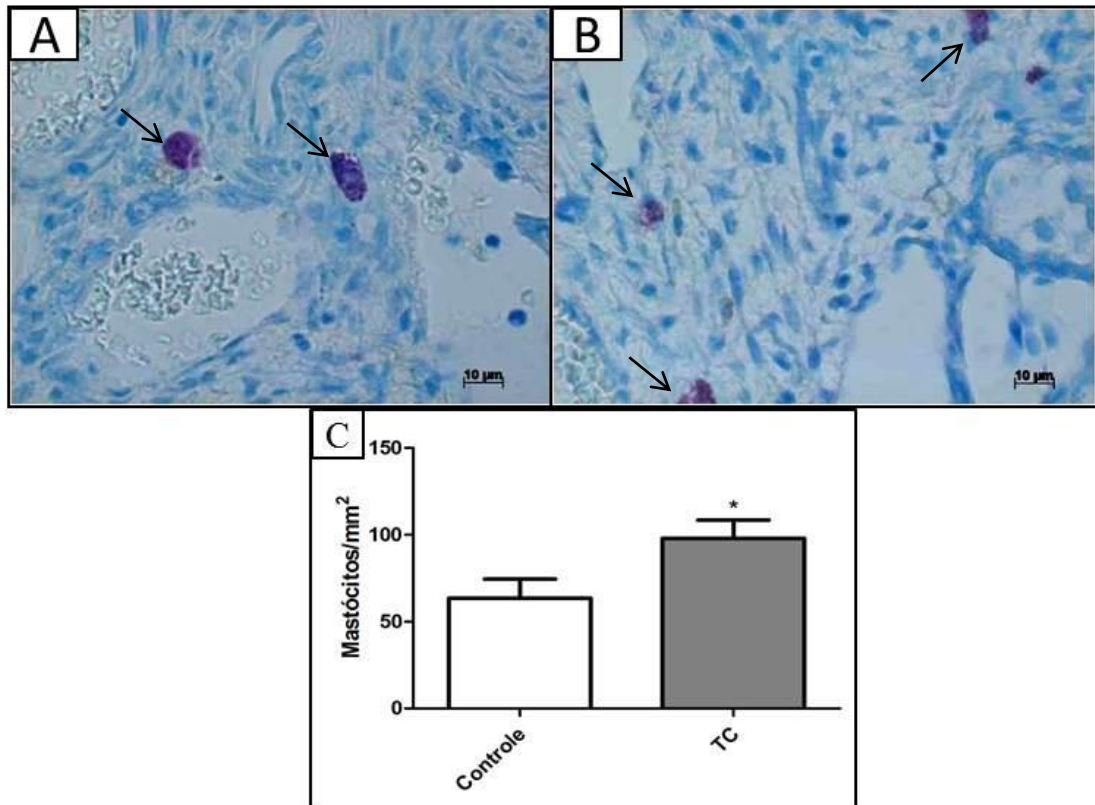


Legenda: Fotomicrografias do estroma ovariano após imunohistoquímica para TNF- α . A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram as regiões imunomarcadas em marrom. C) Quantificação da marcação positiva para TNF- α . As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015.

Os resultados obtidos para a contagem de mastócitos no estroma ovariano mostraram um aumento significativo deste tipo celular nos animais do grupo TC (98 ± 10), quando comparados com o controle (63 ± 11), conforme ilustrado na figura 8.

Figura 8 - Contagem de mastócitos no estroma ovariano



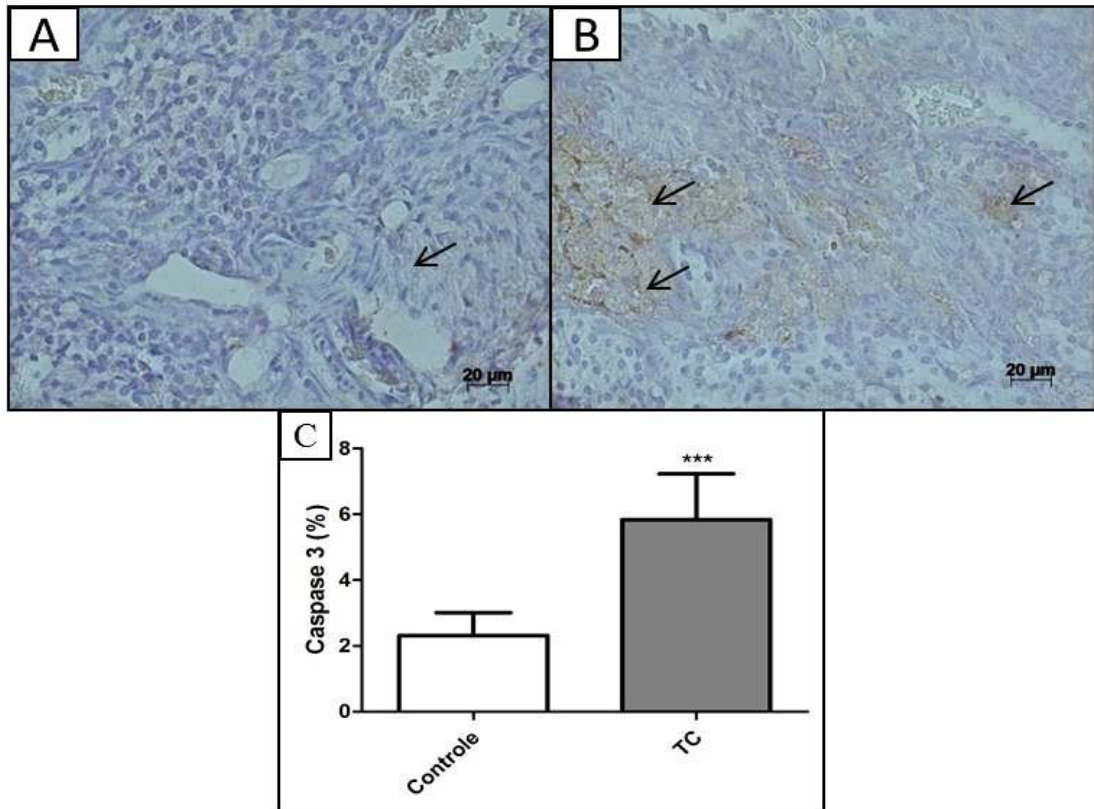
Legenda: Fotomicrografia do estroma ovariano após coloração com Azul de Toluidina A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram os mastócitos corados em violeta. C) Quantificação do número de mastócitos. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (*) = $p \leq 0,05$.

