UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS Centro de Desenvolvimento Tecnológico Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação toxicológica *in vitro* do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos

Isadora André Rosa Lopes

Isadora André Rosa Lopes

Avaliação toxicológica *in vitro* do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na Publicação

L864a Lopes, Isadora André Rosa

Avaliação toxicológica in vitro do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos / Isadora André Rosa Lopes ; Tiago Veiras Collares, orientador. — Pelotas, 2018.

67 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Docetaxel. 2. Toxicidade reprodutiva. 3. Maturação in vitro. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Título.

CDD: 615.58

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Isadora André Rosa Lopes

Avaliação toxicológica *in vitro* do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
Data da Defesa: 29 de novembro de 2018.
Banca examinadora:
Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador) Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas
Prof ^a . Dr ^a . Mariana Härter Remião Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas
Bel. Morgana Alves Borges Resharel em Bistognalogia pola Universidado Foderal de Polates
Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas



Agradecimentos

Aos meus pais, Adriana e Enio, aos meus irmãos, luri e Leticia, e à minha família, agradeço por todo apoio, amor, carinho e principalmente por acreditarem sempre no meu potencial e nos caminhos escolhidos por mim, me incentivando e proporcionando a realização dessa etapa.

À minha turma de graduação, tanto aos que permaneceram, quanto aos que nos deixaram pelo caminho, agradeço pela diversão, pelo aprendizado e pela convivência que tanto auxiliou no meu amadurecimento. Em especial, agradeço aos meus colegas Bernardo Meine, Lucas Maubrigades, Pedro Reisser e Matheus Montano, que durante esses anos de faculdade foram a minha segunda família, dividindo caronas, dificuldades e comemorações.

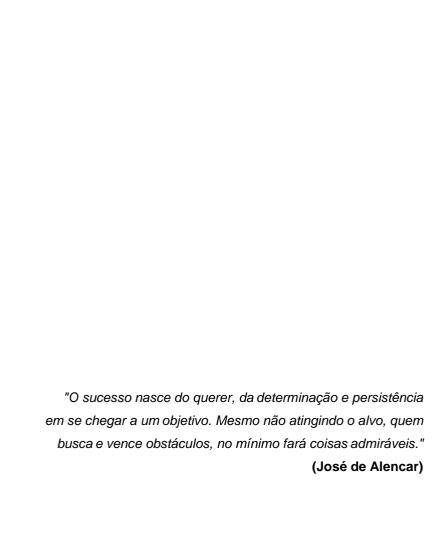
Aos amigos de fora da faculdade, agradeço pela amizade e por acreditarem no meu sucesso, e ao meu namorado Pedro Rassier, agradeço pelo apoio, conselhos, risadas, paciência, amor e companheirismo. Vocês foram fundamentais.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia do Câncer, agradeço por todos os ensinamentos e apoio que obtive durante esses anos de estágio. Principalmente a equipe Embrio (Marri, Carol, Morgana, Ana e Júlia), com a qual convivi diariamente, rindo, aprendendo e trabalhando - com vocês aprendi o significado de iniciativa, comprometimento e determinação. Assim como à Camis, que com toda a paciência e disponibilidade me auxiliou na realização dos meus experimentos e contribuiu imensamente para meu aprendizado.

Ao meu orientador Tiago Collares, agradeço pela oportunidade de ingressar no laboratório e pela orientação, transferindo seu tempo, ensinamentos e sugestões, sendo sempre um exemplo de profissional a seguir.

À minha orientadora de estágio, Júlia Damé, agradeço pelo apoio e paciência nos primeiros e essenciais passos para a condução e execução dessa etapa final. Assim como à Marri, que me integrou no laboratório, ensinou e orientou durante todos esses anos, fazendo com que hoje, com certeza, eu seja o resultado do incentivo e confiança que tivestes em mim.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para meu sucesso e crescimento profissional e pessoal!



Resumo

LOPES, Isadora André Rosa. **Avaliação toxicológica** *in vitro* **do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos.** 2018. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Atualmente o câncer é considerado um dos mais complexos problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. Nesse contexto o câncer de mama representa o tipo mais comum a acometer mulheres tanto no Brasil quanto no mundo, e o de ovário o câncer ginecológico mais letal no Brasil. Quimioterápicos oferecem a principal ferramenta clínica para o controle dessas malignidades, sendo o docetaxel um dos mais poderosos agentes antitumorais, o qual é amplamente utilizado como padrão ouro para diversos tratamentos. Tal agente antineoplásico atua promovendo a agregação da tubulina em microtúbulos estáveis e inibindo a sua dissociação. Contudo, assim como outras drogas quimioterápicas, o docetaxel possui efeitos colaterais e tóxicos, dentre os quais destaca-se a toxicidade reprodutiva. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação toxicológica in vitro do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos. Para isso, oócitos bovinos foram maturados in vitro na presença de docetaxel em concentrações de 1nM, 5nM, 10nM, 50nM e 100nM. Para determinação da viabilidade celular dos oócitos foi utilizado o teste colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio), e para determinação da viabilidade de membrana foi utilizado o ensaio Live/Dead. A ação da molécula de docetaxel foi comprovada através da avaliação de seu efeito antiproliferativo em células de adenocarcinoma de mama (linhagem MDA-MB-231) e de ovário (linhagem OVCAR-3) humanas. Com base nos resultados obtidos, o quimioterápico docetaxel foi efetivo na inibição de crescimento das células de linhagens tumorais analisadas. Além disso, não foram observados danos à membrana e às mitocôndrias oocitárias significativamente relevantes. Dessa forma sugere-se que o quimioterápico docetaxel não possua efeito citotóxico sobre oócitos bovinos dentre o range de concentrações e parâmetros analisados.

Palavras-chave: docetaxel; toxicidade reprodutiva; maturação in vitro.

Abstract

LOPES, Isadora André Rosa. *In vitro* toxicological evaluation of docetaxel chemotherapeutic in bovine oocytes. 2018. 67f. Completion of course work - Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Currently, cancer is considered one of the most complex public health problems that Brazilian health system is facing, given its epidemiological, social and economic magnitude. In this context breast cancer represents the most common type among women in Brazil and in the world, and ovarian cancer is the most lethal gynecological cancer in Brazil. Chemotherapeutics offer the main clinical tool for the control of these malignancies, with docetaxel being one of the most powerful agents, which is widely used as a gold standard for several treatments. Such antineoplastic agent acts by promoting the aggregation of tubulin in stable microtubules and inhibiting their dissociation. However, like other chemotherapeutic drugs, docetaxel has toxic and side effects, among which the reproductive toxicity stands out. Thus, the objective of the present study was to evaluate the in vitro toxicological action of docetaxel chemotherapeutic in bovine oocytes. For this, bovine oocytes were matured in vitro in the presence of docetaxel at concentrations of 1nM, 5nM, 10nM, 50nM and 100nM. The colorimetric MTT reduction test (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazolium bromide) was used to determine the cell viability of the oocytes, and for the determination of membrane viability the Live / Dead assay was used. The action of the docetaxel molecule was demonstrated by evaluating its antiproliferative effect on breast (MDA-MB-231) and ovarian (OVCAR-3) human adenocarcinoma cells. Based on the obtained results, the chemotherapeutic docetaxel was effective in inhibiting growth in the analyzed cancer cell lines. In addition, no significant membrane or mitochondrial damage were observed in the oocyte. Thus, it is suggested that the docetaxel chemotherapeutic agent does not have a cytotoxic effect on bovine oocytes within the range of concentrations and parameters analyzed.

Keywords: docetaxel; reproductive toxicity; in vitro maturation.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a	
	maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos bovinos.	34
Figura 2 -	Montagem e posicionamento do fuso na ausência de centrossomas	35
Figura 3 -	Sistema a vácuo de punção de ovários	38
Figura 4 -	Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231	39
Figura 5 -	Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de ovário humano OVCAR-3	40
Figura 6 -	Transformação do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan	41
Figura 7 -	Ensaio de MTT	42
Figura 8 -	Ensaio de Live/Dead	43
Figura 9 -	Inibição da viabilidade celular da linhagem OVCAR-3 investigada pelo ensaio de MTT	47
Figura 10 -	Inibição da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 investigada pelo ensaio de MTT	47

Lista de Tabelas

	Viabilidade	celular	de	oócitos	bovinos	maturados	na	
	presença ou							
	Viabilidade	mitocono	drial	de oócito	os bovino	s maturados	na	

.

Lista de Abreviaturas e Siglas

3Rs Reduzir, Reutilizar e Reciclar

μL Microlitro

Abs Absorbância

BCL B-cell lymphoma

BCL-2 B-cell lymphoma

BRCA1 Breast Cancer Associated Gene 1

BRCA2 Breast Cancer Associated Gene 2

CC Célula do Cumulus

CCOs Complexo Cumulus oócito

CIV Cultivo in vitro

CO₂ Dióxido de carbono

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Deoxyribonucleic Acid

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico

Ex/Em Excitação e Emissão

g Gramas

g/L Grama por litro

GPO Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular

GVBD Quebra de vesícula germinativa

h Horas

HER1 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 1

HER2 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

IC₅₀ Concentração Inibitória de 50%

mg Miligrama

mg/mL Miligrama por Mililitro

MI Metáfase I

MII Metáfase II

min Minutos

MIV Maturação in vitro

MIVb Maturação in vitro de oócitos bovinos

mL Mililitro

mm Milímetro mM Milimolar

mRNA Messenger RNA

MTT Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

nm Nanômetro nM Nanomolar

O₂ Oxigênio

PBS Phosphate buffered saline

PIVE Produção in vitro de embriões

PVP Polivinilpirrolidona

RE Receptor de estrogênio

RNA Ribonucleic acid

RP Receptor de progesterona

SFB Soro Fetal Bovino

TRH Terapia de reposição hormonal

UI/mL Unidades Internacioanis por mililitro

VG Vesícula germinativa

Lista de Símbolos

/	Barra

- °C Grau Celsius
- < Menor
- μ Micro
- % Porcentagem
- ® Registered Sign
- +/- Mais ou Menos

Sumário

1 Introdução Geral	16
2 Objetivos	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3 Revisão Bibliográfica	19
3.1. Câncer	19
3.1.1. Câncer de mama	20
3.1.2. Câncer de ovário	22
3.1.3. Cultivo e linhagens celulares	23
3.2. Quimioterápicos	24
3.2.1. Docetaxel	26
3.2.2. Quimioterapia e reprodução	29
3.3. Toxicidade reprodutiva	31
3.3.1. Gameta feminino e maturação	32
3.3.2. 3Rs	35
4 Materiais e Métodos	37
4.1. Reagentes e soluções	37
4.2. Coleta dos ovários e classificação oocitária	37
4.3. Maturação in vitro (MIV)	38
4.4. Cultivo Celular	39
4.5. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT	40
4.5.1. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT - Linhagens r	neoplásicas41
4.5.2. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT - Oócitos	42
4.6. Ensaio Live/Dead	42
4.6.1. Ensaio Live/Dead - Oócitos	43
4.7. Análises estatísticas	44

5	Resultados	.45
5.1	. Ensaio Live/Dead	.45
5.2	. Ensaio colorimétrico de MTT - Oócitos	.45
5.3	. Ensaio colorimétrico de MTT - Linhagens Neoplásicas	.46
6	Discussão	.48
7	Conclusões e perspectivas	.50
Ref	ferências	.51

1 Introdução Geral

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que possuem em comum o crescimento desordenado de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Atualmente, é considerado um dos mais complexos problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Um exemplo de grande incidência é o câncer de mama, tipo mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo. Já o câncer de ovário está dentre os tipos mais agressivos, sendo o câncer ginecológico mais letal no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017).

