

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS:
CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE**

Marcelo Barbosa Bezerra

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS:
CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE**

Marcelo Barbosa Bezerra

Orientadora: Profa. Dra.. Maria Rita Pacheco

Co-orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Vicente Russiano

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, como exigência para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária - Área de Concentração em Reprodução Animal

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2010

B574f Bezerra, Marcelo Barbosa
Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo *in vitro* e xenotransplante / Marcelo Barbosa Bezerra. -- Jaboticabal, 2010
ix , 63 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Maria Rita Pacheco
Banca examinadora: Wilter Ricardo Russiano Vicente, José Ricardo Figueiredo, Joaquim Mansano Garcia, José Antônio Visintin, Paulo Henrique Franceschini

Bibliografia

1. Folículos pré-antrais. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Xenotransplante I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

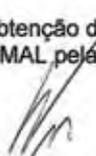


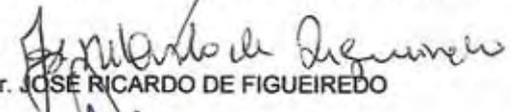
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS: CULTIVO *in vitro*
E XENOTRANSPLANTE.

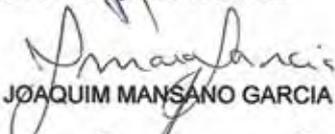
AUTOR: MARCELO BARBOSA BEZERRA
ORIENTADOR: Dr. MARIA RITA PACHECO
Co-Orientador(a): DR. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

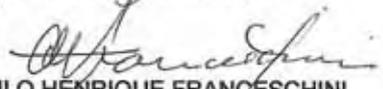
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


DR. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

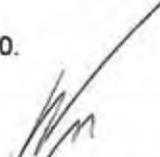

Dr. JOSÉ RICARDO DE FIGUEIREDO


Dr. JOSÉ ANTONIO VISINTIN


Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA


Dr. PAULO HENRIQUE FRANCÉSCHINI

Data da realização: 22 de fevereiro de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
DR. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE
Co-Orientador no exercício da orientação

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARCELO BARBOSA BEZERRA – filho de Francisco Alberto Nogueira Bezerra e Maria do Socorro Barbosa Bezerra, nascido em 03 de setembro de 1971, na cidade do Rio de Janeiro, é Médico Veterinário graduado pela Universidade Estadual do Ceará (1996) com mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes pela mesma Universidade em 1998. Exerceu atividades de intercâmbio científico em colaboração com a Universidade de Florença – Itália nos anos de 1997 e 1998 e, em 1999 ingressou na carreira docente na então Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Rio Grande do Norte – ESAM (atualmente Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA) nas disciplinas de Patologia Clínica e Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial. Ingressou como docente efetivo na mesma Universidade em 2002 e atualmente é professor assistente IV da mesma Universidade, respondendo pelas disciplinas de Fisiologia Animal II e Biotecnologia da Reprodução nos cursos de Medicina Veterinária e de Zootecnia. Ingressou no doutorado em 2006 na Universidade Estadual Paulista/FCAV- *Campus* de Jaboticabal, na área de Reprodução Animal. Tem experiência em diferentes áreas da Medicina Veterinária com maior ênfase em Biotecnologia da Reprodução Animal, atuando principalmente nos seguintes temas: Biotecnologia da Reprodução em ruminantes domésticos, felinos e animais silvestres, com ênfase em desenvolvimento de protocolos de MOIFOPA e transplantes gonadais.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

Dedico,

Aos meus filhos Beatriz e Benjamin,
que entenderam precocemente que a distância
física pode ser superada pelo amor de um pai que
aprendeu a orar com eles e busca incessantemente ser-lhes exemplo.

À minha mulher, Michelly Macedo,
mais um presente da espiritualidade para a minha vida.
Nessas horas sabemos que, o bem que aqui fazemos,
retorna sob a forma de alguém que amamos.

Aos meus pais, meus grandes amigos e minha família,
por todo amor, palavras de estímulo e união que sempre me
acompanharam nesta trajetória de vida repleta de aprendizados.

Por tanto amor
Por tanta emoção
A vida me fez assim
Doce ou atroz
Manso ou feroz
Eu caçador de mim

Preso a canções
Entregue a paixões
Que nunca tiveram fim
Vou me encontrar
Longe do meu lugar
Eu, caçador de mim

Nada a temer senão o correr da luta
Nada a fazer senão esquecer o medo
Abrir o peito a força, numa procura
Fugir às armadilhas da mata escura

Longe se vai
Sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir
O que me faz sentir
Eu, caçador de mim

Caçador de Mim

(Milton Nascimento/ Luís Carlos Sá/ Sérgio Magrão)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pela permissão e apoio neste período de trabalho; À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), pela acolhida; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa extemporânea concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), cujo financiamento foi fundamental para a execução desta tese.

À Profa. Dra. Maria Rita Pacheco, orientadora que desde o primeiro dia acreditou numa idéia e neste início de linha de pesquisa. Pela placidez, pelo senso de humildade e confiança irrestrita.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, exemplo de elegância e experiência na vida acadêmica. O aprendizado contigo não resume-se aos muros da Universidade, tampouco à simples relação de hierarquia. Os gestos de amizade e receptividade ficarão para sempre nas nossas memórias.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, à primeira pela presteza que lhe é peculiar, ao auxiliar nas principais dúvidas do projeto e, ao segundo, pela vibração e relação de amor exemplar à ciência ou às muitas ciências que bem faz.

Além dos professores acima mencionados, o período de trabalho e reflexão no doutorado sempre me fazem lembrar das colegas que participaram diretamente deste projeto, em primeiro lugar, à Michelly Fernandes de Macedo, que com raciocínio e mãos cirúrgicas excepcionais nos fez acreditar no possível e com maestria soube transferir o conhecimento aos colegas que com ela convivemos. Agradeço também à Márcia Cristina Matos, pelo auxílio fabuloso prestado no início da fase experimental desta tese, à Eveline dos Santos Zanetti pela

prontidão ao aceitar um desafio num momento crítico para ambos. Creio que as instituições que conquistá-las vão obter grandes ganhos científicos e de recursos Humanos (com “agá” maiúsculo mesmo) e por fim, à Marina Ragagnin de Lima, nossa última e crucial aquisição.

.

À Roberta Vantini, mais do que técnica do laboratório, um sonho de profissional que qualquer docente gostaria de ter perto de si. Sempre discreta e sorridente, sou mais uma testemunha da sua trajetória merecedora dos elogios. Agradeço-lhe também pela oportunidade de convivência no seu ambiente familiar.

Sempre pratiquei e fui adepto da filosofia que bom estagiário não reclama do tempo, mas sim bebe água da chuva e usufrui da luz do sol. Tive assim a oportunidade de conhecer alguns desses como Juliano dos Santos da Silva, estudante do Colégio Técnico Agrícola desta UNESP, exemplo de bom humor e compromisso com o que se propôs de juntos, termos que dar conta da manutenção, reprodução, acompanhamento, além do processamento e autoclavagem de tudo o que entrasse em contato com os animais experimentais. O trabalho foi pesado, mas o aprendizado foi único. Outros estagiários que merecem destaque e meus sinceros agradecimentos, são Anaemília das Neves Diniz (UFERSA), Anelise Perez (UNIBAN), Felipe Farias Cavalcante Barros (UFERSA) e Nayara Almeida do Carmo (UFERSA).