Fonte: O autor, 2015.

4.4 Análise da Apoptose

Para melhor estabelecer os mecanismos envolvidos na FOIQ estudou-se a participação da apoptose neste processo por meio da imunohistoquímica para caspase-3, e também pela técnica de TUNEL. A quantificação da concentração de caspase-3 no estroma ovariano mostrou que o grupo tratado ($5,84 \pm 1,39$ %) teve um aumento de 149% na expressão desta proteína, quando comparado com o grupo controle ($2,31 \pm 0,70$ %), como ilustra a Figura 9.

Figura 9 - Análise da Caspase-3 no estroma ovariano

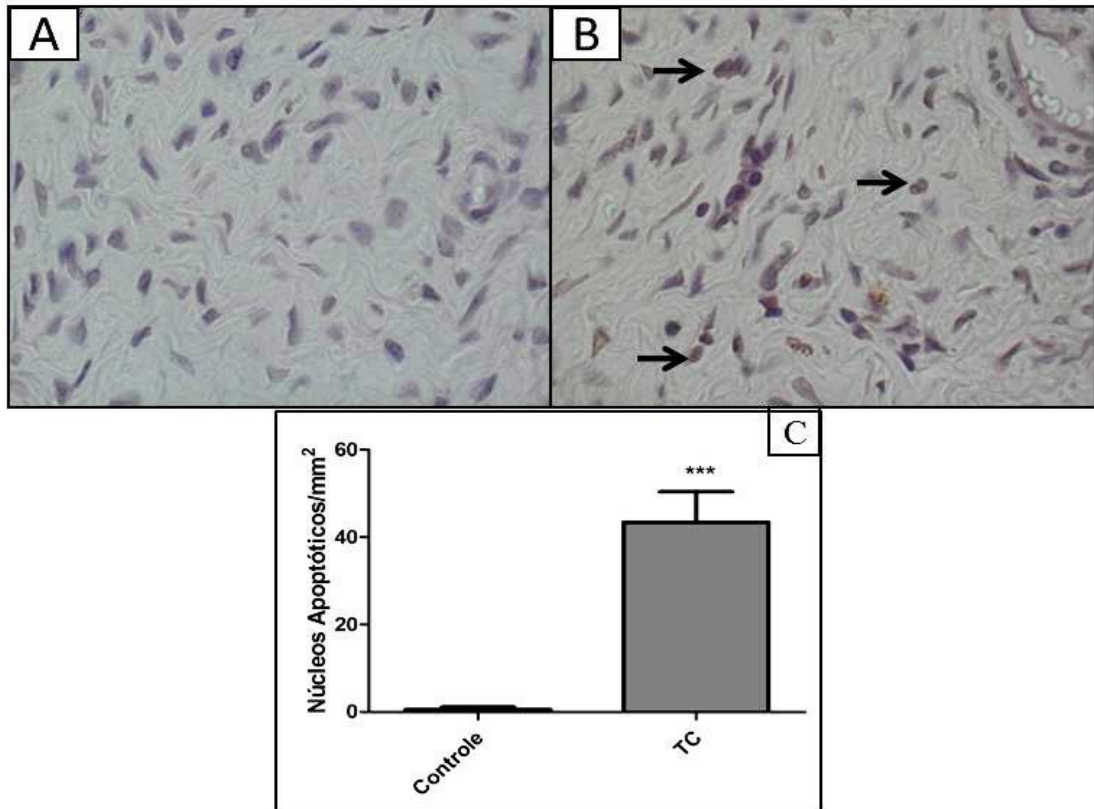


Legenda: Fotomicrografias do estroma ovariano após imunohistoquímica para caspase-3. A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram as regiões positivas para caspase coradas em marrom. C) Quantificação da marcação positiva para caspase-3. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015.

Os resultados obtidos para o número de núcleos apoptóticos por μm^2 , pela técnica de TUNEL, mostraram um aumento expressivo e significativo destes núcleos no grupo que recebeu quimioterapia ($43.42 \pm 6.94 \%$), quando comparado com o grupo controle ($1.07 \pm 0.02 \%$), conforme Figura 10.

Figura 10 - Análise de núcleos apoptóticos no estroma ovariano, pela técnica de TUNEL