Nesse sentido, existem linhagens celulares estabelecidas a partir de células neoplásicas as quais são modelos intensamente utilizados em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamentos para o câncer (MASTERS, 2000; BERZOFSKY et al., 2004; MIGITA, 2012). A utilização de medicamentos específicos que acarretam na morte celular de células cancerígenas é denominada quimioterapia (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002; MASOOD, 2016). Tal estratégia oferece a principal ferramenta clínica para o controle de malignidades invasivas, uma vez que possui como vantagem a ação em todo o corpo, atingindo também as células metastáticas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

Dentre os principais quimioterápicos utilizados atualmente, destaca-se o docetaxel. Representando um dos mais poderosos agentes contra o câncer local ou metastático, é amplamente utilizado como padrão ouro no tratamento de câncer de mama, pulmão de células não pequenas e de ovário, apresentando um alto nível de atividade e de sensibilidade (GLIGOROV; LOTZ, 2004). Tal agente antineoplásico atua promovendo a agregação da tubulina em microtúbulos estáveis e inibindo a sua dissociação, o que conduz a uma marcada redução de tubulina livre, causando a parada do ciclo celular em G2M (SCHIFF et al., 1979).

Contudo, assim como outras drogas quimioterápicas, o docetaxel possui efeitos colaterais e tóxicos, dentre os quais destaca-se a toxicidade reprodutiva

(ZHAO; ASTRUC, 2012; LOPES et al., 2014). Assim, a infertilidade é uma grande preocupação após a quimioterapia, logo, é de suma importância caracterizar os danos específicos causados por um medicamento no sistema reprodutivo para possibilitar a descoberta e implementação de estratégias de proteção adequadas.

Sabe-se que protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) são importantes plataformas para avaliar a toxicidade reprodutiva (POCAR et al., 2003; PELTOLA et al., 2004; RUSSELL et al., 2006; LAZZARI et al., 2008; VAN WOUDENBERG et al., 2012). Nesse sentido, a etapa de maturação oocitária *in vitro* (MIV), em especial, constitui um importante modelo para a elucidação dos mecanismos subjacentes à formação de um oócito (célula germinativa feminina) competente (DEL COLLADO et al., 2016; GANDOLFI; BREVINI, 2010).

O Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), da Universidade Federal de Pelotas, tem se dedicado à pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias *in vitro* para terapêutica de diversos tipos de neoplasias (DE VASCONCELOS et al., 2013; BEGNINI et al., 2014; SCHULTZE et al., 2017; YURGEL et al., 2014; TESSMANN et al., 2017), além de também realizar pesquisas na área de toxicologia utilizando gametas (LUCAS et al., 2015; 2017; REMIÃO et al., 2016; SILVA et al., 2017). Portanto, no intuito de prosseguir e complementar as pesquisas do grupo nessa área, e considerando o impacto da infertilidade na vida do paciente oncológico, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação toxicológica *in vitro* do docetaxel durante a etapa de maturação de oócitos bovinos, utilizando um *range* de concentrações relatadas na literatura por inibirem 50% da proliferação celular em linhagens neoplásicas.

2 Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação toxicológica *in vitro* do quimioterápico docetaxel em oócitos bovinos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a ação citotóxica do quimioterápico docetaxel através da viabilidade mitocondrial de linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231) e ovário (OVCAR-3) humanas;
- Avaliar a viabilidade mitocondrial através do teste de MTT após tratamento com diferentes concentrações de docetaxel em oócitos bovinos;
- Avaliar a integridade de membrana através do teste de live/dead após tratamento com diferentes concentrações de docetaxel em oócitos bovinos;

3 Revisão Bibliográfica

3.1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, as quais apresentam durante o seu desenvolvimento um processo de múltiplas etapas que resultam em uma série de alterações genéticas em células normais, conferindo assim o fenótipo maligno (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Após esse processo, as células tendem a agir de forma extremamente agressiva e incontrolável devido à sua rápida replicação, acarretando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). Além disso, à medida que esses tumores crescem, algumas células cancerígenas podem migrar de seu local de origem para lugares distantes do corpo, através do sistema sanguíneo ou linfático, e formar novos tumores longe do original, o que caracteriza o processo de metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Ainda, existem diferentes tipos de câncer, os quais geralmente são nomeados de acordo com os órgãos ou os tecidos de origem. Além disso, outras características que os diferenciam são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade realizar metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015).

As causas de ocorrência do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se aos hábitos, costumes e ao meio ambiente ao qual o paciente está inserido, já as causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente prédeterminadas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Por conseguinte, o agrupamento dessas células mutadas pode ser classificado de acordo com seu crescimento e expansão. São consideradas neoplasias benignas aquelas que apresentam crescimento de forma organizada e lenta, além de possuir limites bem nítidos, já as neoplasias malignas manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

As neoplasias malignas são consideradas como um dos principais problemas de saúde pública mundial e é a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Atualmente, o câncer é considerado um dos mais complexos problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Segundo perspectiva publicada pela *International Agency for Research on Cancer* (2018), espera-se 18 078 957 novos casos de câncer no ano de 2018, que acarretarão na morte de 9 555 027 pessoas no mundo. Já para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (2017) estima para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano.

3.1.1. Câncer de mama

O câncer de mama se origina quando as células do tecido mamário passam a crescer fora de controle. Na maioria dos casos, pode ser percebido em fases iniciais uma vez que possui sintomas de fácil percepção. O reconhecimento pode ser realizado por meio de sintomas como nódulo fixo e geralmente indolor no seio, através da pele da mama que se torna avermelhada e retraída, pelo aparecimento de pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço, assim como a saída de líquido anormal das mamas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014).

Apesar dos atuais esforços relacionados com avanços na prevenção, tratamento e diagnóstico, tal malignidade continua sendo um grande problema de saúde pública, uma vez que sua incidência está aumentando na maioria dos países e está projetada para aumentar ainda mais nos próximos 20 anos (ECCLES et al., 2013; ARNOLD et al., 2015; COLDITZ; BOHLKE, 2014). Atualmente, é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo, e o segundo mais frequente em ambos os sexos, ficando atrás apenas para o câncer de pele não melanoma, e representando cerca de 29% dos casos de câncer femininos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014). Para o Brasil, estimam-se 59.700 novos casos de câncer de mama em 2018, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017). Embora tal malignidade possua uma taxa de incidência maior do que qualquer outro câncer (12,9/100 mil), o câncer de mama apresenta letalidade relativamente baixa, visto que a taxa de mortalidade é menor que um terço da taxa de incidência (STEWART;

WILD, 2014). Além disso, também é capaz de acometer homens, entretanto é pouco comum, representando apenas 1% do total de casos da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Múltiplos fatores estão envolvidos na etiologia do câncer de mama, dentre eles a idade da menarca menor do que 12 anos, a menopausa após os 55 anos, mulheres nulíparas, a primeira gravidez tardia, um menor ou nenhum período de amamentação, o uso de alguns anticoncepcionais, assim como a terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa. Ademais, fatores abrangentes como o consumo de bebidas alcoólicas, a realização de dietas hipercalóricas, o sedentarismo, e a predisposição genética (mutações em genes de herança genética familiar – principalmente BRCA1 e BRCA2) também estão relacionados (EVANS et al., 2008; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017; STEWART; WILD, 2014).

Já foram desenvolvidos diversos sistemas de classificação para o câncer de mama a fim de distinguir os diferentes subtipos da doença. Sua determinação pode ser realizada através da identificação das células específicas na mama que são afetadas, como por exemplo, aqueles que têm origem nas células epiteliais, são chamados de carcinomas. A maioria dos cânceres de mama é denominada adenocarcinoma, possuindo como característica derivar de células que compõem o tecido glandular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014).

Outras classificações existentes estão relacionadas ao grau de penetração do tumor, podendo ser dividida em câncer de mama invasivo e não invasivo, que diferem caracteristicamente por suas células anormais se estenderem para longe do lóbulo ou dos ductos onde está situado (WEST et al., 2017) ou por se manterem em proximidade do tecido mamário (HARRIS et al., 2016), respectivamente. Ainda, existe a classificação molecular que baseia-se na expressão de diferentes fatores como o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (RP), bem como o oncogene HER2, a qual é amplamente utilizada (GRAY, 2017).

Tendo em vista a heterogeneidade da doença, um manejo interdisciplinar geralmente é empregado para realização do tratamento em pacientes diagnosticados com câncer de mama. Evoluindo de uma abordagem cirúrgica primária com foco no controle local para uma terapia sistêmica utilizando técnicas como a terapia direcionada, a terapia hormonal, a radioterapia, a cirurgia e a

quimioterapia - assim resultando em melhora significativa da sobrevida (TESHOME, HUNT; KELLY, 2014; AKRAM et al., 2017). No entanto, embora a maioria dos pacientes diagnosticados com câncer de mama localizado possa se tornar livre de doença com essa nova estratégia de tratamento, a recorrência metastática à distância é comum e a principal causa de morte dos pacientes acometidos por câncer de mama (ANAMPA; et al., 2015).

3.1.2. Câncer de ovário

O câncer de ovário é considerado o câncer ginecológico mais difícil de ser diagnosticado, pois a maioria dos tumores malignos de ovário é descoberta tardiamente, quando já estão em estágio avançado (KAVANAGH, 2002; MCGUIRE III; MARKMAN, 2003; FERLAY et al., 2010). Consequentemente, este é o câncer ginecológico mais letal no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017). A dificuldade no diagnostico decorre da errônea atribuição dos principais sintomas da doença (dor e pressão na pelve) a várias outras causas (LISTER-SHARP et al, 2000). Assim, os pacientes podem ser assintomáticos até que uma massa abdominal seja descoberta durante o exame pélvico de rotina ou até que o tumor tenha metastatizado (MEMARZADEH; BEREK, 2001).

De acordo Howlader et al. (2015), a taxa de sobrevida média em cinco anos de pacientes diagnosticadas com câncer de ovário no estádio I da neoplasia foi de 92,1%. Esta taxa decresce drasticamente para 28,3% para pacientes no estádio IV da neoplasia. Nos Estados Unidos cerca de 20.000 mulheres por ano são diagnosticadas com câncer de ovário, sendo considerado o mais letal entre os cânceres do sistema reprodutor feminino (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018). Para o Brasil, estimam-se 6.150 novos casos e 3.283 mortes em decorrência do câncer do ovário, para o ano de 2018, ocupando o sétimo lugar entre os cânceres femininos mais comuns (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017).

A origem celular e a patogênese deste câncer ainda não são bem elucidadas e, curiosamente, a maioria dos tumores parece originar-se de outros tecidos ginecológicos e envolver o ovário secundariamente (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017). A maioria dos tumores ovarianos se origina de células epiteliais, células estromais ou células germinativas. Histologicamente, esses carcinomas são

divididos em cinco tipos principais: carcinomas serosos de alto grau (70%); endometriais (10%); células claras (10%); mucinosas (3%); e de baixo grau (<5%), os quais em conjunto, representam mais de 95% dos casos (STEWART; WILD, 2014).

Existe a associação de diversos fatores ao desenvolvimento do carcinoma de ovário, incluindo fatores genéticos como o histórico familiar de câncer de ovário ou de mama, a existência de mutações de alto risco dos genes BRCA1 e BRCA2, a nuliparidade, a endometriose, a menopausa tardia, a obesidade, e o tabagismo. Embora ainda não haja maneiras de prevenir o câncer de ovário, existem fatores que diminuem a chance do seu desenvolvimento. Fazer uso de pílulas anticoncepcionais e ter dado à luz são considerados fatores de proteção (STEWART; WILD, 2014; REID; PERMUTH; SELLERS, 2017; JAYSON et al., 2014).

Atualmente, o tratamento padrão para o câncer de ovário é uma abordagem combinada. Há a associação de cirurgia citorredutora com a quimioterapia, a qual é baseada em platina com o regime de carboplatina-paclitaxel ou carboplatina-docetaxel (OZOLS et al., 2003; VASEY et al., 2004; BOLTON et al., 2012). Todavia, mesmo com este moderno gerenciamento da doença, permitindo que uma significativa proporção de mulheres atinja uma resposta completa, a maioria das pacientes que apresentam a doença em estado avançado possivelmente desenvolverá recorrência dentro de 18 meses (JAYSON et al., 2014).