Agradeço também aos professores que fizeram suas considerações durante a qualificação, mas, sobretudo, por suas características pessoais e profissionais que sempre denotam muita seriedade e nos inspiram. Portanto, registro aqui os meus agradecimentos ao Prof. Dr. Cesar Roberto Esper, pela justeza dos seus atos e senso de humor refinado; ao Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, já um amigo a quem devo profundo respeito pela coragem e opção em ser educador acima de tudo. À Profa. Dra. Juliana Corrêa Borges e Silva, promissora e mais jovem aquisição da universidade, Além da já mencionada Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti.

Aos membros externos da banca da defesa de doutorado, Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (FAVET-UECE) e José Antônio Visintin (FMVZ-USP), pela honra da presença e pela excelente contribuição na revisão final e nas discussões durante a defesa.

Aos demais professores do programa do Curso de Pós-Graduação da UNESP, que tive a oportunidade de conhecê-los: Profa. Dra. Vera Fernanda Hossepian de Lima, uma das maiores incentivadoras deste projeto e de outros que virão, o meu reconhecimento, admiração e amizade; ao Prof. Dr. Francisco Guilherme Leite, a prova de que educação pode ser característica contagiante e ao Prof. Dr. Maurício Barbanti Duarte, um buscador de tecnologias voltadas para a conservação.

Palavras de estímulo marcam em momentos que menos esperamos, assim registro meus sinceros agradecimentos aos Prof. Dr. José Fernando Garcia (FOA/UNESP/ ARAÇATUBA) e ao Pesquisador Dr. João Henrique Moreira Viana (CNPGL/EMBRAPA), que não apenas perceberam a importância do tema, como contribuíram com sugestões para futuras aplicações dos xenotransplantes.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos (CEMIB/ UNICAMP), pelas orientações iniciais prestadas para a idealização do projeto, Ao Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig e à Dra. Rosália Regina De Luca (Biotério ICB-USP), pela cessão das matrizes de camundongos isogênicos C57 Bl/SCID, à Dra. Regina agradeço também pela prontidão nas orientações prestadas e por me fazer compreender alguns aspectos ainda desconhecidos do bioterismo. Por fim, agradeço ao Dr. Vitor Valério Maffili (FIOCRUZ – BA) pela presteza em ceder as linhagens de camundongos CB-17/SCID e BALB-c/NUDE. A cada dia deste projeto lembrei-me e repassei todas as orientações prestadas por estes profissionais aos demais colegas deste experimento, sobretudo o respeito pela vida dos animais.

Aos funcionários do setor de esterilização do Hospital Veterinário da FCAV/UNESP, José Carlos Busoli e Isaias Pereira. Duas simpáticas “peças-chave” que, sem suas colaborações, este experimento não teria a qualidade necessária, meu especial agradecimento.

Aos demais funcionários do departamento de reprodução: à eficiente Isabel Aparecida Penariol Natarelli, ao sempre prestimoso Edson de Aguiar e finalmente, ao competente Ivo Luís de Almeida Junior.

Aos: técnico em histologia, Sr. Orandi Mateus, pelo auxílio e orientações prestadas nos procedimentos de histologia e às técnicas Cláudia Aparecida Rodrigues (Microscopia Eletrônica de Varredura) e Cláudia Maria Toffanelli Fiorillo (Microscopia Eletrônica de Transmissão), pela presteza em todos os momentos em que foram solicitadas.

Às minhas colegas doutoras de 2010: à já citada Eveline dos Santos Zanetti, Maricy Apparício Ferreira, nossa “menina do sorriso bonito”, à transparente e incansável Naiara Zocal Saraiva e à internacional Fernanda da Silva Gonçalves. Entramos juntos e convivemos com nossos objetivos individuais e em comum. Neste momento, uma etapa de nossas vidas encerra rumo ao futuro que, tenho a mais absoluta certeza será de reencontros memoráveis.

Aos Pós-graduandos já egressos que tive a honra de conhecer e discutir em alguns momentos temas de importância para o projeto: Christina Ramirez Ferreira; Felipe Perecin, amigo de grandes idéias; ao dedicado Lorivaldo Paz Landim Junior, à Mabel Freitas Cordeiro, grande cicerone e profissional exemplar, Max Vitória Resende, um grande nome digno de respeito e merecedor de todo o sucesso que tem e terá, fruto de seu trabalho diferenciado e, à Rubia Bueno da Silva, que seguiu os passos dos estudos em foliculogênese e será sem dúvida uma das grandes autoridades no tema.

Aos Pós-graduandos da Reprodução Animal e demais departamentos, primeiramente quero que saibam que a convivência e o abastecimento de informações fornecidas por cada uma das pessoas citadas, por si só, já daria várias outras teses de merecida relevância, mas sintetizarei os meus mais sinceros agradecimentos pelo que mais os caracterizaram: Adriana Santana, uma das nossas mias recentes aquisições e de uma simpatia mineiríssima; Aline Costa de Lucio, amiga, colega e profissional que desconhece a palavra “não”, sua capacidade de solucionar e se apresentar nos momentos mais difíceis dos trabalhos realizados a tornam digna do sucesso que certamente obterá; à Ana Paula Perini, pela convivência e discussões aprofundadas que tivemos; à Clara Slade Oliveira, pelas informações prestadas em protocolos e senso de união; às batalhadoras Eliandra Antonia Pires e Kellen de Sousa Oliveira, duas das nossas referências em cães; às simpáticas e contagiantes Alexandra Rocha de Oliveira, Letícia Zoccolaro de Oliveira, Juliana Pinto Pieroni e Maria Carolina Villani Miguel, todas profissionais promissoras em produção e reprodução de bovinos, a esta última, agradeço ainda pelo fornecimento de ovários em pré-experimentos; à turma do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), núcleo que é parte inspiradora da aplicação desta tese; à elegante Maria Emília Franco Oliveira e ao prestativo Pedro Paulo Maia Teixeira, pelas discussões e reagentes solicitados; Aos nossos amigos colombianos Henry Cadavid, Verônica González Cadavid e todos os demais “hermanos”, conhecer um pouco mais da cultura deste país foi uma experiência bastante enriquecedora; Aos amigos do melhoramento animal: Dimas Oliveira Santos e Severino Cavalcanti Júnior, amigos das caminhadas ora contemplativas, ora atléticas e aos demais colegas, Fabio Morato Monteiro, Danilas Salinet de Melo, Fernanda Patrícia Gotardi, Jacqueline de Andrea Dernowsek Meirelles, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Valeska Rodrigues, Marcela Maria de Souza e Marcos Brandão.

Aos, além de amigos, referências em suas áreas de atuação: Felipe Voltarel Ferroni e Dr. Ricardo Souza Vasconcelos, pelas discussões sobre a importância da bioinformática e meta-análise e pelo auxílio direto no programa ainda em finalização mas que já deu suporte à tese.

À minha prima, Mayhara Cordeiro Barbosa, com quem dividi algumas de minhas angústias e sonhos, desejo a ela também que o sucesso venha de forma tranqüila e serena, do seu jeitinho.