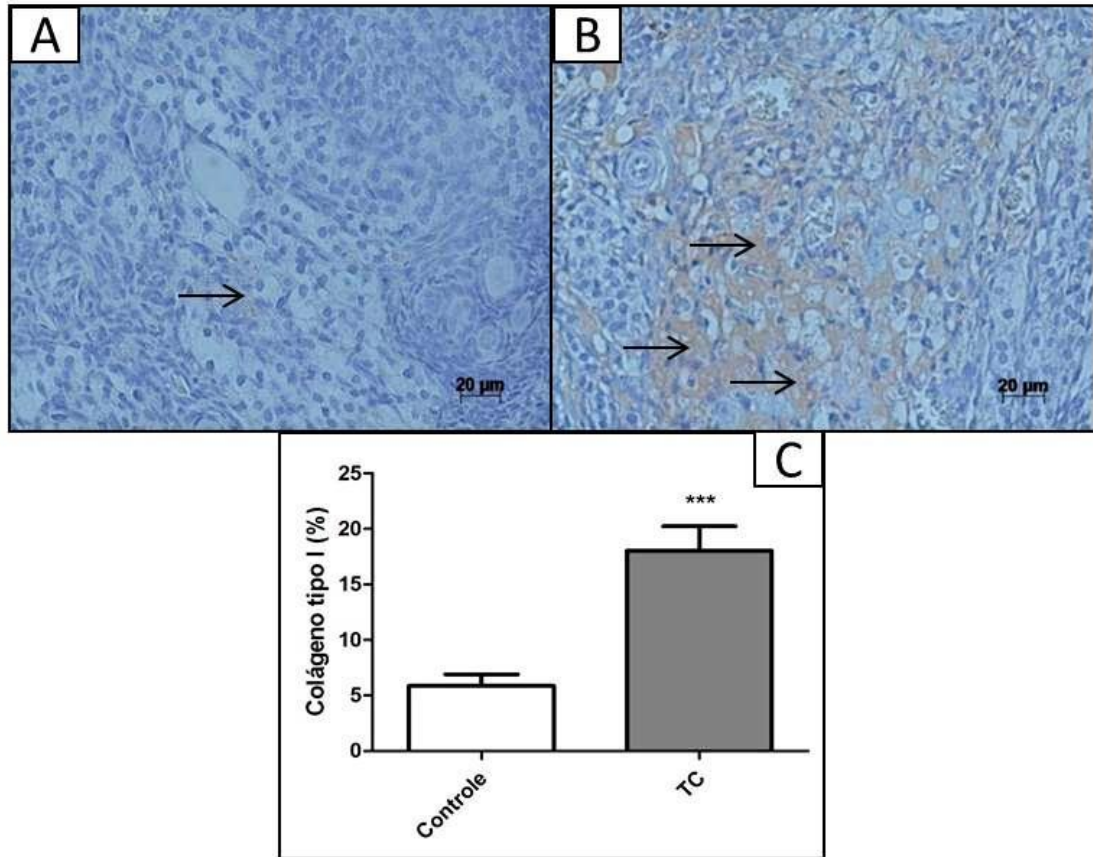
Legenda: A) Fotomicrografia do Grupo controle; B) Fotomicrografia do Grupo TC. As setas mostram os núcleos apoptóticos corados em castanho. C) Quantificação do número de núcleos apoptóticos por mm^2 . As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015

4.5 Análise da Fibrose

Foram avaliados alguns parâmetros envolvidos na formação de tecido fibrótico no estroma ovariano em função da quimioterapia. Os resultados mostraram um aumento de 208% de colágeno tipo I e de 148% de colágeno tipo III no ovário das ratas tratadas com o esquema TC ($86 \pm 1,04\%$ e $35,97 \pm 2,45\%$ respectivamente), em comparação com o grupo controle ($18,04 \pm 2,20\%$, $14,46 \pm 2,36\%$, respectivamente). As Figuras 11 e 12 mostram estes resultados.

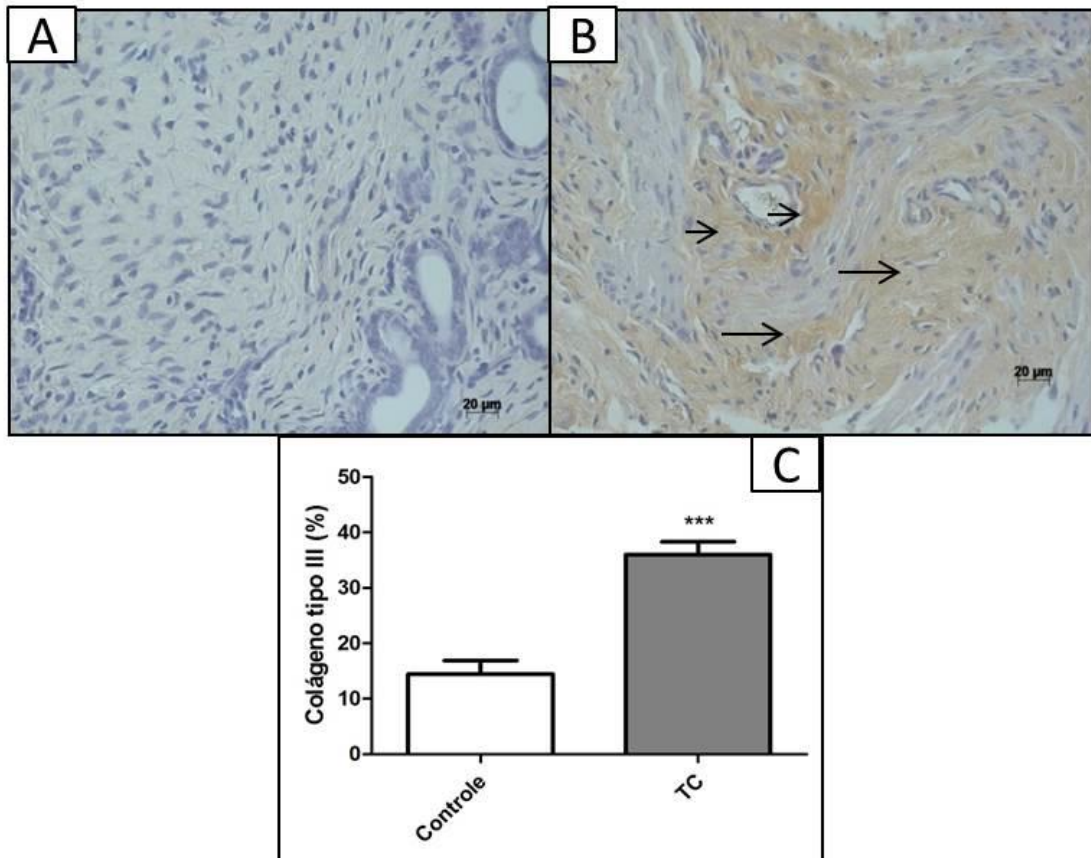
Figura 11 - Análise de colágeno tipo I no estroma ovariano



Legenda: Fotomicrografias após imunohistoquímica para colágeno tipo I. A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram as regiões positivas para colágeno tipo I coradas em marrom. C) Quantificação da marcação positiva para colágeno tipo I. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015