3.1.3. Cultivo e linhagens celulares

O cultivo celular é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas em laboratório (*in vitro*) independente do organismo que a originou (MIGITA, 2012). As células mantidas em culturas não estão mais organizadas em tecidos, crescendo em recipientes estéreis, usualmente placas, e suplementadas com um meio contendo nutrientes e fatores de crescimento, sob temperatura e umidade definidas (FRESHNEY, 2006). Os tipos de cultivo celular podem ser divididos em primário ou contínuo: uma cultura celular é denominada como primária quando suas células são diretamente obtidas de um tecido humano ou animal e possuem tempo de vida curto. Por outro lado, quando as células sofrem imortalização (adquirirem a capacidade de se multiplicar indefinidamente) convencionou-se denominá-las como linhagem celular contínua (MIGITA, 2012).

A importância da utilização de uma linhagem celular contínua reside na sua capacidade de fornecer uma fonte renovável de material celular para estudos repetidos, a qual mimetize as propriedades de seus tecidos originais, além de evitar a variação entre indivíduos e ignorar questões éticas associadas a experiências com animais e humanos (MASTERS, 2000). Linhagens celulares estabelecidas a partir de células neoplásicas são exemplos intensamente utilizados em estudos préclínicos para o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e de tratamentos, bem como em estudos sobre a biologia do câncer (MASTERS, 2000; BERZOFSKY et al., 2004; MIGITA, 2012). Desde a publicação da primeira linhagem celular de câncer humano, HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952), houve o desenvolvimento de milhares de linhagens de células cancerígenas, fornecendo um grande número de modelos para a maioria das formas de câncer. Tais linhagens estão amplamente disponíveis através de uma série de grandes bancos de células (LANGDON, 2010). Dessa forma, embora seja necessária certa cautela na interpretação de dados obtidos pelo estudo in vitro de células, em função do menor grau complexidade que apresenta em relação a estudos in vivo, esse modelo se demonstrou suficientemente informativo para permitir que a investigação de uma doença complexa, como é o caso do câncer, pudesse ser simplificada e realizada de forma prática (LANGDON, 2010; FRESHNEY, 2006).

3.2. Quimioterápicos

A utilização de medicamentos específicos que resultam na morte celular de células cancerígenas é denominada quimioterapia (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002; MASOOD, 2016). Tal estratégia oferece a principal ferramenta clínica para o controle de malignidades invasivas, já que a cirurgia e a radioterapia atuam apenas localmente, e a quimioterapia em contrapartida possui como vantagem a ação em todo o corpo, atingindo também as células metastáticas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

Assim, o primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, amplamente utilizado em ambas as Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que acarretou no seu uso em tratamento de linfomas malignos (FUCHS; WANNMACHER, 2010). Desde então,

diversas pesquisas relacionadas ao tema foram realizadas, possibilitando a aprovação de novos agentes para o uso humano (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015; HU et al., 2016; NASTIUK; KROLEWSKI, 2016).

Os principais objetivos da quimioterapia incluem a cura da doença, o controle do avanço e a ação paliativa dos sintomas. Dessa forma, o médico responsável deve considerar diversos fatores como o tipo e o estágio do câncer, a idade e a saúde geral do paciente, bem como tratamentos passados, para prescrever uma estratégia ideal e individualizada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Sabe-se que a maioria dos quimioterápicos interfere de algum modo no mecanismo celular, dessa forma a melhor compreensão do ciclo celular em uma célula normal levou à definição clara dos mecanismos de ação da maioria dessas drogas. Assim, a partir dessa definição, Bruce e colaboradores (1966) classificaram os agentes antineoplásicos conforme a sua atuação sobre o ciclo celular, em:

- Ciclo-inespecíficos Atuando em células que estão ou não no ciclo proliferativo.
- Ciclo-específicos Atuando somente nas células que se encontram em proliferação.
- Fase-específicos Atuando em fases específicas do ciclo celular.

Além disso, tais agentes também podem ser classificados quanto à estrutura química e função celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a), subdividindo-se principalmente em:

• ALQUILANTES

Os compostos alquilantes são capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Dessa forma, eles se ligam ao DNA com intuito de impedir a separação de seus dois filamentos, fenômeno este indispensável para a correta replicação. Ademais, os alquilantes são classificados como cicloinespecíficos, afetando as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico (SILVA, 2006).

ANTIMETABÓLITOS

Os antimetabólitos afetam as células inibindo a biossíntese de componentes essenciais ao DNA e ao RNA (FUCHS; WANNMACHER, 2010), como os nucleosídeos purina e pirimidina (ALMEIDA, 2005). Tais agentes quimioterápicos são fase-específicos, atuando particularmente em células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular (fase S), impedindo a célula de entrar em mitose (FUCHS;

WANNMACHER, 2010) e concluir o ciclo reprodutivo.

ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos antineoplásicos constituem um grupo de substâncias com estrutura química variada que, embora interajam com o DNA e consigam inibir a síntese deste ácido ou de proteínas, não atuam especificamente sobre uma determinada fase do ciclo celular (FUCHS; WANNMACHER, 2010). Apesar de apresentarem tal variação, possuem em comum a presença de anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos (CASCIATO, 2009).

INIBIDORES MITÓTICOS

Os inibidores mitóticos paralisam a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos (ALMEIDA, 2005). Deste modo, os cromossomos ficam impedidos de migrar durante a metáfase, acarretando à interrupção da divisão celular. Os taxanos são a principal subclasse, e possuem como mecanismo de ação a estabilização dos microtubulos (CROWN; O'LEAR, 2000).

3.2.1. Docetaxel

A descoberta da classe dos taxanos constituiu um desenvolvimento significativo na busca por agentes quimioterápicos mais eficazes no tratamento do câncer. Estes foram originalmente derivados da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, seguido da identificação do paclitaxel como seu constituinte ativo em 1971 (WANI et al., 1971). Posteriormente, após uma extensa pesquisa de derivados de taxanos com características que poderiam melhorar o potencial do paclitaxel, foi selecionado e introduzido o docetaxel, o qual é um taxóide semissintético derivado das agulhas de *Taxus baccata* (LISTER-SHARP et al., 2000).

Ambas as drogas possuem estruturas químicas similares, ligam-se à tubulina e promovem a estabilização dos microtúbulos, causando a parada do ciclo celular em G2M (SCHIFF et al., 1979). Embora os padrões de sensibilidade sejam semelhantes para os dois agentes (LAVELLE et al., 1995; HANAUSKE et al., 1992; RIOU; NAUDIN; LAVELLE, 1992), eles não são idênticos. Uma vez que quando comparado ao paclitaxel, o docetaxel demonstrou uma maior afinidade pelo sítio de

ligação à tubulina (DIAZ; ANDREU, 1993), um diferente padrão de polimerização de microtúbulos (DIAZ; ANDREU, 1993; RINGEL; HORWITZ, 1991; ANDREU et al., 1994), um maior tempo de retenção intracelular e uma maior concentração intracelular nas células alvo (RIOU et al., 1994), assim como uma atividade antitumoral mais potente em modelos *in vitro* e *in vivo* (LAVELLE et al., 1995, HANAUSKE et al., 1992, RIOU; NAUDIN; LAVELLE, 1992). Ademais, em estudos clínicos iniciais, o docetaxel demonstrou uma farmacocinética linear (VALERO et al., 1998) e uma dependência menos programada do que o paclitaxel (BISSERY et al., 1995).

As consequências decorrentes da polimerização dos microtúbulos pelo docetaxel são complexas, já que várias funções celulares vitais, nas quais os microtúbulos desempenham um papel crítico, ficam danificadas. Logo, o comprometimento da progressão mitótica levando à parada do ciclo celular é considerado um componente principal do mecanismo de ação desse quimioterápico, uma vez que ele bloqueia a progressão da célula através do seu ciclo de divisão natural e, consequentemente, inibe a proliferação celular (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

A estabilização dos microtúbulos não afeta apenas a progressão ao longo do ciclo celular, mas também pode alterar as vias de sinalização envolvidas em processos como a apoptose em células cancerígenas, na qual o docetaxel tem sido relatado como promotor. Diversas vias de sinalização podem estar envolvidas: a família do gene BCL em particular parece desempenhar um papel crítico, uma vez que a inibição de BCL-2 induz a apoptose, enquanto a superexpressão de BCL-2 previne ou retarda a apoptose (aumentando a sobrevivência celular), podendo ser um fator relacionado à resistência quimioterápica (HALDAR et al., 1997; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

Outra via de sinalização afetada é a que contempla o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - como exemplo, os receptores de fator de crescimento epidérmico humano HER-1 e HER-2) conhecidas por influenciar a regulação do ciclo celular, da angiogênese e da apoptose. O HER-1 é superexpresso em uma ampla gama de tumores, especialmente no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, onde está associado com prognóstico ruim. Tal como, o HER-2 também está superexpresso em muitos tipos de tumores, em particular no câncer de mama (30% dos tumores), o que confere uma propensão

metastática à célula e está associada à diminuição da sobrevida do paciente (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010).

Controversamente, Morse et al. (2005) determinou a catástrofe mitótica como o principal mecanismo de morte observado em resposta ao regime de tratamento com docetaxel. Dessa forma, caracteriza-se pela ocorrência de mitose aberrante ou falta de segregação dos cromossomos, seguida por divisão celular e formação de envelopes nucleares ao redor de cromossomos individuais ou agrupados, gerando assim, grandes células não viáveis com múltiplos micronúcleos, as quais são morfologicamente distintas das células apoptóticas.

Independentemente da insuficiência descritiva no seu modo de ação, o docetaxel já foi demonstrado como um inibidor potente, e potencialmente específico, da migração de células endoteliais *in vitro* e da angiogenese *in vitro* e *in vivo*, podendo ser até quatro vezes mais forte do que o paclitaxel (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010). Além disso, já foram relatadas alterações diretas a permeabilidade da membrana mitocondrial (FABBRI et al., 2006). Dessa maneira, esse composto representa um dos mais poderosos agentes contra o câncer local ou metastático, e devido a esses efeitos altamente ativos ele tem sido cada vez mais utilizado como padrão ouro no tratamento de câncer de mama, pulmão de células não pequenas e de ovário, apresentando um alto nível de atividade e de sensibilidade (GLIGOROV; LOTZ, 2004).

Contudo, assim como outras drogas quimioterápicas, o docetaxel possui efeitos colaterais e tóxicos. Dentre os quais destacam-se a toxicidade hematopoética, musculoesquelética, na pele, nas unhas, vasculares, pulmonar, neuropatia periférica, bem como reações de hipersensibilidade e também toxicidade reprodutiva. (ZHAO; ASTRUC, 2012; SEO et al., 2013; LEONARD; ZUJEWSKI, 2003; YAMADA et al., 2014; LOPES et al., 2014). Os efeitos adversos que acometem a reprodução sucedem principalmente em virtude da oferta limitada de oócitos nos folículos ovarianos, os quais são formados antes do nascimento, e representam a reserva ovariana total de uma fêmea. Dessa forma, quando o número de folículos primordiais se torna muito baixo (menos de cerca de mil) a vida reprodutiva de uma mulher cessa, levando à menopausa (WALLACE; KELSEY, 2010). Algumas circunstâncias, como a quimioterapia, podem esgotar precocemente essa reserva, levando à insuficiência ovariana prematura com a perda de fertilidade e consequente deficiência de estrogênio.

Portanto, a infertilidade é uma grande preocupação após a quimioterapia, logo, é de suma importância caracterizar os danos específicos causados pelo medicamento no sistema reprodutivo para ajudar a encontrar estratégias de proteção adequadas. Nesse sentido, alguns trabalhos já avaliaram o docetaxel frente a alguns parâmetros reprodutivos. Em um destes trabalhos, o docetaxel foi avaliado em camundongos, onde foi demonstrado um efeito direto sobre folículos em crescimento, mas não sobre a reserva ovariana, mesmo em concentrações de 0,1 mM - menor do que a encontrada no plasma de pacientes com câncer (SLAVIERO et al., 2004; BAKER et al., 2004; BRUNSVIG et al., 2007). Assim, é constatado que o oócito, aparentemente, não é danificado de forma direta, enquanto as células somáticas sofrem apoptose sob ação do quimioterápico (LOPES et al., 2014; THOMSON et al., 2010). Todavia, Gücer et al., 2001, relataram que a administração intraperitoneal de docetaxel diminuiu o pool de folículos primordiais em camundongos. Ademais, quando analisado no gameta masculino, o composto reprimiu a espermatogênese e a motilidade de espermatozóides e aumentou drasticamente a anormalidade espermática em camundongos e ratos, bem como diminuiu significativamente os índices de cópula, concepção e fertilidade em ratos (ZHANG et al., 2014).