Aos amigos e padrinhos de casamento, casais: Márcio Ribeiro Silva - Juliana Corrêa Borges e Silva e Max Vitória Resende - Adriana Oliveira de Almeida. Se particularmente uni-me a vocês pela competência, descobrir a capacidade de agregação que lhes é inerente e o lado humano foi uma das melhores lições deste período.

À todos da minha segunda e grande família do Centro Espírita Universal (CEU), Luis Carlos Ferroni - Nercy Voltarel Ferroni, Flávia Maria de Souza Carvalho - Reginaldo Carvalho, Vanderley Silva - Elisabete Businari Silva, Clorivaldo de Oliveira Júnior, Maria Angela Coelho da Silva, Rosa Melo e Luiz Carlos Lacerda, meus sinceros agradecimentos pelas reflexões espirituais que tivemos nesse período, pelo trabalho do grupo A.M.O.R. e saibam que para “os sempre” será uma grande alegria conviver com vocês.

Aos meus pais, Francisco Alberto Nogueira Bezerra e Maria do Socorro Barbosa Bezerra, meus irmãos Cláudio Alberto e Daniele Barbosa Bezerra e aos meus filhos Benjamin e Beatriz da Nóbrega Bezerra. Todos tiveram que abdicar da convivência por esse período, mas ainda assim reforço o agradecimento aos meus pais, pelo eterno apoio e por cumprirem dignamente o papel de que filhos são para o mundo; Aos meus irmãos, por sustentarem as várias emoções desse período e aos meus filhos, por serem crianças tão especiais que, pelo simples fato de já nascerem tornaram-me um ser melhor.

Finalmente, ao meu grande amor, aqui simplesmente Michelly, te agradecer nunca é demais! Somos o resultado das nossas escolhas e muitas tivemos que fazer para desfrutarmos hoje desse momento. Partindo do princípio que “*uma noite sem você é muito tempo, e uma vida com você é muito pouco*”, quero viver as muitas que virão! À você, dediquei e agradei sob diferentes aspectos esta tese, mas não me cansarei também de dedicar o meu amor, os mais lindos dias e toda minha inspiração.

	Página
SUMÁRIO	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
III. HIPÓTESES.....	12
IV. OBJETIVOS.....	13
IV.I. Geral.....	13
IV.II. Específicos.....	13
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
V.I. Fêmeas receptoras e manejo.....	14
V.II. Doadoras dos ovários.....	15
V.III. Processamento do tecido ovariano doador destinado ao transplante.....	16
V.IV. Protocolo anestésico.....	16
V.V. Ovariectomia das receptoras e xenotransplante.....	16
V.VI. Processamento do tecido ovariano destinado ao cultivo <i>in vitro</i>	19
V.VII. Meios para o cultivo <i>in vitro</i> de tecido ovariano.....	19
V.VIII. Processamento histológico.....	20
V.IX. Classificação dos folículos ovarianos e avaliação do tecido ovariano.....	20
V.X. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	21
V.XI. Análise dos resultados.....	22
V.XII. Desenho experimental.....	23

SUMÁRIO	Página
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
VII. CONCLUSÕES.....	50
VIII. IMPLICAÇÕES.....	51
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CEBEA	Comissão de Ética e Bem-Estar Animal
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IM	Intramuscular
KL	Kit-ligante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
LH	Hormônio Luteinizante
PIV	Produção <i>in vitro</i>
TGBβ	Fator de crescimento transformante β
TGF	Fator de crescimento transformante
TM	Tricrômico de Masson
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
PVA	Álcool polivinílico
SFB	Soro fetal bovino
BSA	Albumina sérica bovina
SCID	Imunodeficiência severamente combinada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentagem e número (entre parênteses) de folículos viáveis avaliados pelo azul de tripan e observados ao cultivo <i>in vitro</i> com diferentes macromoléculas e dias de cultivo.....	35
Tabela 2. Comparação entre a percentagem média e erro-padrão de folículos (normais e degenerados) no tecido ovariano de fetos bovinos doadoras (Controle) e após 30 dias de xenotransplante (n=11) (FCAV, Campus de Jaboticabal-UNESP / 2010).....	42
Tabela 3. Comparação entre a percentagem média e erro-padrão de folículos (normais e degenerados) no tecido ovariano de fetos bovinos doadoras (Controle) e colhidos por biopsia após 60 dias de xenotransplante (n=07) (FCAV, Campus de Jaboticabal-UNESP / 2010).....	42
Tabela 4. Comparação entre percentagem média e erro-padrão de folículos (normais ou degenerados) no tecido ovariano de animais doadores e xenotransplantados submetidos à biopsia após 30 e 60 dias (n=5)	45
Tabela 5. Número de folículos observados, taxa de recuperação de oócitos e expansão do cumulus em receptoras responsivas ao eCG e r-hFSH.....	47

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Possíveis destinos de ovários colhidos emergencialmente antes ou logo após a morte de doadoras. Estão demonstradas alternativas em desenvolvimento como a MOIFOPA e o xenotransplante (setas hachuradas).....	10
Figura 2. Sistema de criação e linhagens de camundongas imunodeficientes utilizadas para xenotransplantes de ovários de fetos bovinos: a) Estante com mini-isoladores de pressão positiva; Exemplares de camundongas imunodeficientes das linhagens b) C57Bl/SCID; c) CB-17/SCID e d) BALB/c NUDE.	15
Figura 3. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos para os xenotransplantes ovarianos em camundongas imunodeficientes: a) Anestesia sendo administrada por via intraperitoneal; b) Incisão sublombar para exteriorização dos órgãos abdominais; c) Inserção dos fragmentos no rim esquerdo após sua exteriorização e capsulotomia; d) Fragmentos (cinco), de córtex ovariano fetal bovino, inseridos na região subcapsular do rim das receptoras imunodeficientes; e) Sutura da camada muscular com fio inabsorvível; f) Finalização do procedimento com sutura de pele.....	18
Figura 4. Representação esquemática do experimento 1.....	24
Figura 5. Representação esquemática do experimento 2.....	25
Figura 6. Representação esquemática do experimento 4.....	28
Figura 7. Diâmetros médios de FOPA cultivados em diferentes meios durante oito dias. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$), teste de Tukey.....	30
Figura 8. Tecidos ovarianos cultivados em diferentes fontes de macromoléculas. a) Cultivo em BSA 0,1% e observado aos 2 dias; b) Cultivo em BSA 0,1% e observado aos 8 dias; c) Cultivo em SFB 10% e observado aos 2 dias; d) Cultivo em SFB 10% e observado aos 8 dias; e)	

Cultivo em PVA 1% e observado aos 2 dias; f) Cultivo em PVA 1% e observado aos 8 dias..... 32