Figura 12 - Análise de colágeno tipo III no estroma ovariano

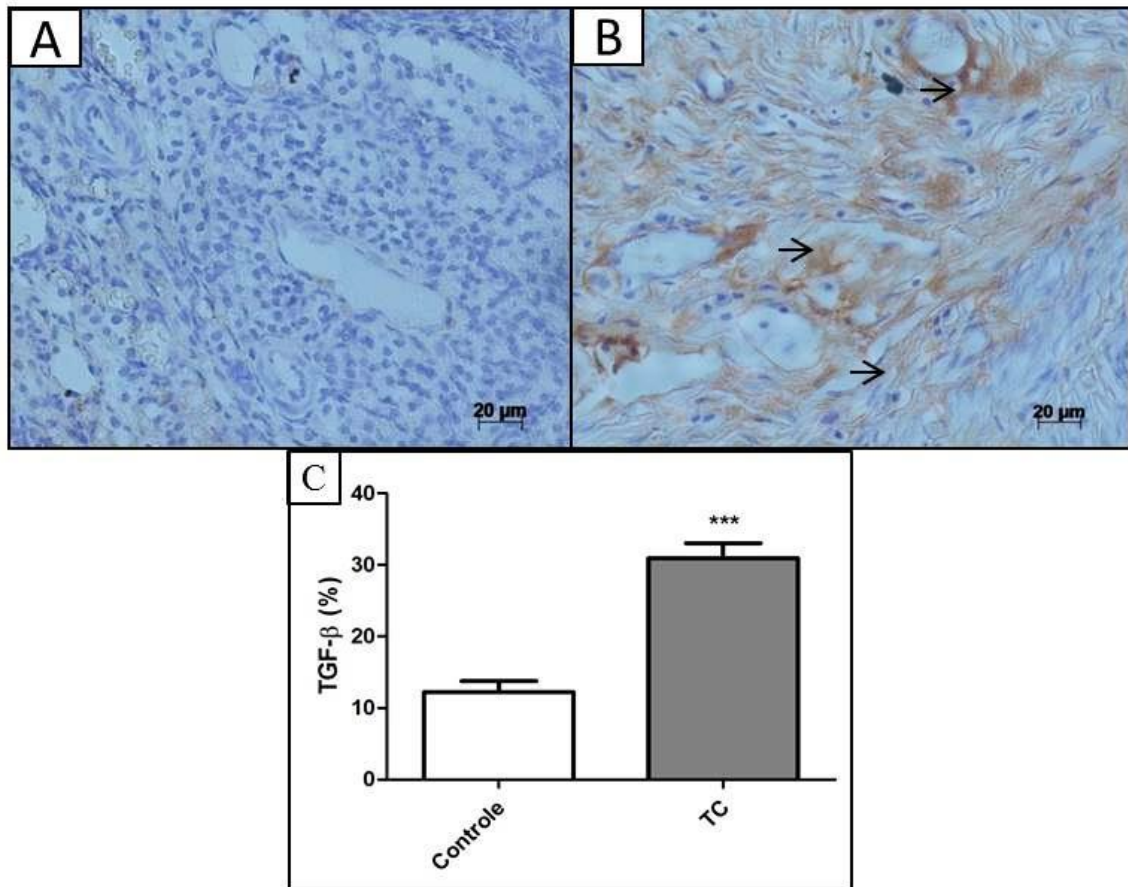


Legenda: Fotomicrografias após imunohistoquímica para colágeno tipo III. A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram as regiões positivas para colágeno tipo III as regiões coradas em marrom. C) Quantificação da marcação positiva para de colágeno tipo III. As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015

Foi também avaliada a participação da citocina pró-fibrótica TGF- β na FOIQ. Os resultados obtidos mostram um aumento de 153% na expressão desta citocina no grupo TC ($30,95 \pm 2,05$ %), quando comparado com o grupo controle ($12,23 \pm 1,53$ %), conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 - Análise de TGF- β no estroma ovariano. Fotomicrografias após imunohistoquímica para TGF- β