Dessa forma, o sistema reprodutivo desempenha papel fundamental na qualidade de vida e na sobrevivência dos seres humanos. Ainda, os órgãos reprodutivos apresentam uma maior sensibilidade às drogas químicas, em comparação com outros órgãos (ZHANG et al., 2014). No entanto, ainda não está elucidada a toxicidade do docetaxel nesse sistema.

3.2.2. Quimioterapia e reprodução

A maioria dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente no tratamento do câncer possui como alvo direto o DNA, promovendo danos tanto as células normais como as neoplásicas. Usualmente, acarretam maior dano às células malignas devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos e os ciclos de divisões celulares dessas duas populações celulares (LEEN et al., 2005). Entretanto, os quimioterápicos ainda não possuem a especificidade ideal, uma vez que geram danos significativos a células normais, principalmente às células formadoras de sangue na medula óssea, aos folículos capilares, às células da boca, do trato

digestivo e também do sistema reprodutivo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016b).

Nas últimas décadas, verificou-se um aumento substancial na taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer, essencialmente proveniente de avanços nos tratamentos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). Concomitante a isso, houve o aparecimento de efeitos antes imperceptíveis, e um exemplo de grande impacto na qualidade de vida do paciente, não apenas durante o tratamento oncológico, mas também de longo alcance é o comprometimento ou a perda da fertilidade. Este tipo de dano está intimamente correlacionado com local e tipo do câncer, o regime terapêutico oncológico e a idade do paciente (LAWRENZ; MAHAJAN; FATEMI, 2016). À vista disso, diversos agentes quimioterápicos já foram classificados de acordo com sua gonadotoxicidade (MEIROW et al., 2010; FLEISCHER; VOLLENHOVEN; WESTON, 2011).

Os oócitos presentes nas reservas ovarianas estão em uma parada meiótica e não se dividem, diferentemente das células da granulosa, as quais se proliferam durante a maturação do folículo. Assim, o crescimento do oócito e das células da granulosa estão intimamente ligados, fazendo com que danos às células da granulosa acarretem em dano também ao oócito (MATZUK et al., 2002). Já foi relatado na literatura que rupturas de fita dupla do DNA não reparadas acarretam na ativação da morte apoptótica em oócitos (DI GIACOMO et al., 2005) e que efeitos genéticos no oócito resultaram em aneuploidia e mortalidade embrionária precoce (HIGDON et al., 1992).

Mulheres com câncer de mama são aconselhadas a adiar a gravidez por 2 a 5 anos para evitar o risco de recorrência. Sabe-se que o aumento da idade materna por si só está associado à redução da fecundidade, mesmo em mulheres sadias, devido a um aumento de aneuploidias de oócitos, além da redução no número de oócitos (LAWRENZ; MAHAJAN; FATEMI, 2016). Tendo isso em vista, este duplo ataque aos oócitos (efeito da quimioterapia e idade) compromete severamente as chances de gravidez da mulher, devendo ser amenizado sempre que possível, uma vez que constituir uma família é um dos aspectos mais importantes para as sobreviventes (GEUE et al., 2014).

Logo, tendo conhecimento sobre esse pós-tratamento com riscos reprodutivo severos, a discussão sobre a preservação da fertilidade assume importância primordial. Bem como abordar as necessidades de fertilidade de pacientes jovens se

tornou cada vez mais importante para poder proporcionar uma melhor qualidade de vida (LAWRENZ; MAHAJAN; FATEMI, 2016).

3.3. Toxicidade reprodutiva

A toxicologia reprodutiva abrange um amplo espectro de efeitos tóxicos em todos os estágios do ciclo reprodutivo. Seu princípio é baseado na fertilidade feminina e masculina, seguida por desenvolvimento pré e pós-natal, culminando em manifestações tardias que só podem ser detectadas na próxima geração (SPIELMANN, 1998).

Testes de toxicidade reprodutiva, de acordo com as presentes diretrizes, requerem um alto número de animais (VAN WOUDENBERG et al., 2012). Além disso, a Política Comunitária para Produtos Químicos provavelmente aumentará o número de animais para testes de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, com intuito de assegurar um alto nível de proteção à saúde humana e ao meio ambiente (ROGERS, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2013; VAN DER JAGT et al., 2004). Dessa forma, seguindo o princípio dos 3Rs, estratégias de triagem de toxicidade alternativas que proporcionam a redução no uso de animais foram desenvolvidas e validadas a fim de suprir essa necessidade (VAN WOUDENBERG et al., 2012; GENSCHOW et al., 2002; TESSARO et al., 2015).

Protocolos de PIVE são importantes plataformas para avaliar a toxicidade reprodutiva (VAN WOUDENBERG et al., 2012; PELTOLA et al., 2004). Nesse sentido, a etapa de maturação *in vitro*, em especial, constitui um importante modelo para a elucidação dos mecanismos subjacentes à formação de um oócito competente (DEL COLLADO et al., 2016; GANDOLFI; BREVINI, 2010).

Dentro das espécies domésticas, a MIV de oócitos bovinos (MIVb) é rotineiramente aplicada para fins de reprodução assistida na criação de animais com alto grau de sucesso (LORENZETTI et al., 2011, RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2012). Além disso, o modelo bovino é, em particular, um excelente modelo animal para a pesquisa reprodutiva de pré-implantação a ser extrapolada para a espécie humana, já que ambas as espécies possuem semelhanças consideráveis (POCAR et al., 2003; CAMPBELL et al., 2003; RUSSELL et al., 2006; PETRO et al., 2012). Mulheres e vacas são ovuladoras únicas e apresentam padrões comparáveis em relação a microtúbulos, tamanho do oócito, tempo de ativação do genoma,

desenvolvimento pré-implantacional e duração da gestação (NAVARA et al., 1996; ANDERIESZ et al., 2000; NEUBER; POWERS, 2000). Além disso, por utilizar material proveniente de abatedouro, este ensaio também contribui significativamente para o princípio 3Rs (VAN WOUDENBERG et al., 2012).

Várias décadas de pesquisa científica demonstraram que a produção *in vitro* de embriões bovinos é extremamente sensível às alterações das condições de cultura (GOOVAERTS et al., 2009; 2012). Por serem quimicamente definidos, estes meios permitem um refinamento do protocolo em termos de repetibilidade e consistência (HARENG et al., 2005). Com isso torna-se possível a avaliação de novas moléculas e compostos não apenas na maturação nuclear, mas também na maturação citoplasmática de forma sensível e em menores concentrações do que o necessário no processo de fertilização (LAZZARI et al., 2008; VAN WOUDENBERG et al., 2012).

3.3.1. Gameta feminino e maturação

Os oócitos são as células germinativas femininas diferenciadas através de um processo chamado oogênese, o qual acarreta na geração de uma reserva finita destes gametas, produzida apenas durante o período de desenvolvimento fetal nos mamíferos (MARION et al., 1971; HIRSHFIELD, 1991). Neste processo divisões extremamente assimétricas ocorrem, levando à formação de uma célula grande, o oócito, e dois corpúsculos polares. Tal assimetria de dimensão é fundamental para manter as reservas maternas acumuladas no gameta durante a oogênese, com intuito final de sustentar o desenvolvimento embrionário (VERLHAC; TERRET, 2016).

A reserva ovariana consiste em oócitos imaturos, cujos núcleos estão improgressivos em primeira divisão meiótica, em estágio denominado vesícula germinativa (VG) (FORTUNE et al., 1994). A maturação meiótica pode ser retomada através de estímulos hormonais (*in vivo*) ou aspiração mecânica e manutenção das condições necessárias (*in vitro*) (RICHARD; SIRARD, 1996; PINCUS; ENZMANN, 1935). Assim, a maturação dos oócitos é um processo longo que permite que o gameta adquira uma capacidade intrínseca de suportar os estágios subsequentes de desenvolvimento (MAO et al., 2014). Este processo envolve eventos extremamente complexos e distintos, embora interligados, de maturação nuclear e citoplasmática.

Tais mudanças estruturais estão intrinsecamente associadas à reorganização de um importante componente do citoesqueleto, o microtúbulo, sendo este um modulador essencial durante fases específicas do ciclo celular (KIM et al., 1996; 2000).

A maturação nuclear envolve a quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação e segregação dos cromossomos, conclusão da meiose I, extrusão do primeiro corpúsculo polar e parada na metáfase da segunda divisão meiótica (MII). (MAYES; SIRARD, 2001; ROTH; HANSEN, 2005). Já a maturação citoplasmática envolve reorganização e armazenamento de RNAs mensageiros (mRNAs), proteínas e fatores de transcrição que atuam no processo geral de maturação, assim como redistribuição de organelas citoplasmáticas (FERREIRA et al., 2009; WATSON, 2007; MAO et al., 2014).

Durante o estágio VG do oócito, os microtúbulos promovem a formação de uma rede responsável por envolver organelas com uma membrana com intuito de possibilitar a movimentação e reorganização das mesmas (ALBERTINI, 1992). Entrando na fase M do ciclo celular os microtúbulos se encontram próximos à cromatina condensada após o evento de GVBD. Na metáfase I (MI), esses componentes do citoesqueleto conjuntamente com o centrossoma formam o fuso meiótico e a placa metafásica (Figura 1A), na qual os cromossomos ficam dispostos de maneira equatorial (ALBERTINI, 1992; STOJKOVIC et al., 2001; FAN; SUN, 2004). O fuso possui formato de barril e pólos achatados (LI et al., 2005).

Por conseguinte, conforme a célula se aproxima da anáfase I, os cromossomos começam a se segregar e, com isso, grande parte dos microtúbulos pode ser visualizada entre os dois conjuntos de cromossomos segregantes. Já na telófase I, estes microtúbulos formam uma estrutura triangular em forma de cone (Figura 1B), possuindo uma porção mais larga e outra mais afunilada, sendo a primeira ligada ao conjunto de cromossomas destinados a extrusão para fora da célula, formando assim o primeiro corpúsculo polar, e a segunda associada ao conjunto que permanecerá no oócito e entrará em meiose II, gerando novamente uma placa metafásica (LI et al., 2005; FERREIRA et al., 2009).

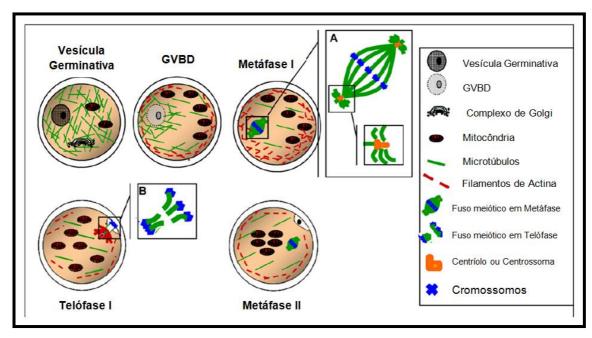


Figura 1. Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos bovinos. (A) Detalhe do aparato do fuso meiótico na metáfase I e na estrutura centríolo/centrossoma. (B) Detalhe do fuso meiótico na telófase I, no qual pode-se ver os microtúbulos entre os conjuntos de cromossomos. Fonte: Adaptada de FERREIRA et al., 2009.

Além dessa complexidade, a maioria dos oócitos, por razões ainda não completamente elucidadas, degenera de forma parcial ou total durante a oogênese os centrossomos. Estes são caracterizados como os principais centros organizadores de microtúbulos que a maioria das células mitóticas utiliza para montar e posicionar seus fusos (Figura 2) (HERTIG; ADAMS, 1967; SATHANANTHAN, 1997). Dessa forma, em algumas espécies os gametas femininos utilizam vias independentes para formação de fusos (KHODJAKOV et al., 2000; BASTO et al., 2006; AZIMZADEH et al., 2012; BAZZI; ANDERSON, 2014), resultando em um processo sequencial e lento, sendo o principal motivo para a morfogênese e posicionamento do fuso atípicos nessas células (BENNABI; TERRET; VERLHAC, 2016).