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 9. Diâmetros médios (μm) dos folículos ovarianos normais observados ao cultivo <i>in vitro</i> por 1, 4 e 8 dias.....	33
Figura 10. Folículos pré-antrais <i>in situ</i> antes e após a coloração pelo azul de tripan (0,5%) (a,b); Folículos pré-antrais normais (seta branca) e degenerados (seta preta) após 4 dias de cultivo em BSA 0,1%.....	34
Figura 11. Obtenção e análise de fragmentos de tecido ovariano: a) Macroscopia do tecido ovariano após 30 dias de transplante; b) Biopsia do tecido ovariano com auxílio de um “punch” 2mm; c) Fotomicrografia de tecido ovarianos colhido por biopsia: circunscrito contendo FOPA; d) folículos primordiais, de transição e primários (TM, 40x); e) Neoformação vascular (ponta de seta) (HE, 400x); f) Folículos primordiais em tecido transplantado observados à microscopia eletrônica de varredura; notar forma esférica com revestimento pavimentoso e distribuição vascular (ponta de seta; 1500x).....	40
Figura 12. Relação tecidual entre tecidos doador e receptor: a) Folículo antral de aproximadamente 3 mm observado aos 30 dias pós-transplante; b) Visão geral da relação tecidual obtida entre tecido doador (ovário) e receptor (rim) a partir dos 30 dias (TM, 40x).....	41
Figura 13. Padrão de distribuição entre categorias e densidade dos FOPA: a) aos 30 dias após o transplante e b) aos 60 dias após o transplante. Notar adensamento folicular em ambas as situações.....	44
Figura 14. a-b) Padrão de atividade estrogênica observada em 69% e 72% antes da estimulação hormonal com r-hFSH e eCG, respectivamente; c) Resposta ao tratamento com r-hFSH; d) Resposta ao tratamento com eCG; e) Oócito colhido em transplante após tratamento da receptora com r-hFSH e fotografado 48 horas após a FIV; f) Oócito colhido em transplante após tratamento da receptora com eCG e fotografado 48 horas após a FIV.....	48

FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS: CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE

RESUMO: Objetivou-se testar diferentes protocolos de cultivo *in vitro* e *in vivo* de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos. Para tanto, um total de 41 ovários de fetos bovinos foram obtidos em matadouro, transportados e utilizados para o cultivo *in vitro* (n=20) e para o xenotransplante (n=21). Após processados no laboratório em fragmentos entre 0,5 e 1 mm³ foram encaminhados para os cultivos. O cultivo *in vitro* baseou-se em protocolo bem sucedido de cultivo de FOPA em caprinos e testou diferentes fontes de macromoléculas e a utilização do azul de tripan na viabilidade dos tecidos cultivados a uma atmosfera controlada de 5% CO₂ em ar, a 38,5°C e nutridos com dMEM (300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado com antibióticos, ITS, piruvato de sódio, glutamina, hipoxantina, dAMPc, bFSH e IGF-I. A depender do tratamento, foi adicionado BSA (0,1%) SFB (10%) ou PVA (1%). O cultivo *in vivo* de FOPA foi executado por xenotransplante sob a cápsula renal num total de 65 camundongas imunodeficientes. Desenvolveu-se uma técnica de biopsia e verificou-se o efeito do tempo de transplante (30, 60 e 30 e 60 dias após o transplante) sobre a percentagem e a viabilidade de FOPA bem como a possível presença de folículos antrais. Num segundo momento, 32 receptoras receberam estímulo hormonal de 10 UI de eCG (n=18) e 10 UI r-hFSH (n=14). Os resultados mostraram que o cultivo com PVA apresentou FOPA normais em percentagem semelhante aos cultivos com BSA e PVA. Quanto ao cultivo por xenotransplante, observou-se o crescimento sucessivo de FOPA até estádios antrais ao longo do tempo de transplante (> 30 dias). O resultado das estimulações exógenas apresentou folículos antrais com oócitos que apresentaram o *cumulus* expandido em 2/5 (40%) dos oócitos selecionados para MIV de cada um dos tratamentos propostos. Concluindo, FOPA oriundos de fetos bovinos podem ser cultivados por pelo menos 8 dias em PVA e crescem até os estádios antrais a partir de 30 dias após o xenotransplante com respostas igualmente variáveis aos protocolos com eCG e r-hFSH. **Palavras-Chave:** ovário, folículos pré-antrais, xenotransplante, feto bovino, camundongos imunodeficientes.

BOVINE OVARIAN PREANTRAL FOLLICLES: *IN VITRO* CULTURE AND XENOTRANSPLANTATION

ABSTRACT: This study aimed to evaluate different protocols of *in vitro* and *in vivo* preantral follicles (PFs) culture from bovine fetus. Thus, a total of 41 fetal bovine ovaries, from a slaughterhouse, were collected and transported at laboratory for *in vitro* culture (n=20) and for xenotransplantation (n=21), after processing into small cortical pieces measuring between 0,5 and 1mm³ the slices were cultured. The *in vitro* culture was based on well successful protocol of preantral follicles in caprine and tested different sources of macromolecules and trypan blue viability of cultured tissues cultured at controlled atmosphere (5%CO₂ in air, 39°C). The culture medium used was dMEM (300 mOsm/L, pH 7, 2) supplemented with antibiotics, ITS, sodium pyruvate, glutamine, hypoxanthine, dAMPc, bFSH, and IGF-I. Depending of treatment, was added BSA (0,1%), FCS (10%) or PVA (1%). *In vivo* culture of preantral follicles was carried out by xenotransplantation under renal capsule of immunodeficient females mice (total of 65) that were submitted to a biopsy technique previously developed for tissue collection and to verify the effectiveness of time of transplantation (30, 60 and 30 and 60 days post surgery) under percentage and viability as well as putative growth of PFs to antral follicles. At second stage, 32 recipient mice were submitted to hormonal stimuli with 10 IU of eCG (n=18) and 10 IU of r-hFSH (n=14). The results showed that PVA culture presented normally PF in similar distribution when compared with BSA and PVA culture. Regarding xenotransplantation, successive growth of PF until antral stages was observed belong time of transplantation. Exogenous stimulation presented oocytes with expanded cumulus in 2/5 (40%) of selected oocytes for IVM from each treatment. Conclusively PFs from fetal bovine ovaries can be cultured at PVA at least 8 days and grows until antral stages after xenotransplantation procedures from 30 days away with variable responsiveness to both exogenous eCG and r-hFSH protocols. **Key-words:** ovary, preantral follicles, xenotransplantation, bovine fetus, immunodeficient mice.

I – INTRODUÇÃO.

Os folículos ovarianos são estruturas responsáveis pelo crescimento e maturação dos oócitos neles contidos, sendo classificados pela literatura em dois grupos principais: folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) e antrais. Os primeiros diferenciam-se dos demais por serem destituídos de antro, estrutura que aparece em estádios foliculares de maior tamanho como uma cavidade repleta de fluido que nutre e regula o crescimento oocitário. Os FOPA são classificados em folículos primordiais, primários e secundários e esta distinção advém da morfologia (número e formato das células foliculares), bem como do seu tamanho. Eles constituem a principal reserva de gametas das fêmeas e correspondem a aproximadamente 90-95% da população dos folículos existentes no interior dos ovários, embora apenas 0,1% destes atinjam a ovulação sem degenerarem ao longo do crescimento (HIRSHFIELD, 1988).

A foliculogênese pode ser compreendida como o período entre a formação dos primeiros folículos primordiais até a atresia ou até o estágio de folículo pré-ovulatório seguido de ovulação (DRIANCOURT *et al.*, 2001). Investigações anteriores foram realizadas com o intuito de compreender os eventos finais da foliculogênese, com considerável quantidade de informações obtidas. Em contraposição, os eventos iniciais de ativação e crescimento do folículo primordial ainda não são plenamente conhecidos (ANDRADE *et al.*, 2005), influenciando assim no pequeno aproveitamento do potencial que essas gametas podem oferecer à reprodução animal.