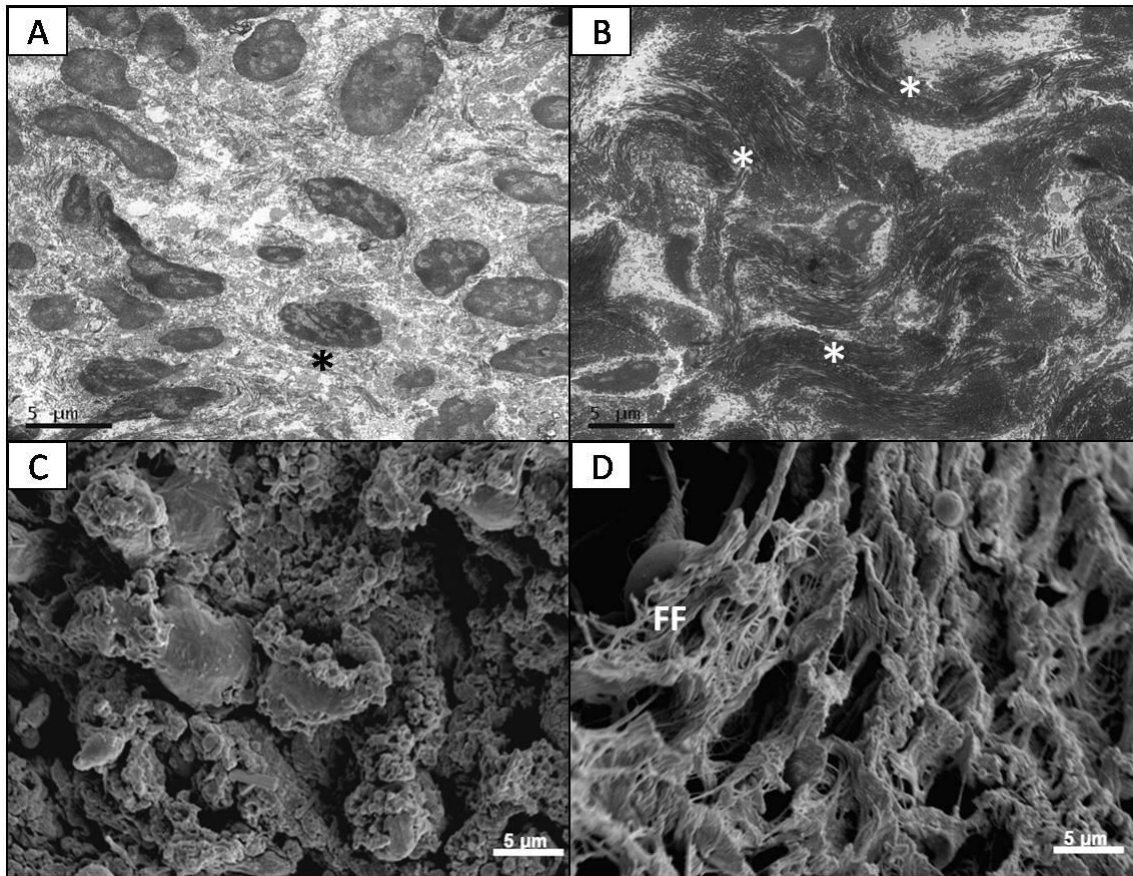


Legenda: A) Grupo controle; B) Grupo TC. As setas mostram as regiões positivas para TGF- β coradas em marrom.. C) Quantificação da marcação positiva para TGF- β . As barras de erro representam o EPM. Foram considerados estatisticamente significativos valores de (***) = $p \leq 0,001$.

Fonte: O autor, 2015

Avaliou-se também, qualitativamente, a ultraestrutura do tecido ovariano por MET e MEV. As principais alterações encontradas foram relativas à fibrose. Observou-se uma grande quantidade de feixes de fibras de colágeno nos animais tratados com quimioterapia, o que não foi observado nos animais do grupo controle. Além disso, é possível notar que o tecido do estroma ovariano estava desorganizado nos animais do grupo TC, quando comparado com o controle. A Figura 14 mostra esses resultados.

Figura 14. Análise ultraestrutural do estroma ovariano



Legenda: A) Imagem de MET e C) Imagem de MEV do grupo controle. Nota-se que o tecido está bem organizado com as fibras de colágeno distribuídas homogeneamente na matriz. B) Imagem de MET e D) Imagem de MEV grupo TC. Observa-se uma desorganização da matriz com presença de feixes de fibras de colágeno. Asterisco branco = fibras de colágeno, Asterisco preto = feixes de fibras de colágeno; FF- feixes de fibras de colágeno.

Fonte: O autor, 2015.

5 DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi analisar um importante efeito colateral tardio induzido pela quimioterapia para o tratamento de CM, a FOIQ. Esta doença afeta diversos pacientes, e pode causar danos de intensidade variável, dependendo do agente quimioterápico usado no tratamento (53, 60). A FOIQ causada pela ciclofosfamida já foi descrita em estudos anteriores. O principal mecanismo do dano causado no ovário por esta droga é a apoptose de células da granulosa e de oócitos (61-63). A ciclofosfamida vem sendo frequentemente associada ao docetaxel para o tratamento do CM, porém os efeitos de docetaxel no estroma ovariano ainda são desconhecidos. Por esta razão foi utilizado um modelo animal para estudar o efeito sinérgico dos dois fármacos, ciclofosfamida e docetaxel, no ovário.

Para melhor esclarecer os efeitos e causas da FOIQ no modelo estudado, testou-se a hipótese de que este dano seria causado por um processo inflamatório, induzido pelos quimioterápicos, que resultaria na morte por apoptose das células do estroma ovariano. Após esta etapa este tecido seria substituído por tecido fibroso, e sua função na produção de estrogênio estaria comprometida.

A fim de estudar a participação do processo inflamatório na FOIQ analisou-se a presença da citocina pró-inflamatória TNF- α e de mastócitos no estroma do ovário. Os mastócitos são um elemento importante na resposta da imunidade inata e adquirida. Após a um estímulo adequado, estas células sofrem ativação e subsequente degranulação, sintetizando e liberando substâncias pró-inflamatória, vasodilatadoras, quimiotáticas e citotóxicas. Entre estas substâncias está a citocina TNF- α . O papel dos mastócitos, como uma fonte importante de TNF- α , pode ser explicado pela sua capacidade única de armazenamento desta citocina pré-sintetizada nos grânulos citoplasmáticos, que permite a sua libertação imediata após um estímulo (64, 65). Estudos anteriores mostram que o TNF- α desempenha um papel importante também na fisiologia ovariana. O aumento desta citocina está diretamente relacionado com a atresia folicular, o que pode levar à falência ovariana prematura(66).

A relação do TNF- α com o quimioterápico ciclofosfamida foi estudada por El-Sheikh et al. Estes autores analisaram o plasma e o fígado de ratos tratados com ciclofosfamida, e encontraram maiores concentrações de TNF- α , quando comparado com o grupo que não

recebeu o quimioterápico (67). Em outro estudo, Sprowl JA et al. observaram que o docetaxel estimulava a síntese de TNF- α em células de carcinoma de ovário A2780, e que esta citocina estava fortemente associada com a indução de apoptose (68). Os resultados encontrados no presente estudo mostram o aumento do número de mastócitos e o aumento da expressão de TNF- α no estroma ovariano dos animais do grupo TC, quando comparado com o grupo controle, associando um processo inflamatório ovariano à administração dos quimioterápicos.

O processo inflamatório gerado no ovário teve como provável consequência a apoptose das células do estroma. De fato estudos anteriores mostram a associação entre TNF- α e a morte celular programada (69-71). Em um mecanismo ainda não completamente descrito, o TNF- α em associação com outras citocinas participa da formação de um complexo intracelular que cliva e ativa as caspases 3, 6 e 7 (72). As caspases representam uma família de proteases, cujas ações estão diretamente ligadas aos estágios iniciais e finais da apoptose. A caspase-3 é ativada nas células tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca (73). No presente estudo observou-se um aumento significativo do número de núcleos apoptóticos e também da imunomarcação da caspase-3 no estroma ovariano das ratas tratadas com quimioterapia. Um estudo realizado por Vital-Reyes V et al (74), realizado em mulheres na idade fértil, mostrou que aquelas com diminuição da reserva de folículos primordiais apresentavam expressão aumentada da caspase-3 e 8 no estroma ovariano, quando comparado com mulheres sem a diminuição dos folículos. Os autores sugerem que a infertilidade feminina possa estar relacionada com a apoptose não apenas dos folículos primordiais, mas também do estroma e das células musculares lisas dos vasos ovarianos.