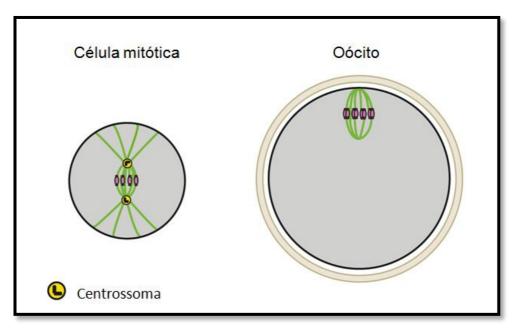


Figura 2. Montagem e posicionamemto do fuso na ausência de centrossomas. As células estão em cinza, e os oócitos são envolvidos por uma camada protetora de glicoproteínas, a zona pelúcida (bege). O DNA está em rosa, microtúbulos em verde, centríolos em preto e material pericentriolar (PCM) em amarelo. FONTE: Adaptada de VERLHAC; TERRET, 2016.

Logo, durante a meiose do oócito os microtúbulos desempenham um papel fundamental, podendo permanecer inalterados ou sofrer modificações de acordo com as necessidades da célula, a fim de realizar a difícil tarefa de segmentar seu citoplasma de forma desigual, ao passo que divide seus cromossomos igualmente. Químicos que atuam sobre esse sistema estrutural do citoesqueleto interferem gravemente na dinâmica da reorganização da cromatina do oócito nos diferentes passos meióticos, desde a VG até a fase da metáfase II. Essas substâncias podem gerar diversas anormalidades nos fusos, sendo extremamente nocivas ao desenvolvimento deste gameta(LAZZARI et al., 2008).

3.3.2. 3Rs

Os 3Rs, assim denominado em função das iniciais em inglês de seus principais objetivos, redução (Reduction), refinamento (Refinement) e substituição (Replacement), são princípios fundamentais para orientar a pesquisa ética concomitante à utilização animal (SCHECHTMAN, 2002; RUSSEL; BURCH, 1959; BALLS, 1994; FLECKNELL,1994). Propostos inicialmente por Russel e Burch em 1959 (RUSSELL; BURCH, 1959), os 3Rs foram amplamente aceitos e adaptados à

sociedade moderna em geral e à pesquisa científica (CHAPMAN, 2013) e, atualmente, são incorporados como um conceito-chave em diversas legislações importantes que regulamentam o uso de animais em pesquisas (FILIPECKI et al., 2011; KUROSAWA, 2007; KONG; QIN, 2010; PEREIRA et al., 2004).

Ademais, estão integrados em diretrizes internacionais para testes de toxicidade, como as desenvolvidas pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2014), assim como em testes regulatórios aplicáveis a avaliações de segurança/avaliações de toxicidade para produtos químicos (EUROPEAN UNION, 2008a; EUROPEAN UNION, 2008b), pesticidas (EUROPEAN UNION, 2009a), cosméticos (EUROPEAN UNION, 2009b) e produtos farmacêuticos (OHNO, 2002). No Brasil, o bem-estar animal é englobado na Constituição (artigo 225) e no Decreto Federal de Anti-Crueldade (1934). A Lei Brasileira de Crimes Ambientais (Lei 9.605, de 1998) complementa a Constituição para incluir crimes de crueldade contra animais (BAYNE et al. 2010; MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009). Outro avanço no conceito dos 3Rs foi a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) no Brasil, com intuito de normatizar e introduzir alternativas para substituição do uso de animais no ensino ou pesquisa científica, principalmente, no que concerne ao controle de instituições (FILIPECKI et al., 2011; RIVERA et al., 2014).

Dessa forma, os princípios dos 3Rs primam por estudos com animais apenas quando o objetivo for de importância justificável, não houverem métodos alternativos válidos e exista benefício científico máximo. Todas as estratégias relevantes de redução e refinamento devem ser implementadas através de um bom design experimental, além do uso adequado da bioestatística, minimizando assim o prejuízo causado ao bem estar animal (HAYES, 2007; RICHMOND, 2002; GUHAD, 2005). Possibilitando também a formação de uma ciência melhor, mais rápida, econômica e confiável (CLARK, 2018).

4 Materiais e Métodos

4.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos e soluções utilizados a fim de desenvolver este estudo foram comprados pela Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA), exceto os que estão especificados na sequência.

4.2. Coleta dos ovários e classificação oocitária

Os ovários bovinos utilizados durante este experimento foram provenientes de fêmeas abatidas em frigorífico localizado na cidade de Pelotas/RS. Após a coleta, foram armazenados em um recipiente térmico (+/-30°C) e transportados até o laboratório de Biotecnologia do Câncer. Posteriormente, a temperatura destes ovários foi aferida e a assepsia foi realizada com auxílio de solução salina a 0,9% previamente aquecida. Os folículos que possuíam entre 2 e 8mm (LEHMKUHL et al., 2002) foram puncionados, utilizando agulhas acopladas a uma bomba de sucção a vácuo (Figura 3).

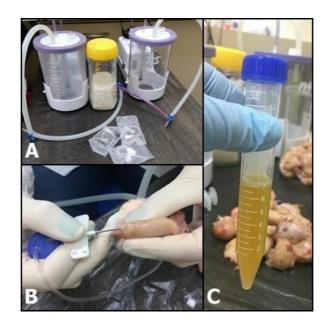


Figura 3. Sistema a vácuo de punção de ovários. (A) Bomba de sucção a vácuo, equipamento utilizado para puncionar os ovários; (B) Punção dos folículos com auxílio de agulha acoplada a um tubo cônico de 15 mL; (C) Líquido folicular armazenado em tubo cônico. Fonte: Arquivo pessoal.

O líquido folicular puncionado foi mantido em tubo cônico a 35°C, e após o tempo de sedimentação foi realizada a transferência do *pellet* formado para uma placa de petri, já o sobrenadante foi lavado com PBS (*phosphate buffered saline*) e filtrado com ajuda de filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil). Por conseguinte, com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica, foi realizada a seleção dos CCOs (complexos *cumulus*-oócito) de acordo com suas características morfológicas conforme descrito por DE et al., (1989). Foram eleitos para uso apenas oócitos com grau 1 e 2, os quais foram classificados desta maneira por possuírem o citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do *cumulus* compactas, ou citoplasma com granulações heterogêneas e menos que três camadas de células do *cumulus*, respectivamente.

4.3. Maturação in vitro (MIV)

Os CCOs selecionados para maturação *in vitro* (MIV) foram preliminarmente lavados em meio de lavagem (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil), e posteriormente distribuídos em 7 grupos contendo de 10 a 20 estruturas, dispostos em gotas de 100µl de meio MIV cobertas com óleo mineral

(In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil). Dessa forma, os 7 grupos experimentais foram identificados por: Docetaxel 1nM, 5nM, 10nM, 50nM, 100nM, grupo controle positivo (contendo etanol a 5%) e grupo controle sem nenhum tratamento. Logo após, as placas contendo os CCOs foram encubadas em estufas de cultivo (Heal Force-HF-160W) a 5% de CO₂ e 38,5°C, onde permaneceram durante 22 a 24h.

4.4. Cultivo Celular

As linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (Figura 4) e de ovário OVCAR-3 (Figura 5) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A linhagem OVCAR-3 foi cultivada com meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), obtidos da *VitrocellEmbriolife* (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA), respectivamente. Enquanto que a linhagem tumoral MDA-MB-231 foi cultivada com o meio de cultura Leibovitz, suplementado com 0,2g/L de bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB) também obtidos da obtidos da *VitrocellEmbriolife* (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas em atmosfera controlada, com 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para a linhagem OVCAR-3.

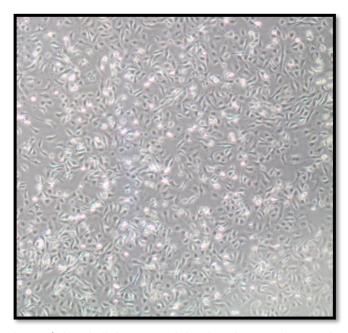


Figura 4. Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231. Fonte: Arquivo pessoal.

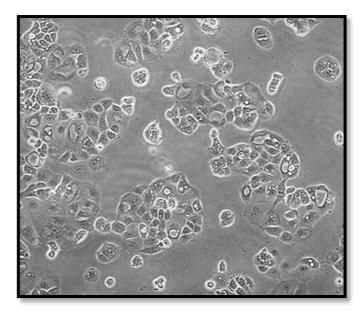


Figura 5. Imagem microscópica da linhagem celular de adenocarcinoma de ovário humano OVCAR-3. Fonte: Arquivo pessoal.

4.5. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um teste colorimétrico utilizado para avaliação da viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas nas células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro. Isso se deve aos cristais de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, os quais são insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional das mitocôndrias e, consequentemente, da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). A figura 6 demonstra a formação dos cristais de formazan a partir do MTT pelas desidrogenases mitocondriais.

Figura 6. Transformação do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan. Fonte: Própria.

4.5.1. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT - Linhagens neoplásicas

Para esse ensaio, as células foram semeadas a uma densidade de 2x10⁴ células por poço e distribuídas em uma placa de cultura celular de 96 poços com 100μL de meio de cultivo em cada cavidade. A placa foi incubada na estufa, por 24h, para sedimentação das células. Após, as células foram submetidas ao tratamento com docetaxel, nas concentrações de 1nM, 5nM, 10nM, 50nM e 100nM. O composto foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionado ao meio nas concentrações desejadas. A concentração final de DMSO no poço não excedeu 0,2% e um grupo adicional foi exposto a uma concentração equivalente deste solvente. Nos poços controles, 100μL de meio de cultura são adicionados. Todos os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento, em triplicata e a citotoxicidade foi avaliada após 24h de exposição aos tratamentos.

Após o período de incubação, o meio foi removido e posteriormente foi adicionado 180μl de meio e 20μl de MTT em cada poço (5mg de MTT/mL). As células foram incubadas por mais 3h e o meio foi descartado. Foi adicionado 100μl de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan e a placa foi agitada por 10min. Posteriormente, foi realizada a leitura do experimento em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) a um comprimento de onda de 492nm. A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada através da fórmula: % de inibição = (1- Abs492 células tratadas/Abs492 células controles) × 100.

4.5.2. Ensaio colorimétrico de Redução do MTT - Oócitos

A citotoxicidade em oócitos bovinos foi determinada pelo ensaio MTT de acordo com Van Woudenberg et al. (2012) com pequenas modificações, sendo realizado em triplicata e em três repetições de experimentos independentes. Vinte horas após o início da MIV, os COCs foram transferidos para gotas de 100μL de PBS-PVP (1 mg/mL de polivinilpirrolidona em PBS) e as células do *cumulus* foram removidas com sucessivas pipetagens, posteriormente os oócitos desnudos foram lavados em mais 2 gotas de 100μL de PBS-PVP. Em seguida, os oócitos foram reincubados na placa de MIV em seus respectivos grupos experimentais, onde em cada gota de 100μL de meio MIV foi adicionado 2μL de solução de MTT para atingir uma concentração final de 0,5mg/mL. Após, os oócitos foram realocados na estufa para completar as 2h restantes de MIV a 38,5°C e 5% de CO₂. Passado o tempo de reincubação, os oócitos foram avaliados sob estereomicroscópio, onde os oócitos que apresentaram coloração roxo escuro (Figura 7B) foram classificados como viáveis e os oócitos claros (Figura 7A) como não viáveis.

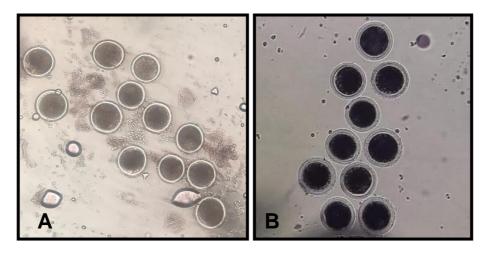


Figura 7. Ensaio de MTT. (A) Oócitos não viáveis (sem coloração); (B) Oócitos viáveis (corados em roxo). Fonte: Arquivo pessoal.