É sabido que os folículos majoritários no ovário são os mais precoces, ou seja, os FOPA. Paradoxalmente, esses são os menos aproveitados principalmente pelo descarte do ovário após punção dos folículos antrais macroscopicamente visíveis. Baseados neste fato, estudos recentes evidenciam o potencial desse aproveitamento de FOPA de ruminantes para a produção *in vitro*, seja por cultivo *in vitro* (HUANMIN & YOUNG, 2000, GUPTA *et al.*, 2008) ou xenotransplante (SENBON *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2005) e o aproveitamento dos FOPA poderá fornecer oócitos para diversas outras biotécnicas que necessitem destes gametas, como por exemplo, estudos em fisiologia ou voltados para aplicação reprodutiva.

Esta pesquisa propôs-se a investigar a viabilidade de dois métodos de cultivo de FOPA. Num deles, testou-se a influência de diferentes fontes de macromoléculas no cultivo *in vitro* de FOPA bovinos; e no outro, o cultivo *in vivo* por xenotransplante de tecido ovariano. O sucesso do cultivo *in vivo* foi avaliado por meio de biopsia dos tecidos transplantados em diferentes tempos, bem como, pela resposta dos mesmos aos diferentes estímulos hormonais preconizados.

II. REVISÃO DE LITERATURA.

O crescimento de folículos pré-antrais é assunto que vem ao longo dos anos conquistando merecido destaque na área de reprodução animal. Estudos sobre como os diferentes FOPA crescem e participam da atividade ovariana podem ser executados por métodos que envolvam conhecimentos de histologia e cultivo celular. Em bovinos, diversas pesquisas foram realizadas em ovários para obtenção de informações que vão desde a estimativa da população de folículos ovarianos (ERICKSON, 1966; RUSSE, 1983; GOSDEN & TELFER, 1987; LUSSIER *et al.*, 1987) até as necessidades fisiológicas relativas à fase inicial da foliculogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 1994; HULSHOF *et al.*, 1995; SENBON *et al.*, 2003).

Os estímulos que promovem o crescimento dos folículos primordiais até que estes atinjam a ovulação ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que ocorrem diversos mecanismos relacionados aos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) e estradiol, além de fatores intraovarianos como EGF (Fator Epidérmico de Crescimento), FGF (Fator Fibroblástico de Crescimento), IGF (Fator de Crescimento Insulínico), TGFs (Fatores de crescimento transformantes), VIP (Peptídeo Vasoativo Intestinal), ativina, dentre outros, além do kit-ligande (KL) (PARROTT & SKINNER, 1999), que tem comprovado papel no crescimento de folículos primordiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Esses fatores, embora sejam importantes no desenvolvimento inicial mencionado, não são suficientes para evitar que esses folículos tenham uma alta taxa de atresia *in vivo*.

O número de folículos ovarianos pré-antrais e antrais foi estimado inicialmente a partir de procedimentos estereológicos em lâminas histológicas. Dessa forma, cálculos foram efetuados por amostragem e dados sobre a população folicular foram obtidos em bovinos (ERICKSON, 1966; RUSSE, 1983), ovinos (RUSSE, 1983) e caprinos (BEZERRA *et al.*, 1998). Nos pequenos ruminantes citados, estes autores descreveram o início da foliculogênese e tal informação possibilitou melhor direcionamento em experimentos com folículos pré-antrais oriundos de fetos, como por exemplo, a melhor idade fetal para a colheita de ovários com categorias pré-determinadas de folículos pré-

antrais ou ainda com folículos antrais, assim como a utilização desses em estudos de criopreservação ovariana (SANTOS *et al.*, 2007) e produção *in vitro* de embriões a partir de ovários fetais (CHOHAN & HUNTER, 2004).

Considerando-se que os métodos histológicos são limitados por avaliarem ovários que posteriormente tornam-se inutilizados para aplicação reprodutiva, em decorrência da ação fixadora de tecidos necessária a esses procedimentos, a MOIFOPA surgiu como alternativa de estudo da foliculogênese com manutenção da viabilidade dos oócitos para outros fins investigativos. Além disso, o desconhecimento das necessidades fisiológicas inerentes às etapas iniciais do desenvolvimento folicular, sobretudo para folículos isolados, estimulou a utilização do cultivo celular, fornecendo assim novas perspectivas. Surgiram então, os primeiros trabalhos com isolamento e cultivo *in vitro* de FOPA em bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; 1994; HULSHOF *et al.*, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 1995), além daqueles que visavam obter informações desde o processamento laboratorial do ovário até o desenvolvimento do método ideal para a obtenção de oócitos viáveis com vistas à geração de um novo descendente (ANDRADE *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2005; VAN DEN HURK *et al.*, 1997, GUPTA *et al.*, 2008).

A utilização da técnica de isolamento folicular justifica-se quando o estudo em questão busca conhecer a necessidade do FOPA sem o estroma circunvizinho, e de como os meios quimicamente definidos podem atuar no crescimento dessas estruturas. Apesar de fornecer um número adequado de FOPA, o cultivo de folículos primordiais isolados apresenta limitações em várias espécies, com resultados variáveis que necessitam da combinação de fatores de crescimento e hormônios, estando esses correlacionados diretamente ao avanço dos estádios foliculares (FORTUNE, 2003).

As razões para a utilização de meios quimicamente definidos em cultivos são pragmáticas: podem ser reproduzidas em diferentes tempos e laboratórios, sendo isentos de atividades biológicas desconhecidas, tais como as enzimas e fatores de crescimento (SUMMERS & BIGGERS, 2003).

Das macromoléculas utilizadas nesses meios quimicamente definidos para a produção *in vitro* de embriões (PIV). Em estudos com embriões murinos, o PVA foi utilizado em substituição ao BSA e os resultados mostraram-se favoráveis à

substituição do BSA pela macromolécula sintética, o PVA. Considerando-se ainda que a substituição do BSA com PVA não prejudicou a pluripotência, a organogênese, a implantação e a expressão gênica dos blastocistos cultivados, os sistemas quimicamente definidos são indicados desde que com meios de cultivo apropriados (JANG *et al.*, 2007). Em bovinos, realizou-se o cultivo de folículos pré-antrais isolados com o PVA em substituição à albumina sérica bovina (BSA) e soro fetal bovino (SFB) (COSTA *et al.*, 2001). Neste estudo observou-se a sobrevivência dos FOPA isolados, confirmando a possibilidade de utilização do PVA como macromolécula em meios quimicamente definidos por até 10 dias. Contudo, estudos feitos com esta macromolécula em fragmentos de tecido ovariano contendo FOPA, não foram realizados. Apesar dessa necessidade, os métodos de cultivo de FOPA com maior eficácia utilizam fontes de macromoléculas semi-definidas como albumina sérica bovina (GUTIERREZ *et al.*, 2000; McCAFFERY *et al.*, 2000, ITOH *et al.*, 2002), indefinidas como soro fetal bovino (HUANMIN & YONG, 2000; CECCONI *et al.*, 2004) ou soro de bovino castrado (GUPTA *et al.*, 2008).