O aumento do número de núcleos apoptóticos pode ter como consequência o aumento da secreção da citocina TGF- β e, em um processo cíclico o próprio aumento da expressão desta citocina no tecido estimula a secreção de mais TGF- β (75). O TGF- β é uma citocina regulatória, importante no reparo tecidual, e sua contínua produção está relacionada à fibrose. Próximo à lesão tecidual o TGF- β (liberado por linfócitos, plaquetas, macrófagos ativados, e fibroblastos) aumenta a deposição de matriz extracelular para reparar os danos. Isto ocorre devido ao estímulo na produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, inibição da síntese de proteases e estímulo da síntese de inibidores de proteases. Durante repetidos danos, há uma contínua autoindução na produção de TGF- β , levando à contínua produção de matriz extracelular e à fibrose do tecido (76, 77).

Um estudo realizado por Zhang et. al (78) mostrou que o desenvolvimento da fibrose no ovário é dependente do TGF- β . Ratas com síndrome do ovário policístico, com fertilidade

diminuída, mostram alterações significativas na morfologia ovariana, apresentando grande acúmulo de colágeno no estroma. Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram os resultados de Zhang et. al. As ratas do grupo TC mostraram aumento da expressão de TGF- β no estroma ovariano, associado ao aumento de colágeno tipo I e tipo III. A fibrose tecidual é caracterizada por acúmulo de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, seguida do desequilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz (79). A estes resultados obtidos por microscopia de luz, somam-se os resultados da microscopia eletrônica que evidenciaram a desorganização do tecido ovariano das ratas deste grupo. Observou-se, qualitativamente, um aumento de feixes de fibras de colágeno no tecido. Estes resultados em conjunto sugerem um processo de fibrose no estroma ovariano.

Os resultados da aferição da massa do útero, normalizada pela massa corporal, evidenciaram uma diminuição na massa uterina nas ratas tratadas com quimioterapia. Essa redução da massa uterina pode estar relacionada à falência da função ovariana, assim como foi observado no estudo de Zhang et al. (78), que evidenciou fibrose uterina associada à fibrose ovariana. E também com o estudo de Keiler AM et al. (80) que mostrou uma redução da massa uterina em ratas ovariectomizadas.

Neste trabalho também apresentamos um importante resultado funcional nas ratas tratadas com o poliquimioterápico TC: a redução significativa do nível de estradiol plasmático. Não existe, até o presente momento, uma definição para o diagnóstico preciso da FOIQ, porém o nível de estradiol plasmático é um importante biomarcador que pode ser associado à FOIQ (80). A administração destas drogas iniciam uma resposta inflamatória no ovário, resultando na apoptose das células do estroma ovariano, que são as principais responsáveis pela produção de estradiol (81, 82). Resultados similares, com a diminuição do estradiol plasmático, foram observados em mulheres com CM submetidas à quimioterapia; porém estes estudos foram realizados com agentes quimioterápicos diferentes (13, 51).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem confirmar a hipótese proposta para explicar como a combinação de ciclofosfamida e docetaxel, um recente regime quimioterápico proposto para o tratamento do CM, pode levar a importantes alterações no ovário. O processo inflamatório, desencadeado pela administração dos quimioterápicos, estimula a apoptose e liberação de TGF- β no estroma ovariano, que induz a produção de matriz extracelular e subsequente, substituição do tecido sadio por tecido fibrótico. A principal consequência deste processo é a diminuição, ou perda, da função ovariana, levando à menopausa precoce e possível infertilidade.

Este estudo é de suma importância para compreender os mecanismos envolvidos no tratamento do CM que levam à infertilidade das mulheres jovens submetidas à quimioterapia. Ao elucidar este efeito é possível estudar formas de evitá-lo.

REFERÊNCIAS

1. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [database on the Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.
3. INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância; 2014.
4. Surakasula A, Nagarjunapu GC, Raghavaiah KV. A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. *J Res Pharm Pract*. 2014;3(1):12-8.
5. Pan H, He Z, Ling L, Ding Q, Chen L, Zha X, et al. Reproductive factors and breast cancer risk among BRCA1 or BRCA2 mutation carriers: results from ten studies. *Cancer Epidemiol*. 2014;38(1):1-8.
6. Foucaut AM, Berthouze-Aranda SE, Touillaud M, Kempf-Lepine AS, Baudinet C, Meyrand R, et al. Reduction of health risk factors through an adapted physical activity program in patients with breast cancer. *Support Care Cancer*. 2014;22(4):1097-104.
7. Yan M, Lu HM, Liu ZZ, Liu H, Zhang MW, Sun XB, et al. High risk factors of brain metastases in 295 patients with advanced breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(7):1269-75.
8. Warner ET, Colditz GA, Palmer JR, Partridge AH, Rosner BA, Tamimi RM. Reproductive factors and risk of premenopausal breast cancer by age at diagnosis: are there differences before and after age 40? *Breast Cancer Res Treat*. 2013;142(1):165-75.
9. Warren Andersen S, Trentham-Dietz A, Gangnon RE, Hampton JM, Figueroa JD, Skinner HG, et al. The associations between a polygenic score, reproductive and menstrual risk factors and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(2):427-34.
10. Troisi R, Doody DR, Mueller BA. A linked-registry study of gestational factors and subsequent breast cancer risk in the mother. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22(5):835-47.
11. Ritte R, Tikk K, Lukanova A, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, et al. Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer: a cohort study. *Bmc Cancer*. 2013;13:584.
12. Tiong V, Rozita AM, Taib NA, Yip CH, Ng CH. Incidence of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Premenopausal Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer. *World J Surg*. 2014; 38(9):2288-96.