4.6. Ensaio Live/Dead

O kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity possui dois compostos fluorescentes, a acetometoxi-calceína e o homodímero de etídio-1, que marcam células viáveis e inviáveis, baseando-se na integridade de membrana e na atividade de esterase. A acetometoxi-calceína ao penetrar nas células viáveis é clivada por esterases

intracelulares liberando a calceína (Ex/Em ~495 nm/~515 nm), emitindo fluroescência na cor verde (Figura 8B). Já o heterodímero de etídio-1 (Ex/Em ~495nm/~635nm) penetra em células com danos de membrana e se intercala no DNA destas células, emitindo fluorescência na cor vermelha (Figura 8A) (MERDASSI et al., 2011).

4.6.1. Ensaio Live/Dead - Oócitos

Após 24h de MIV, os oócitos foram submetidos à coloração utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Live/Dead— Viability/Cytotoxicity Kit — Molecular Probes Inc.), com pequenas modificações nas instruções do fabricante. As células do *cumulus* dos COCs foram removidas por sucessivas pipetagens com o auxílio de hialuronidase (160 UI/mL). Após, os oócitos foram lavados em gotas de 100μl de solução de PBS-PVP, e posteriormente corados utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. Passado o tempo de incubação com os corantes, os oócitos foram lavados em mais 2 gotas de 100μL de PBS-PVP,e então alocados em lâminas e avaliados sob microscópio confocal (Leica Microsystems- TCS SP8). Vale ressaltar que este ensaio foi realizado em triplicata e em três repetições de experimentos independentes.

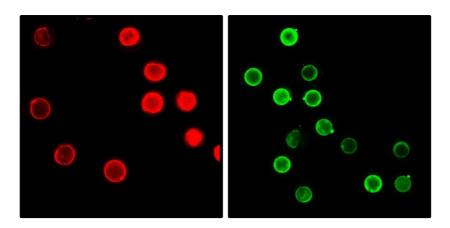


Figura 8. Ensaio de Live/Dead. (A) Oócitos não viáveis; (B) Oócitos viáveis. Fonte: Arquivo pessoal.

4.7. Análises estatísticas

A análise estatística utilizada para avaliar a viabilidade e toxicidade oocitária foi o teste Qui-quadrado seguido de Teste exato de Fisher, realizados com auxílio do software STATISTICS. Já a citotoxicidade em linhagens celulares de câncer foi analisada utilizando o teste *one-way* ANOVA, fazendo uso do *software GraphPad Prism* versão 6. O grau de significância estatística em todas as análises foi definido em um nível de probabilidade de *p*<0.05.

5 Resultados

5.1. Ensaio Live/Dead

Após a análise da fluorescência emitida por cada oócito, verificou-se que entre os grupos tratados e o controle não houve diferença estatística significativa em relação à viabilidade (p>0,05), demonstrando que neste parâmetro e concentrações avaliadas o docetaxel não foi tóxico. Já quando o grupo controle positivo é comparado com os demais existe uma redução na viabilidade celular, possuindo diferença estatística, comprovando a eficácia da execução da técnica (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade celular de oócitos bovinos maturados na presença ou ausência de Docetaxel.

Grupos experimentais	Oócitos totais	Oócitos não viáveis
Controle	42	5 ^b
Controle positivo (Etanol 5%)	44	44 ^a
Docetaxel 1nM	44	4 ^b
Docetaxel 5nM	42	1 ^b
Docetaxel 10nM	44	3 ^b
Docetaxel 50nM	38	1 ^b
Docetaxel 100nM	41	3 ^b

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa.

5.2. Ensaio colorimétrico de MTT - Oócitos

Os resultados obtidos no ensaio de redução do MTT (Tabela 2) demonstram que o quimioterápico docetaxel não possuiu efeito tóxico em nenhuma das concentrações testadas, uma vez que não diferiu estatisticamente do controle (p>0,05). Apenas houve diferença estatística significativa quando o grupo controle positivo foi comparado aos demais, comprovando assim a eficácia do procedimento experimental.

Tabela 2. Viabilidade mitocondrial de oócitos bovinos maturados na presença ou ausência de Docetaxel.

Grupos experimentais	Oócitos totais	Oócitos não viáveis	
Controle	41	1 ^b	
Controle positivo (Etanol 5%)	48	48 ^a	
Docetaxel 1nM	44	1 ^b	
Docetaxel 5nM	42	3 ^b	
Docetaxel 10nM	40	5 ^b	
Docetaxel 50nM	46	1 ^b	
Docetaxel 100nM	40	3 ^b	

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa.

5.3. Ensaio colorimétrico de MTT - Linhagens Neoplásicas

Com relação ao ensaio de redução do MTT, os resultados demonstram que o quimioterápico docetaxel diminuiu significativamente a viabilidade das células de câncer de mama e ovário *in vitro*, dessa forma comprovando sua eficácia citotóxica. Assim, o agente demonstrou uma maior citotoxicidade sobre as células de câncer de ovário, sendo capaz de inibir o crescimento em até 50% na linhagem OVCAR-3 (Figura 9) e 25% na linhagem MDA-MB-231 (Figura 10) após 24h de tratamento com as respectivas concentrações do composto.

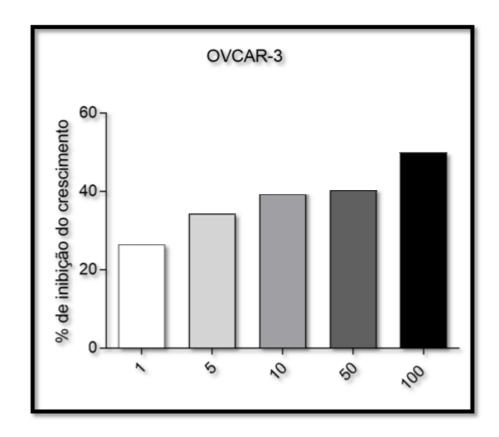


Figura 9. Inibição da viabilidade celular da linhagem OVCAR-3 investigada pelo ensaio de MTT. Fonte: Arquivo pessoal.

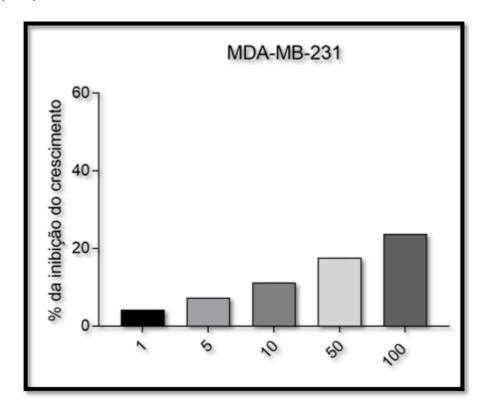


Figura 10. Inibição da viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231 investigada pelo ensaio de MTT. Fonte: Arquivo pessoal.

6 Discussão

Ensaios *in vitro* mostraram que gametas femininos podem ser utilizados eficientemente para identificar e compreender os efeitos toxicológicos de diferentes moléculas (LAZZARI et al., 2008; VAN WOUDENBERG et al., 2012; LUCAS et al., 2015; 2017; REMIÃO et al., 2016), possuindo sensibilidade ainda maior que o teste de fertilização *in vitro* (LAZZARI et al., 2008). Sabe-se também que ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados, especialmente no campo de avaliação de novas drogas (LANGDON, 2010). Com isso, a eficácia citotóxica e funcional do docetaxel pôde ser comprovada no presente estudo, demonstrando significativo potencial de inibição em células neoplásicas mitóticas através do teste de MTT, corroborando com publicações anteriores que utilizaram as mesmas linhagens e quimioterápico (BIJMAN et al., 2009; KASTL et al., 2010; WANG et al., 2011; PARK et al., 2015; WANG et al., 2015).

Lazzari et al. (2008) afirmou que a faixa ativa identificada para um determinado agente era até 100 vezes menor para o teste de maturação em comparação com a dose normalmente utilizada em células somáticas *in vitro*, possuindo relatos corroborando tal afirmação também na espécie porcina (FULKA et al., 1986). No presente estudo, as concentrações utilizadas foram escolhidas através de um *range* de IC₅₀ encontrados para 50 diferentes tipos de linhagens celulares neoplásicas somáticas. Entretanto, quando as mesmas concentrações do composto docetaxel foram utilizadas na maturação oocitária e nas linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, apenas pode-se visualizar efeitos de toxicidade nas células neoplásicas, indo de encontro com a hipótese de Lazarri et al. (2008).

Ainda, já foi relatado na literatura que compostos os quais interferem na dinâmica microtubular e na formação do fuso perturbaram a retomada meiótica (KIM et al., 2000; SIMERLY; SCHATTEN, 1993; TREMOLEDA et al., 2001; CORTVRINDT; SMITZ, 2002; SUN et al., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo divergem desta afirmação, não indicando a perturbação da parada meiótica, uma vez que desta decorreria danos à membrana e à mitocôndria, os quais não foram constatados em nenhum dos tratamentos aos quais os oócitos foram submetidos.

Argumentou-se que a catástrofe mitótica seria fundamentalmente diferente da apoptose (RONINSON et al., 2001), entretanto as duas possuem características comuns. A morte celular decorre da condensação da cromatina, clivagem internucleossômica do DNA genômico, permeabilização da membrana mitocondrial externa e formação de projeções na membrana (KERR et al., 1972; BATISTATOU et al., 1993; BRENNER; KROEMER, 2000; FERRI; KROEMER, 2001; RAVAGNAN et al., 2002). Assim, pode-se inferir através dos resultados de viabilidade mitocondrial e de membrana que tais mecanismos de morte celular não foram ativados.

A hipótese de avaliar as células do *cumulus* conjuntamente com os oócitos para testes de toxicidade poderá prover uma informação significativamente relevante. Células mitoticamente ativas, como as CCs, são mais propensas e vulneráveis a danos decorrentes da administração de docetaxel do que oócitos. Confirmando esta hipótese, a morte dos oócitos seria proveniente do dano às células do *cumulus* e à perda das conexões do oócito-CC (THOMSON et al., 2010). Além disso, provavelmente as concentrações necessárias para gerar dano apenas ao oócito sejam mais altas do que as necessárias para manifestar nos CCOs.

Alm et al. (1998) demonstraram que quando oócitos bovinos foram expostos à baixas concentrações de pesticidas, o efeito foi evidente não durante a maturação do oócito, mas apenas no desenvolvimento da mórula ou do estágio de blastocisto. Campagna et al. (2001) encontraram resultados semelhantes expondo oócitos suínos a uma mistura de pesticidas, observando não apenas uma diminuição na taxa de blastocisto, mas também na qualidade dos mesmos. Dessa forma acreditase que o período de 24h decorrentes da maturação pode ser insuficiente para avaliar danos dependendo do composto e concentrações utilizados, embasando outra possível explicação para os resultados encontrados no presente trabalho.

Nesse contexto, a utilização de oócitos de outras espécies possibilitaria análises diferenciadas e possivelmente uma divergência nos resultados. Suínos possuem maior tempo de maturação oocitária e têm sido considerados modelos úteis para estudos biomédicos, devido suas semelhanças anatômicas e fisiológicas com os humanos (PRATHER, 2013). Além disso, o sequenciamento de seu genoma demonstrou diversas similaridades genéticas com a espécie humana (GROENEN et al., 2012), apontando um interessante candidato.

7 Conclusões e perspectivas

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o quimioterápico docetaxel não possui efeito citotóxico sobre oócitos bovinos dentre o *range* de concentrações e parâmetros analisados. Assim, considerando que até o presente momento os trabalhos publicados sinalizam a necessidade de uma avaliação individualizada do oócito (sem as células do *cumulus*), este trabalho pôde subsidiar a hipótese da importância da avaliação concomitante das células do *cumulus* em ensaios toxicológicos reprodutivos para o docetaxel.

Logo, tendo em vista os resultados promissores apresentados, como perspectiva espera-se continuar investigando parâmetros de toxicidade do composto testado, a fim de:

- a) Realizar análises toxicológicas nas células do cumulus e CCOs;
- b) Investigar a ação do composto nos microtúbulos oocitário;
- c) Realizar teste de avaliação da maturação oocitária;
- d) Prosseguir com o desenvolvimento embrionário para análises prolongadas da toxicidade:
- e) Realizar testes utilizando oócitos da espécie porcina.