Como alternativa à obtenção de FOPA isolados e crescidos em cultivo *in vitro*, a utilização desses, ainda inclusos no estroma de origem (*in situ*), gerou resultados viáveis quanto ao crescimento folicular, demonstrando que o cultivo tecidual forneceu suporte adequado por longos períodos com manutenção da organização celular e histoarquitetura (GUTIERREZ *et al.*, 2000). Ademais, pode-se acrescentar a possibilidade do cultivo folicular *in vitro*, a partir de ovários fetais, proporcionar melhor rendimento, pois os mesmos possuem grande número de FOPA com maior proporção de parênquima que aquele observado em fêmeas adultas (FORTUNE, 2003).

Independente dos FOPA serem cultivados isolados ou *in situ*, seus crescimentos podem ser divididos em três etapas: a primeira, diz respeito à ativação dos folículos primordiais a folículos primários; a segunda, do crescimento de folículos primários a secundários; e a última, de folículos secundários a estádios periantrais (FORTUNE, 2003). A ativação de folículos pré-antrais *in vitro* foi inicialmente estudada em ruminantes com a espécie bovina (HULSHOF *et al.*, 1995). O crescimento folicular de folículos primários a secundários foi estudado em caprinos por HUANMIN & YONG

(2000) e as publicações mais divulgadas sobre crescimento folicular em ruminantes concernem principalmente à terceira etapa. Em bovinos, os folículos utilizados nesta situação mediam entre 100 e 200 μm (McCAFFERY *et al.*, 2000), acima de 163 μm (GUTIERREZ *et al.*, 2000) ou tinham diâmetro superior a 145 μm (ITOH *et al.*, 2002), tamanho esse, que equivale ao de folículos secundários (HULSHOF *et al.*, 1994). Em caprinos, o crescimento *in vitro* foi também observado de secundários a antrais (HUANMIN & YONG, 2000) e nos ovinos, crescimento de FOPA que mediam a partir de 170 μm (secundários) até estádios antrais (CECCONI *et al.*, 2004). Recentemente, embriões bubalinos foram obtidos a partir do cultivo de FOPA de grande diâmetro (265 a 295 μm), cocultivados com células do *cumulus* (GUPTA *et al.*, 2008). Em camundongos ocorreu o nascimento de ninhadas oriundas de folículos primordiais (EPPIG & SCHROEDER, 1989; CARROL *et al.*, 1990), inclusive após procedimentos de criopreservação (CARROL *et al.*, 1990).

Os transplantes ovarianos podem ser classificados de acordo com a espécie receptora como: auto (mesmo indivíduo), iso (indivíduo geneticamente idêntico), alo (outro indivíduo da mesma espécie) ou xenotransplante (de outra espécie); ou ainda, segundo sua localização no tecido receptor, em ortotópico ou heterotópico, sendo próximos ou distantes da localização anatômica original, respectivamente (KRONH, 1977).

O conceito de xenotransplante ovariano remonta do final do século XIX e foi inicialmente aceito com reservas pela comunidade científica da época em função do desconhecimento das bases imunológicas necessárias para os transplantes entre espécies (CUPERSCHMID & CAMPOS, 2007) e de animais apropriados para tal finalidade. Por outro lado os autotransplantes ovarianos são realizados em murinos desde a década de 60 (KRONH, 1977). Em ruminantes, mais especificamente em ovinos, os autotransplantes foram realizados a partir de 1994 (GOSDEN *et al.* 1994, CAMPBELL *et al.*, 2000). Nesta espécie obteve-se uma gestação com sucesso tanto após o autotransplante a fresco, quanto com tecido ovariano criopreservado. Ainda em ovinos, esta técnica produziu uma sincronização dos folículos primordiais,

simultaneamente à retomada da ciclicidade ovariana após 3-6 meses (HUNTER *et al.*, 2004).

O autotransplante de tecido ovariano criopreservado foi realizado em caprinos (SANTOS, 2007) e ovinos (GOSDEN *et al.*, 1994; SALLE *et al.*, 2002). Em cabras, os estudos de SANTOS (2007) observaram remodelagem ovariana e comportamento de estro aproximadamente 71 dias após o autotransplante, com fragmentos submetidos ou não à congelação. Nas ovelhas foram relatados nascimentos (GOSDEN *et al.*, 1994; SALLE *et al.*, 2002) ao passo que, em bovinos, estudos com autotransplantes não são conhecidos, sendo que a provável razão disso deve-se alto custo de manutenção de fêmeas experimentais e à possibilidade de transplantes em outras espécies de laboratório com menor custo de manutenção.

Com o advento das linhagens geneticamente modificadas, e uso de camundongas e ratas imunodeficientes, surgiu uma nova possibilidade de obtenção de folículos com oócitos de tamanho apropriado para posterior maturação *in vitro* (AUBARD, 2003) fazendo com que o xenotransplante se tornasse um dos caminhos possíveis para a produção *in vitro* de embriões (PIV).

O xenotransplante promove ainda a possibilidade de serem cultivados, em outra espécie receptora, folículos ovarianos provenientes de fêmeas de alto mérito zootécnico com infertilidade adquirida ou após sua morte, podendo também ser empregada no aproveitamento de germoplasma em espécies silvestres e raças de animais domésticos em vias de extinção, com ou sem morte acidental. Os principais resultados com esta técnica em animais silvestres foram apresentados em saguis (CANDY *et al.*, 1995), elefantes (GUNASENA *et al.*, 1998) e marsupiais (WOLVEKAMP *et al.*, 2001) com crescimento de FOPA até o estágio antral. Em estudos com bovinos, SENBON *et al.* (2003; 2004a; 2004b) observaram-se o crescimento de folículos secundários oriundos de vacas até a fase antral quando transplantados em camundongas, com os oócitos apresentando dimensão suficiente para serem submetidos à maturação *in vitro* (MIV) e alcançando a metáfase da segunda divisão meiótica. Posteriormente, esta mesma equipe realizou a fertilização *in vitro* e obteve embriões no estágio de 5-8 células,

necessitando de maiores estudos acerca da competência do oócito no desenvolvimento embrionário (SENBON *et al.*, 2005).

Nascimentos por xenotransplante foram obtidos a partir de ovários de camundongos transplantados em ratas (SNOW *et al.*, 2002). Como limitações, o xenotransplante necessita de receptoras imunodeficientes, ambiente em condições para sua manutenção, acompanhamento permanente dos animais transplantados, instrumental cirúrgico para microcirurgia e equipe especializada para execução do transplante.

Os principais obstáculos relatados para a restauração da fertilidade a partir de transplante de córtex ovariano criopreservado são as aderências e risco de isquemia até que ocorram neovascularização e reperfusão sanguínea do tecido (LIU *et al.*, 2002). No que concerne à responsividade dos tecidos transplantados aos hormônios endógenos produzidos pelo animal receptor e sobre como os hormônios exógenos atuam em ruminantes, mais informações são necessárias.