13. Partridge AH, Ruddy KJ. Fertility and adjuvant treatment in young women with breast cancer. *Breast*. 2007;16 Suppl 2:S175-81.
14. Huong DL, Amoura Z, Duhaut P, Sbai A, Costedoat N, Wechsler B, et al. Risk of ovarian failure and fertility after intravenous cyclophosphamide. A study in 84 patients. *J Rheumatol*. 2002;29(12):2571-6.
15. Christian Zuppinger TMS. Cancer Therapy-Associated Cardiotoxicity and Signaling in the Myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56(2):6.
16. Hamelinck VC, Bastiaannet E, Pieterse AH, Jannink I, van de Velde CJ, Liefers GJ, et al. Patients' preferences for surgical and adjuvant systemic treatment in early breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40(8):1005-18.
17. Kalantaridou SN, Davis SR, Nelson LM. Premature ovarian failure. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27(4):989-1006.
18. Bines J, Earl H, Buzaid AC, Saad ED. Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? *Ann Oncol*. 2014;25(6):1079-85.
19. Henderson IC. Can we abandon anthracyclines for early breast cancer patients? *Oncology (Williston Park)*. 2011;25(2):115-24, 27.
20. Pal SK, Childs BH, Pegram M. Emergence of nonanthracycline regimens in the adjuvant treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;119(1):25-32.
21. Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2014;6:253-9.
22. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379(9814):432-44.
23. Lin A-C, Hsueh J-F, Hong PKA. Removal of antineoplastic drugs cyclophosphamide, ifosfamide, and 5-fluorouracil and a vasodilator drug pentoxifylline from wastewaters by ozonation. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 05:1-8.
24. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução À Patologia* 3ª ed. São Paulo: Elsevier 2012.
25. Gulliver LSM. Estradiol Synthesis and Metabolism and Risk of Ovarian Cancer in Older Women Taking Prescribed or Plant-derived Estrogen Supplementation. *J Steroids Hormon Sci*. 2013;S12(003):5.
26. Guyton; AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*: Elsevier; 2011.
27. Jankowski M, Bissonauth V, Gao L, Gangal M, Wang D, Danalache B, et al. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*. 2009;105(2):205-18.

28. Strauss JF, Barbieri RL. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Elsevier Health Sciences; 2013.
29. Jones ME, Schoemaker M, Rae M, Folkerd EJ, Dowsett M, Ashworth A, et al. Changes in estradiol and testosterone levels in postmenopausal women after changes in body mass index. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(7):2967-74.
30. Havelock JC, Rainey WE, Bradshaw KD, Carr BR. The post-menopausal ovary displays a unique pattern of steroidogenic enzyme expression. *Hum Reprod.* 2006 ;21(1):309-17.
31. Zhao J, Liu J, Chen K, Li S, Wang Y, Yang Y, et al. What lies behind chemotherapy-induced amenorrhea for breast cancer patients: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(1):113-28.
32. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005;365(9472):1687-717.
33. Kasum M, Beketic-Oreskovic L, Peddi PF, Oreskovic S, Johnson RH. Fertility after breast cancer treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;173:13-8.
34. Minton SE, Munster PN. Chemotherapy-induced amenorrhea and fertility in women undergoing adjuvant treatment for breast cancer. *Cancer Control.* 2002;9(6):466-72.
35. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A, Gamucci T, Olmeo N, Gori S, et al. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2011;306(3):269-76.
36. Geng Y, Qiu Y, Liu X, Chen X, Ding Y, Liu S, et al. Sodium fluoride activates ERK and JNK via induction of oxidative stress to promote apoptosis and impairs ovarian function in rats. *Journal of Hazardous Materials.* 2014;272(0):75-82.
37. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol.* 1999;17(8):2365-70.
38. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, Pawlicki M, Guastalla JP, Weaver C, et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2302-13.
39. Lee S, Kil WJ, Chun M, Jung YS, Kang SY, Kang SH, et al. Chemotherapy-related amenorrhea in premenopausal women with breast cancer. *Menopause.* 2009 Jan;16(1):98-103.
40. Okanami Y, Ito Y, Watanabe C, Iijima K, Iwase T, Tokudome N, et al. Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea in premenopausal patients with breast cancer following adjuvant anthracycline and taxane. *Breast Cancer.* 2011;18(3):182-8.

41. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7(10):1342-6.
42. Tomasi-Cont N, Lambertini M, Hulsbosch S, Peccatori AF, Amant F. Strategies for fertility preservation in young early breast cancer patients. *Breast.* 2014; 23(5):503-10.
43. Wang X, He Y, Liu M, Fu X. Lentivirus-mediated bcl-2 gene therapy improves function and structure of chemotherapy-damaged ovaries in wistar rats. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69(5):518-28.
44. Davis SR. Sexual health consequences of premature ovarian failure. *Menopause.* 2008;15(1):5-6.
45. Anders C, Marcom PK, Peterson B, Gu L, Unruhe S, Welch R, et al. A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. *Cancer Invest.* 2008;26(3):286-95.
46. Hickey M, Peate M, Saunders CM, Friedlander M. Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. *Hum Reprod Update.* 2009;15(3):323-39.
47. Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY).* 2011;3(8):782-93.
48. Georgescu ES, Goldberg JM, du Plessis SS, Agarwal A. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. *Obstet Gynecol Surv.* 2008;63(11):725-32.
49. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update.* 2004;10(3):251-66.
50. Byrne J, Fears TR, Gail MH, Pee D, Connelly RR, Austin DF, et al. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(3):788-93.
51. Reh A, Oktem O, Oktay K. Impact of breast cancer chemotherapy on ovarian reserve: a prospective observational analysis by menstrual history and ovarian reserve markers. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1635-9.
52. Davis AL, Klitus M, Mintzer DM. Chemotherapy-induced amenorrhea from adjuvant breast cancer treatment: the effect of the addition of taxanes. *Clin Breast Cancer.* 2005;6(5):421-4.
53. Fornier MN, Modi S, Panageas KS, Norton L, Hudis C. Incidence of chemotherapy-induced, long-term amenorrhea in patients with breast carcinoma age 40 years and younger after adjuvant anthracycline and taxane. *Cancer.* 2005;104(8):1575-9.
54. Petrek JA, Naughton MJ, Case LD, Paskett ED, Naftalis EZ, Singletary SE, et al. Incidence, time course, and determinants of menstrual bleeding after breast cancer treatment: a prospective study. *J Clin Oncol.* 2006;24(7):1045-51.

55. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-61.
56. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775-7.
57. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970;26(1):57-60.
58. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(2):251-5.
59. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc*. 2011;243(1):47-59.
60. Sakurai K, Enomoto K, Amano S. Recovery of menstruation after long-term chemotherapy and endocrine therapy in pre-menopausal patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(4):615-20.
61. Oktem O, Oktay K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*. 2007;110(10):2222-9.
62. Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(3):738-44.
63. Gur D, Zuley ML, Anello MI, Rathfon GY, Chough DM, Ganott MA, et al. Dose reduction in digital breast tomosynthesis (DBT) screening using synthetically reconstructed projection images: an observer performance study. *Acad Radiol*. 2012;19(2):166-71.
64. Olszewski MB, Groot AJ, Dastyh J, Knol EF. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *J Immunol*. 2007;178(9):5701-9.
65. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*. 1996;381(6577):75-7.
66. Bagavant H, Adams S, Terranova P, Chang A, Kraemer FW, Lou YH, et al. Autoimmune ovarian inflammation triggered by proinflammatory (Th1) T cells is compatible with normal ovarian function in mice. *Biology of Reproduction*. 1999;61(3):635-42.
67. El-Sheikh AA, Rifaai RA. Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR- alpha , Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver. *PPAR Res*. 2014;626319.
68. Sprowl JA, Reed K, Armstrong SR, Lanner C, Guo B, Kalatskaya I, et al. Alterations in tumor necrosis factor signaling pathways are associated with cytotoxicity and resistance to taxanes: a study in isogenic resistant tumor cells. *Breast Cancer Res*. 2012;14(1):R2.

69. Pan S, Berk BC. Glutathiolation regulates tumor necrosis factor-alpha-induced caspase-3 cleavage and apoptosis: key role for glutaredoxin in the death pathway. *Circ Res.* 2007;100(2):213-9.
70. Schmelz K, Wieder T, Tamm I, Muller A, Essmann F, Geilen CC, et al. Tumor necrosis factor alpha sensitizes malignant cells to chemotherapeutic drugs via the mitochondrial apoptosis pathway independently of caspase-8 and NF-kappaB. *Oncogene.* 2004;23(40):6743-59.
71. Suzuki Y, Farbman AI. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in olfactory epithelium in vitro: possible roles of caspase 1 (ICE), caspase 2 (ICH-1), and caspase 3 (CPP32). *Exp Neurol.* 2000;165(1):35-45.
72. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 2008;133(4):693-703.
73. Kumar S, Cakouros D. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(4):193-9.
74. Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Alvarado-Cabrero I, Reyes-Fuentes A, Grizzle WE. Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006 ;86(1):176-85.
75. Clancy RM, Buyon JP. Clearance of apoptotic cells: TGF-beta in the balance between inflammation and fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2003;74(6):959-60.
76. Zhao B, Chen YG. Regulation of TGF-beta Signal Transduction. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:874065.
77. Dupont S, Inui M, Newfeld SJ. Regulation of TGF-beta signal transduction by mono- and deubiquitylation of Smads. *FEBS Lett.* 2012 ;586(14):1913-20.
78. Zhang X, Zhang C, Shen S, Xia Y, Yi L, Gao Q, et al. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Hum Reprod.* 2013;28(11):3074-85.
79. Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol.* 2010;97(1):149-61.
80. Keiler AM, Bernhardt R, Scharnweber D, Jarry H, Vollmer G, Zierau O. Comparison of estrogenic responses in bone and uterus depending on the parity status in Lewis rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;133:101-9.
81. Cannistra SA, Bast RC, Jr., Berek JS, Bookman MA, Crum CP, DePriest PD, et al. Progress in the management of gynecologic cancer: consensus summary statement. *J Clin Oncol.* 2003;21(10 Suppl):129s-32s.
82. Kato N, Hayasaka T, Takeda J, Osakabe M, Kurachi H. Ovarian tumors with functioning stroma: a clinicopathologic study with special reference to serum estrogen level, stromal morphology, and aromatase expression. *Int J Gynecol Pathol.* 2013;32(6):556-61.

ANEXO A - Submissão de Artigo a Revista Journal of Microscopy

Journal of Microscopy



A combination of stereological methods, biochemistry and electron microscopy for the investigation of drug treatment effects in experimental animals

Journal:	<i>Journal of Microscopy</i>
Manuscript ID:	JMI-2015-0003.R4
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	06-Aug-2015
Complete List of Authors:	Moraes, Alan; UERJ, Andrade, Cherley; UFRJ, Nascimento, Ana; UERJ, salata, camila; State University of Rio de Janeiro, Physics Ramos, Isalira; UFRJ, Goldenberg, Regina; UFRJ, Carvalho, Jorge; UERJ, Machado, Ana; UERJ,
Keywords:	CIOF, cyclophosphamide , ovarian fibrosis, docetaxel;, breast cancer

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

ANEXO B – Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/033/2013** sobre "**Alterações estruturais, ultraestruturais e moleculares de células e matriz extracelular de ovários de animais tratados com docetaxel**", sob a responsabilidade de **Ana Carolina Stumbo Machado**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **24/07/2013**. Este certificado expira em **24/07/2017**.

Rio de Janeiro, 24 de Julho de 2013.

Patricia C. Lisboa

Israel Felzenszwalb

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
/ass. Dep. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ

Matrícula 34765-8 (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br