Referências

ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p. : il.

AKRAM, Muhammad et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological research**, v. 50, n. 1, p. 33, 2017.

ALBERTINI, David F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 296, n. 1-2, p. 57-68, 1992.

ALL CANCERS Fact Sheets. International Agency for Research on Cancer. 2018. Disponível em: http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers. Acesso em: 7 nov. 2018

ALM, Hannelore et al. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 5, p. 559-563, 1998.

ALMEIDA, VL De et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Staging 7th Edition. **American Joint Committee on Cancer**, p. 1–2, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. Cancer Facts & Figures 2017, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chemotherapy Side Effects**. 2016b. Disponível em:https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/chemotherapy-side-effects.html. Acesso em: 8 nov. 2018.

ANAMPA, Jesus; MAKOWER, Della; SPARANO, Joseph A. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 195, 2015.

ANDERIESZ, C. et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. **Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 1140-1148, 2000.

ANDREU, Jose M. et al. Solution structure of Taxotere-induced microtubules to 3-nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31785-31792, 1994.

ARNOLD, Melina et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. **European journal of cancer**, v. 51, n. 9, p. 1164-1187, 2015.

AZIMZADEH, Juliette et al. Centrosome loss in the evolution of planarians. **Science**, v. 335, n. 6067, p. 461-463, 2012.

BAKER, Sharyn D. et al. Comparative pharmacokinetics of weekly and every-three-weeks docetaxel. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 6, p. 1976-1983, 2004.

BALLS, Michael. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. **Laboratory animals**, v. 28, n. 3, p. 193-211, 1994.

BASTO, Renata et al. Flies without centrioles. Cell, v. 125, n. 7, p. 1375-1386, 2006.

BATISTATOU, Anna; GREENE, Lloyd A. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. **The Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 3, p. 523-532, 1993.

BAYNE, Kathryn et al. Legislation and oversight of the conduct of research using animals: a global overview. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals**, p. 107-123, 2010.

BAZZI, Hisham; ANDERSON, Kathryn V. Acentriolar mitosis activates a p53-dependent apoptosis pathway in the mouse embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201400568, 2014.

BEGNINI, K. R. et al. Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

BENNABI, Isma; TERRET, Marie-Emilie; VERLHAC, Marie-Hélène. Meiotic spindle assembly and chromosome segregation in oocytes. **J Cell Biol**, v. 215, n. 5, p. 611-619, 2016.

BOLTON, Kelly L. et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. **Jama**, v. 307, n. 4, p. 382-389, 2012.

BERZOFSKY, Jay A. et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 11, p. 1515-1525, 2004.

BIJMAN, Marcel NA et al. Inhibition of functional HER family members increases the sensitivity to docetaxel in human ovarian cancer cell lines. **Anti-cancer drugs**, v. 20, n. 6, p. 450-460, 2009.

BISSERY, Marie-Christine et al. Docetaxel (Taxotere): A review of preclinical and clinical experience. Part I: Preclinical experience. **Anti-cancer drugs**, v. 6, n. 3, p. 339-55, 363-8, 1995.

BRENNER, Catherine; KROEMER, Guido. Mitochondria--the death Signal integrators. **Science**, v. 289, n. 5482, p. 1150-1151, 2000.

BRUCE, W. R.; MEEKER, B. E.; VALERIOTE, F. A. Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 37, n. 2, p. 233-245, 1966.

BRUNSVIG, Paal Fr et al. Pharmacokinetic analysis of two different docetaxel dose levels in patients with non-small cell lung cancer treated with docetaxel as monotherapy or with concurrent radiotherapy. **BMC cancer**, v. 7, n. 1, p. 197, 2007.

CALABRESI, Paul; CHABNER, Bruce A. In. BRUTON, L. L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2005.

CAMPAGNA, Céline et al. Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 2, p. 554-560, 2001.

CAMPBELL, B. K. et al. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-**, p. 429-443, 2003.

Câncer de mama: é preciso falar disso / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: Inca, 2014. 18p.: il. color.

CASCIATO, Dennis Albert; TERRITO, Mary C. (Ed.). **Manual of clinical oncology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

CAZARIN, Karen Cristine Ceroni; CORRÊA, Cristiana Leslie; ZAMBRONE, Flávio Ailton Duque. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Ovarian Cancer Statistics**. 2018. Disponível

em:<https://www.cdc.gov/cancer/ovarian/statistics/index.htm>. Acesso em: 21 nov. 2018

CHAPMAN, Kathryn L. et al. Pharmaceutical toxicology: designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 88-103, 2013.

CLARK, Judy MacArthur. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p.

S1-S7, 2018.

COLDITZ, Graham A.; BOHLKE, Kari. Priorities for the primary prevention of breast cancer. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 3, p. 186-194, 2014.

CROWN, John; O'LEARY, Michael. The taxanes: an update. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1176-1178, 2000.

DE, L. F.; VAN, V. C.; VAN, M. P.; KRUIP, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.**, v.24, n.2, p.197-204, 1989.

DE VASCONCELOS, A. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 4, p. 289–297, 2013.

DEL COLLADO, Maite et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction**, **Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1721-1732, 2016.

DI GIACOMO, Monica et al. Distinct DNA-damage-dependent and-independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 3, p. 737-742, 2005.

DIAZ, Jose Fernando; ANDREU, Jose Manuel. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. **Biochemistry**, v. 32, n. 11, p. 2747-2755, 1993.

ECCLES, Suzanne A. et al. Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. R92, 2013.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. — Rio de Janeiro: INCA, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. Seventh Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. 2013. Disponível

em:http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm. Acess o em: 8 nov. 2018

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Evaluation of Medicines for Human Use**: Assessment Report Docefrez. 2010. Disponível em: <www.ema.europa.eu>. Acesso em: 8 nov. 2018.

European Union (2008a) Council regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and

Restriction of Chemicals (REACH). OJEU L 142/1.

European Union (2008b) Regulation No (EC) 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives

European Union (2009a) Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/ 117/EEC and 91/414/EEC. OJEU L 309/1.

European Union (2009b) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. OJEU L 342/59.

EVANS, D. Gareth et al. Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 155, 2008.

FABBRI, Francesco et al. Sequential events of apoptosis involving docetaxel, a microtubule-interfering agent: a cytometric study. **BMC Cell Biology**, v. 7, n. 1, p. 6, 2006.

FAN, Heng-Yu; SUN, Qing-Yuan. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 3, p. 535-547, 2004.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009.

FERLAY, Jacques et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010.

FILIPECKI, Ana Tereza Pinto et al. The Brazilian legal framework on the scientific use of animals. **ILAR journal**, v. 52, n. 1, p. E8-E15, 2011.

FLECKNELL, P. A. Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. **Laboratory animals**, v. 28, n. 3, p. 222-231, 1994.

FLEISCHER, Roni T.; VOLLENHOVEN, Beverley J.; WESTON, Gareth C. The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 66, n. 4, p. 248-254, 2011.

FERREIRA, Daniel W.; ALLARD, Patrick. Models of germ cell development and their application for toxicity studies. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56,

n. 8, p. 637-649, 2015.

FERRI, Karine F.; KROEMER, Guido. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. E255, 2001.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FRESHNEY, R. Ian. Basic principles of cell culture. **Culture of cells for tissue engineering**, p. 11-14, 2006.

Fuchs, F. D., Wannmacher, L. *Farmacologia clínica* – fundamentos da terapêutica racional. 4ed. Rio de Janeiro/RJ. GUANABARA KOOGAN, 2010.

FULKA, J.; MOTLIK, J.; JILEK, F. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 77, n. 1, p. 281-285, 1986.

GANDOLFI, Fulvio; BREVINI, Tiziana AL. RFD Award Lecture 2009. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 3, p. 495-507, 2010.

GENSCHOW, Elke et al. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. **ATLA-NOTTINGHAM-**, v. 30, n. 2, p. 151-176, 2002.

GEUE, Kristina et al. The desire for children and fertility issues among young German cancer survivors. **Journal of Adolescent Health**, v. 54, n. 5, p. 527-535, 2014.

GEY, GO et al. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Research.**, v. 12, p. 264-265, 1952.

GLIGOROV, Joseph; LOTZ, Jean Pierre. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. **The oncologist**, v. 9, n. Supplement 2, p. 3-8, 2004.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 729-738, 2009.

GOOVAERTS, I. G. F. et al. Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 8, p. 1084-1092, 2012.

GRAY, Janet M. et al. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 94, 2017.

GROENEN, Martien AM et al. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 393, 2012.

GÜCER, Fatih et al. Effect of paclitaxel on primordial follicular reserve in mice. **Fertility and sterility**, v. 76, n. 3, p. 628-629, 2001.

GUHAD, Faisal. Introduction to the 3Rs (refinement, reduction and replacement). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 58-59, 2005.

HALDAR, Subrata; BASU, Aruna; CROCE, Carlo M. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. **Cancer research**, v. 57, n. 2, p. 229-233, 1997.

HANAUSKE, Axel-R. et al. Effects of Taxotere and taxol on in vitro colony formation of freshly explanted human tumor cells. **Anti-cancer drugs**, v. 3, n. 2, p. 121-124, 1992.

HARENG, Lars et al. The integrated project ReProTect: a novel approach in reproductive toxicity hazard assessment. **Reproductive Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2005.

HARRIS, Lyndsay N. et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline summary. **Journal of oncology practice**, v. 12, n. 4, p. 384-389, 2016.

HAYES, A. Wallace. **Principles and methods of toxicology**. Crc Press, 2007.

HERTIG, Arthur T.; ADAMS, Eleanor C. Studies on the human oocyte and its follicle: I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. **The Journal of cell biology**, v. 34, n. 2, p. 647-675, 1967.

HIGDON, Ruth E. et al. The effects of cisplatin on murine metaphase II oocytes. **Gynecologic oncology**, v. 47, n. 3, p. 348-352, 1992.

HIRSHFIELD, Anne Newman. Development of follicles in the mammalian ovary. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1991. p. 43-101.

HOLMES, Anthony M.; CRETON, Stuart; CHAPMAN, Kathryn. Working in partnership to advance the 3Rs in toxicity testing. **Toxicology**, v. 267, n. 1-3, p. 14-19, 2010.

HOW CHEMOTHERAPY Drugs Work. American Cancer Society. 2016a. Disponível em: https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html. Acesso em: 7 nov. 2018.

HOWLADER, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER website, 2011. **Google Scholar**, 2015.

HU, Quanyin et al. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 98, p. 19-34, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/ tiposdecancer/site/home >. Acesso em: 24 set. 2017.

JAYSON, Gordon C. et al. Ovarian cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1376-1388, 2014.

JOHNSTONE, Ricky W.; RUEFLI, Astrid A.; LOWE, Scott W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **cell**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Biologia Celular e Molecular. 9ª edição; Ed. **Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro**, 2012.

KASTL, Lena; BROWN, Iain; SCHOFIELD, Andrew C. Altered DNA methylation is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. **International journal of oncology**, v. 36, n. 5, p. 1235-1241, 2010.

KAVANAGH, John J. Docetaxel in the treatment of ovarian cancer. **ONCOLOGY-WILLISTON PARK THEN HUNTINGTON THE MELVILLE NEW YORK**-, v. 16, n. 6; SUPP/6, p. 73-82, 2002.

KERR, John FR; WYLLIE, Andrew H.; CURRIE, Alastair R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KHODJAKOV, Alexey et al. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. **Current Biology**, v. 10, n. 2, p. 59-67, 2000.

KIM, Nam-Hyung et al. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 43, n. 2, p. 248-255, 1996.

KIM, Nam-Hyung et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. Zygote, v. 8, n. 1, p. 25-32, 2000.

KONG, Qi; QIN, Chuan. Analysis of current laboratory animal science policies and administration in China. **ILAR journal**, v. 51, n. 1, p. E1-E10, 2010.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103-114, 1998.

KUROSAWA, Tsutomu Miki. Japanese regulation of laboratory animal care with 3Rs. **AATEX**, v. 14, p. 317, 2007.