Sabe-se que folículos antrais foram obtidos sem estimulação hormonal quando córtices de ovários de saguis (CANDY *et al.*, 1995), elefantas (GUNASENA *et al.*, 1988) e de uma espécie de marsupial (WOLVEKAMP *et al.*, 2001) foram transplantados em murinos. Já no caso de córtices de ovários humanos xenotransplantados para a cápsula renal de camundongos, a utilização de hormônios exógenos como o FSH e hCG estimulou o surgimento de folículos antrais (OKTAY *et al.*, 1998; WEISSMAN *et al.*, 1999). Partindo-se do princípio que os andrógenos e demais gonadotrofinas endógenas de machos poderiam auxiliar o crescimento folicular, camundongos machos, foram utilizados como receptores de tecido ovariano de vaca, com crescimento de folículos secundários a antrais, sendo estes menos viáveis quando comparados aos já normalmente encontrados nas fêmeas (SENBON *et al.* 2004b, HERNANDEZ-FONSECA *et al.*, 2005). O uso de gonadotrofinas em xenotransplantes de bovinos resultou num crescimento folicular maior quando comparado aos animais não tratados, ao passo que o mesmo não foi observado com relação ao crescimento oocitário (SENBON *et al.*, 2005).

Quanto à aplicabilidade dos transplantes em ruminantes domésticos, o autotransplante ovariano justificar-se-ia em casos de infertilidade adquirida por razões extraovarianas em fêmeas de interesse comercial e zootécnico elevado, ou ainda como suporte para estudos médicos, conforme argumentado em estudo de GOSDEN *et al.*, (1994). Os alotransplantes não apresentam uma aplicação prática em bovinos pela possibilidade de rejeição e pouca praticidade na imunossupressão destes animais. O risco de rejeição seria reduzido ao utilizar-se a técnica do isotransplante entre clones de interesse comercial farmacêutico ou científico em casos de morte inesperada ou necessidade de aproveitamento dos ovários. Assim sendo, o xenotransplante apresenta-se como uma possibilidade mais concreta de aproveitamento e manutenção dos ovários dos ruminantes, desde que seja realizado em receptores imunodeficientes. Neste caso, as linhagens de camundongos SCID (SENBON *et al.*, 2003) ou NUDE (AERTS *et al.*, 2009) e ratos NUDE (WOLVEKAMP *et al.*, 2001) podem comportar-se como receptores adequados para o estudo.

Apesar de a sigla MOIFOPA enfatizar a manipulação dos folículos e esta denominação ser normalmente associada ao cultivo *in vitro* de FOPA (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), a possibilidade de manipulação de folículos pré-antrais e seu isolamento (total ou parcial) deve ser aventada como alternativa para o xenotransplante. Nos melhores resultados obtidos com doadores bovinos, folículos secundários foram parcialmente isolados e cultivados por 6 a 8 semanas sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes com posterior fertilização *in vitro* (SENBON *et al.*, 2005). Ademais, FOPA foram obtidos a partir de biopsia ovariana associada à técnica de punção guiada por ultrassom para o cultivo *in vitro* (AERTS *et al.*, 2005).

A maturação *in vitro* (MIV) é a técnica que, associada com a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, compõe as etapas de produção *in vitro* (PIV) e inicia-se normalmente com a punção dos folículos antrais macroscópicos entre dois e seis milímetros de diâmetro (WARD *et al.*, 2000). Considerando-se que o cultivo *in vitro* de FOPA e o xenotransplante venham a produzir mais folículos viáveis, estabelecer-se-ia então uma conexão entre ambas as técnicas e a PIV, conforme pode ser observado na Figura 1.

Ademais, a espécie ruminante em que a PIV é mais bem estabelecida e difundida é a bovina, sendo o primeiro nascimento obtido na década de 80 (BRACKETT *et al.*, 1982); e é em função da espécie bovina que existe o maior número de laboratórios com pessoal treinado para a obtenção de oócitos e produção de embriões. Além disso, dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) demonstram que a China, o Brasil e a Coréia estão entre os países que mais transferem embriões provenientes da PIV, responsáveis por cerca de 96% do total mundial, sendo a maioria deles transferidos a fresco (THIBIER, 2006).

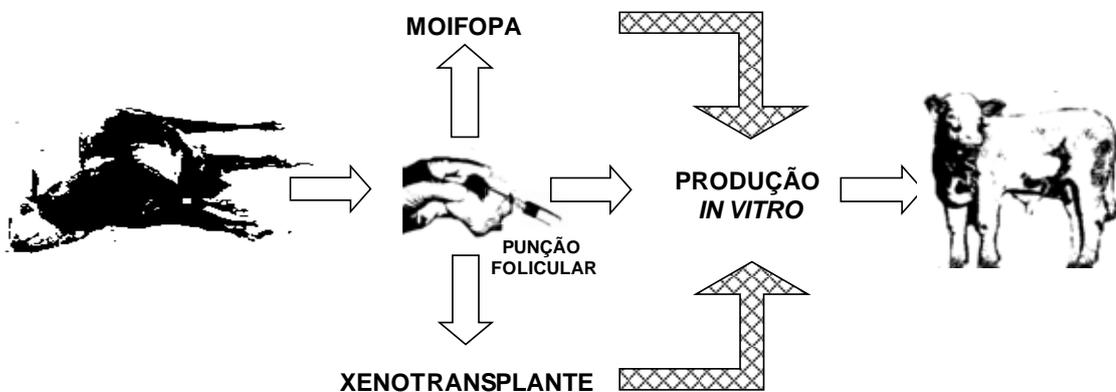


Figura 1. Possíveis destinos de ovários colhidos emergencialmente antes ou logo após a morte de doadoras. Estão demonstradas alternativas em desenvolvimento como a MOIFOPA e o xenotransplante (setas hachuradas).

O fato de o Brasil apresentar-se como país referência mundial na PIV de embriões bovinos, sobretudo em gado de corte, associado à possibilidade de melhor aproveitamento de gametas oriundos de vacas a partir dos cultivos *in vitro* e *in vivo* de FOPA seriam possíveis as seguintes aplicações: a) aumento da eficiência reprodutiva de vacas e demais animais de interesses zootécnicos, genéticos ou ecológicos; b) redução do intervalo entre gerações, com aumento do ganho genético; c) recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários (nos casos em que o patógeno não se insere no gameta); d) animais com infertilidade adquirida ou que não sejam mais responsivos à superovulação (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Acrescenta-se ainda o

aumento no fornecimento de oócitos a partir de um único indivíduo para técnicas reprodutivas que necessitem de tais gametas em grande número, como a produção *in vitro* e a clonagem, bem como a sobrevivência de folículos e manutenção da atividade ovariana em situações de emergência.

Ademais, no Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP/Jaboticabal-SP, resultados obtidos em dissertação de Mestrado utilizando a técnica de autotransplante ovariano em ratas mostraram que a ovariectomia seguida de transplante sob a cápsula renal apresenta-se plenamente exequível com sobrevivência dos modelos experimentais, crescimento de folículos pré-antrais a antrais e manutenção destes 30 dias após o transplante (MACEDO, 2007).

A possibilidade de cultivarem-se FOPA a partir de fetos poderá revelar ainda se folículos de animais impúberes apresentam crescimento equivalente aos observados em animais púberes, fornecendo assim subsídios em estudos de ganho genético (ARENDONK & BIJMA, 2003). Adicionalmente, isto permitirá verificar a hipótese de que folículos pré-antrais tornam-se mais responsivos em animais com maior concentração sérica de gonadotrofinas e fatores secretados na idade adulta; além de fornecer dados sobre a aplicação da MOIFOPA em função da idade.