LANGDON, Simon P. Cancer cell culture. Humana, 2010.

LAVELLE, F. et al. Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere). In: **Seminars in oncology**. 1995. p. 3-16.

LAWRENZ, Barbara; MAHAJAN, Nalini; FATEMI, Human Mousavi. The effects of cancer therapy on women's fertility: what do we know now?. **Future Oncology**, v. 12, n. 14, p. 1721-1729, 2016.

LAZZARI, Giovanna et al. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. **Toxicology** and applied pharmacology, v. 233, n. 3, p. 360-370, 2008.

LEEN, Wooin et al. Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. **The Oncologist**, v. 10, n. 2, p. 104-111, 2005.

LEHMKUHL, R. C.; MEZZALIRA A.; VIEIRA A. D.; BARBIERI, D.P; MACHADO, M. F.; RUBIN, M. I. B. & SILVA, C. A. M. Viabilidade de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. **Ars Veterinaria**, v. 18, p.273-279, 2002.

LEONARD, Gregory D.; ZUJEWSKI, Jo Anne. Docetaxel-related skin, nail, and vascular toxicity. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 37, n. 1, p. 148-148, 2003.

LI, Guang-Peng et al. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 71, n. 2, p. 220-226, 2005.

LISTER-SHARP, Deborah et al. A systematic review of the effectiveness and costeffectiveness of the taxanes used in the treatment of advanced breast and ovarian cancer. **Health Technology Assessment**, v. 4, p. 17, 2000.

LOPES, Federica et al. Docetaxel induces moderate ovarian toxicity in mice, primarily affecting granulosa cells of early growing follicles. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 20, n. 10, p. 948-959, 2014.

LORENZETTI, Stefano et al. Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: the contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 47, p. 429-444, 2011.

LUCAS, Caroline G. et al. High doses of lipid-core nanocapsules do not affect bovine embryonic development in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 194-201, 2017.

LUCAS, Caroline Gomes et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during in vitro oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 131-139, 2015.

MAO, Luna et al. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive biomedicine online**, v. 28, n. 3, p. 284-299, 2014.

MARION, G. B.; GIER, H. T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. **Journal of animal science**, v. 32, n. Supplement_1, p. 24-47, 1971.

MARQUES, Ruy Garcia; MORALES, Marcelo Marcos; PETROIANU, Andy. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 69-74, 2009.

MASOOD, Farha. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569-578, 2016.

MASTERS, John RW. Human cancer cell lines: fact and fantasy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 1, n. 3, p. 233, 2000.

MATZUK, Martin M. et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178-2180, 2002.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-922, 2001.

MCGUIRE III, W. P.; MARKMAN, M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. **British journal of cancer**, v. 89, n. S3, p. S3, 2003.

MEIROW, Dror et al. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 53, n. 4, p. 727-739, 2010.

MEMARZADEH, Sanaz; BEREK, Jonathan S. Advances in the management of epithelial ovarian cancer. **The Journal of reproductive medicine**, v. 46, n. 7, p. 621-9; discussion 629-30, 2001.

MERDASSI, G.; MAZOYER, C.; GUERIN, J. F.; SAAD, A.; SALLE, B.; LORNAGE, J. Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe. **Reprod.Biol.Endocrinol.**, v.9, p.78, 2011.

MIGITA, Natacha Azussa. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012.

MORSE, David L. et al. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 10, p. 1495-1504, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NASTIUK, Kent L.; KROLEWSKI, John J. Opportunities and challenges in combination gene cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 98, p. 35-40, 2016.

NAVARA, Christopher S. et al. 10 Mammalian Model Systems for Exploring Cytoskeletal Dynamics during Fertilization. In: **Current topics in developmental biology**. Academic Press, 1996. p. 321-342.

NEUBER, E.; POWERS, R. D. Is the mouse a clinically relevant model for human fertilization failures?. **Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 171-174, 2000.

OECD. **OECD Considers Animal Welfare in the Development of Test Guidelines**. 2014. Disponível

em: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/animalwelfare. Acesso em: 8 nov. 2018.

OHNO, Yasuo. ICH guidelines—implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): incorporating best scientific practices into the regulatory process. **ILAR journal**, v. 43, n. Suppl_1, p. S95-S98, 2002.

OZOLS, Robert F. et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3194-3200, 2003.

PALMA, Priscila FR et al. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 108-114, 2008.

PARK, Sang O. et al. Effects of combination therapy of docetaxel with selenium on the human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. **Annals of surgical treatment and research**, v. 88, n. 2, p. 55-62, 2015.

PELTOLA, Joanna et al. Biological effects of Trichoderma harzianum peptaibols on mammalian cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4996-5004, 2004.

PEREIRA, Shiranee et al. Animal experimentation and ethics in India: the CPCSEA makes a difference. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 32, p. 411-415, 2004.

PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

PETRO, E. M. L. et al. Endocrine disruptors and female fertility: focus on (bovine) ovarian follicular physiology. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1887-1900, 2012.

PINCUS, Gregory; ENZMANN, E. Vr. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental**

Medicine, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.

POCAR, Paola et al. Toxic effects of in vitro exposure to p-tert-octylphenol on bovine oocyte maturation and developmental competence. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 2, p. 462-468, 2003.

PRATHER, Randall S. Pig genomics for biomedicine. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 122, 2013.

RAVAGNAN, Luigi; ROUMIER, Thomas; KROEMER, Guido. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 2, p. 131-137, 2002.

REID, Brett M.; PERMUTH, Jennifer B.; SELLERS, Thomas A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. **Cancer biology & medicine**, v. 14, n. 1, p. 9, 2017.

REMIÃO, Mariana Härter et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive toxicology**, v. 63, p. 70-81, 2016

RICHARD, François J.; SIRARD, Marc-André. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 22-28, 1996.

RICHMOND, Jon. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. **ILAR journal**, v. 43, n. Suppl_1, p. S63-S68, 2002.

RINGEL, Israel; HORWITZ, Susan Band. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 4, p. 288-291, 1991.

RIOU, J. F. Cellular uptake and efflux of docetaxel (Taxotere) and paclitaxel (Taxol) in P 388 cell line. 「abstract」. In: **Proc Am Ass Cancer Res**. 1994. p. 385.

RIOU, Jean-François; NAUDIN, Annette; LAVELLE, François. Effects of Taxotere on murine and human tumor cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 187, n. 1, p. 164-170, 1992.

RIVERA, Ekaterina Akimovna Botovchenco et al. Laboratory animal science legislation in Latin America. In: **Laboratory Animals**. 2014. p. 95-116.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, Heriberto. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 21-26, 2012.

ROGERS, Michael D. The European Commission's White Paper "strategy for a future chemicals policy": a review. **Risk Analysis: AN INTERNATIONAL JOURNAL**, v. 23,

n. 2, p. 381-388, 2003.

RONINSON, Igor B.; BROUDE, Eugenia V.; CHANG, Bey-Dih. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 5, p. 303-313, 2001.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 235-244, 2005.

RUSSELL, D. Fischer et al. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1255-1270, 2006.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard; HUME, Charles Westley. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

SATHANANTHAN, A. H. Mitosis in the human embryo: the vital role of the sperm centrosome (centriole). **Histology and histopathology**, v. 12, n. 3, p. 827-856, 1997.

SCHECHTMAN, Leonard M. Implementation of the 3Rs (refinement, reduction, and replacement): validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR journal**, v. 43, n. Suppl_1, p. S85-S94, 2002.

SCHIFF, Peter B.; FANT, Jane; HORWITZ, Susan B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665, 1979.

SCHOLZ, Gabriele et al. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: correlation to in vivo teratogenicity. **Cells Tissues Organs**, v. 165, n. 3-4, p. 203-211, 1999.

SCHULTZE, E. et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triplenegative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluororacil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, n. September, p. 404–409, 2017.

SEO, Youn Gee et al. Development of docetaxel-loaded solid self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for enhanced chemotherapeutic effect. **International journal of pharmaceutics**, v. 452, n. 1-2, p. 412-420, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SILVA, Arthur de Castro Jorge et al. Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells. **Toxicology in Vitro**, v. 40, p. 214-222, 2017.

SILVA, Penildon. Farmacologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A,

2006.

SIMERLY, Calvin; SCHATTEN, Gerald. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1993. p. 516-553.

SLAVIERO, Kellie A. et al. Population pharmacokinetics of weekly docetaxel in patients with advanced cancer. **British journal of clinical pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 44-53, 2004.

SMITZ, J. E.; CORTVRINDT, Rita G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 185-202, 2002.

SPIELMANN, Horst et al. The way forward in reproductive/developmental toxicity testing. **ATLA-Alternatives to Laboratory Animals**, v. 37, n. 6, p. 641, 2009.

SPIELMANN, Horst. Reproduction and development. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. suppl 2, p. 571-576, 1998.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.

STOJKOVIC, Miodrag et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.

SUN, Fengyun et al. Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. **Mutagenesis**, v. 19, n. 1, p. 13-25, 2004.

SUN, Q. Y. et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 155-163, 2001.

TESHOME, Mediget; HUNT, Kelly K. Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics**, v. 23, n. 3, p. 505-523, 2014.

TESSARO, Irene et al. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte fertilization test. **Reproductive Toxicology**, v. 51, p. 106-113, 2015.

TESSMANN, J. W. et al. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in human bladder cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 37–46, 2017.

THOMSON, Travis C.; FITZPATRICK, Katherine E.; JOHNSON, Joshua. Intrinsic and extrinsic mechanisms of oocyte loss. **Molecular human reproduction**, v. 16, n. 12, p. 916-927, 2010.

TREMOLEDA, J. L. et al. Organisation of the cytoskeleton during in vitro maturation

of horse oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 60, n. 2, p. 260-269, 2001.

VALERO, Vicente et al. A phase II study of docetaxel in patients with paclitaxel-resistant metastatic breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 16, n. 10, p. 3362-3368, 1998.

VAN DER JAGT, Katinka et al. Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. **Report Eur**, v. 21405, p. 1-25, 2004.

VAN WOUDENBERG, Anna Beker et al. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 251-260, 2012.

VASEY, Paul A. et al. Phase III randomized trial of docetaxel—carboplatin versus paclitaxel—carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 22, p. 1682-1691, 2004.

VERLHAC, Marie-Hélène; TERRET, Marie-Emilie. Oocyte maturation and development. **F1000Research**, v. 5, 2016.

WALLACE, W. Hamish B.; KELSEY, Thomas W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8772, 2010.

WANG, Chia-Woei et al. Cisplatin-, doxorubicin-, and docetaxel-induced cell death promoted by the aqueous extract of Solanum nigrum in human ovarian carcinoma cells. **Integrative cancer therapies**, v. 14, n. 6, p. 546-555, 2015.

WANG, Li et al. Monoclonal antibody targeting MUC1 and increasing sensitivity to docetaxel as a novel strategy in treating human epithelial ovarian cancer. **Cancer letters**, v. 300, n. 2, p. 122-133, 2011.

WANI, Mansukhlal C. et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of animal science**, v. 85, n. suppl_13, p. E1-E3, 2007.

WEST, Ann-Katrine Vranso et al. Division induced dynamics in non-Invasive and invasive breast cancer. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 3, p. 123a, 2017.

WHAT Is Cancer?. National Cancer Institute. 2015. Disponível em:https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. Acesso em: 7 nov. 2018.

YAMADA, A. et al. Kinetic interpretation of the importance of OATP1B3 and MRP2 in

docetaxel-induced hematopoietic toxicity. **CPT: pharmacometrics & systems pharmacology**, v. 3, n. 7, p. 1-10, 2014.

YAUK, Carole L. et al. Approaches for identifying germ cell mutagens: Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays☆. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 783, p. 36-54, 2015.

YURGEL, V. C. et al. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1583–1591, 2014.

ZHANG, Lijiang et al. Nanoparticle delivery systems reduce the reproductive toxicity of docetaxel in rodents. **Nano Life**, v. 4, n. 04, p. 1441012, 2014.

ZHAO, Pengxiang; ASTRUC, Didier. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. **ChemMedChem**, v. 7, n. 6, p. 952-972, 2012.