III. HIPÓTESES.

- O cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos, contendo FOPA, com álcool polivinil (PVA) apresenta resultados similares àqueles cultivados com soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA).

- Receptoras submetidas à sessões única ou dupla de biopsia de tecido ovariano xenotransplantado sob a cápsula renal reagem satisfatoriamente ao procedimento de biopsia tecidual.

- FOPA derivados de ovários fetais bovinos se desenvolvem a estádios antrais ao serem xenotransplantados sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes.

- A administração de gonadotrofinas exógenas nas camundongas receptoras imunodeficientes estimula o desenvolvimento folicular dos tecidos ovarianos xenotransplantados, resultando em estruturas com dimensões apropriadas aptas à PIV.

IV. OBJETIVOS.

IV.I. Geral:

Avaliar o crescimento e a qualidade dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro* e *in vivo*, bem como, a viabilidade dos oócitos resultantes desse processo para produção *in vitro* (PIV).

IV.II. Específicos:

- Testar diferentes fontes de macromoléculas para o cultivo *in vitro* e diferentes gonadotrofinas exógenas *in vivo* visando o melhor desenvolvimento folicular;
- Desenvolver uma técnica de xenotransplante e verificar a viabilidade do tecido ovariano transplantado a partir de fetos bovinos para região subcapsular do rim de camundongas imunodeficientes como um método de cultivo folicular *in vivo*;
- Desenvolver uma técnica de biopsia tecidual sob a cápsula renal de camundongas que permita a sobrevivência destas para posteriores avaliações e reduza o número de animais experimentais.
- Avaliar dentre os protocolos de superovulação baseados na fisiologia murina e bovina aquele que fornecerá a melhor resposta superovulatória dos tecidos ovarianos xenotransplantados;
- Verificar a percentagem, morfometria e qualidade dos folículos pré-antrais após os cultivos *in vitro* e *in vivo* propostos.

V. MATERIAL E MÉTODOS.

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), com aprovação pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal – SP, sob parecer de número 024674-06.

V.I. Fêmeas receptoras e manejo:

Todos os animais da colônia foram mantidos em estantes (Figura 2a) com mini-isoladores de pressão positiva a 22° C com fotoperíodo de 14:10 (luz:escuridão), alimentados *ad libitum* com ração autoclavável¹, água filtrada e sementes de girassol, sendo todos esses itens autoclavados 24 horas antes da oferta aos mesmos. Também foram autoclavados semanal e individualmente, os mini-isoladores, contendo a maravalha e os bebedouros. Os procedimentos de manutenção (troca do mini-isolador, alimento, girassol e água) e manejo geral dos animais foram realizados semanalmente em fluxo laminar. Além disso, os animais foram inspecionados diariamente quanto a possíveis alterações de comportamento ou saúde.

Foram utilizadas camundongas imunodeficientes das linhagens C57Bl/SCID (n=57), CB-17/SCID (n=8) e BALB/c NUDE (n=05) (Figuras 2b, 2c e 2d, respectivamente), todas de primeira geração obtida após cruzamentos realizados no biotério do Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP, *Campus* de Jaboticabal-SP. A linhagem C57Bl/SCID foi obtida a partir de matrizes provenientes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo enquanto que as fêmeas BALB/c NUDE e CB-17 SCID foram provenientes do Biotério da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Salvador-Bahia).

¹ Nuvilab CR-1 Autoclavável, Nuvital, Colombo-PR.



Figura 2. Sistema de criação e linhagens de camundongas imunodeficientes utilizadas para xenotransplantes de ovários de fetos bovinos: a) Estante com mini-isoladores de pressão positiva; Exemplos de camundongas imunodeficientes das linhagens b) C57Bl/SCID; c) CB-17/SCID e d) BALB/c NUDE.

V.II. Doadoras dos ovários:

Utilizaram-se 41 ovários de fetos bovinos com idade gestacional estimada entre 119 e 249 dias baseando-se no comprimento do animal (cm) desde a nuca até a base da cauda. No momento da colheita, os ovários foram lavados com solução fisiológica 0,9%, inseridos em tubos cônicos estéreis (50 mL), identificados de acordo com o tamanho da doadora, e em seguida, transportados em Meio Essencial Mínimo (MEM) com antibióticos (100µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Assim, os

ovários foram mantidos resfriados a 4° C até o Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP, *Campus* de Jaboticabal-SP.

V.III. Processamento do tecido ovariano doador destinado ao transplante:

Ao chegarem resfriados do matadouro, os ovários foram processados para obtenção dos fragmentos a serem posteriormente transplantados. Para tanto, o tecido cortical ovariano foi delicadamente manipulado com auxílio de pinças e lâminas de bisturi tamanho n° 11, obtendo-se de 10 a 15 fragmentos de aproximadamente 1 mm³ selecionados sob lupa estereoscópica. Em seguida, foram acondicionados em PBS enriquecido com 2 % de soro fetal bovino (SFB) e resfriados a 4°C até o momento do transplante, não se excedendo o limite de 8 horas desde a colheita até o transplante.

V.IV. Protocolo anestésico:

Primeiramente, todas as camundongas que seriam submetidas aos procedimentos cirúrgicos foram individualmente pesadas para o cálculo da dose anestésica. O protocolo anestésico utilizou o 2,2,2-tribromoetanol² a 1,25%, na dose de 0,1 ml de solução/5g de peso, administrados intraperitonealmente (Figura 3a). A dose anestésica foi ajustada individualmente durante o procedimento cirúrgico para manutenção do plano anestésico desejado (parâmetros fisiológicos estáveis e imobilidade, permitindo a realização da técnica cirúrgica). Em roedores não são necessários jejum hídrico ou alimentar prévios ao procedimento cirúrgico.

V.V. Ovariectomia das receptoras e xenotransplante:

Todos os procedimentos cirúrgicos realizados durante este experimento obedeceram às técnicas básicas de incisão e excisão de tecidos, a saber: manutenção da hemostasia, manipulação e cuidados com os tecidos expostos, uso de suturas e outros materiais para a restauração da estrutura anatômica e sustentação dos tecidos durante a cicatrização (HOLMBERG, 1998).

²2,2,2-Tribromoethanol 97%, Sigma-Aldrich, São Paulo-SP.

Com o intuito de prevenir possíveis interferências da atividade gonadal das receptoras sobre o tecido ovariano a ser transplantado, todas as fêmeas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Para realização deste procedimento, promoveu-se anestesia dos modelos experimentais conforme descrito no item anterior. Após a tricotomia, realizou-se antissepsia dos campos cirúrgicos com solução alcoólica de iodo a 2%, seguida pela colocação de panos de campo estéreis.

A intervenção cirúrgica foi executada através de incisões sublobares bilaterais de aproximadamente 1 cm (Figura 3b), sempre caudal à última costela, com lâmina de bisturi nº11 apoiada em cabo nº3. Uma vez identificadas, as bolsas ovarianas (*bursa ovarica*) foram dissecadas e o ovário correspondente a cada um dos antímeros removido com o auxílio de tesoura e pinça de dissecação. As estruturas remanescentes foram cuidadosamente inspecionadas quanto a possíveis hemorragias, e ao observar-se normalidade, essas eram devolvidas à posição anatômica de origem.

Em seguida, foi localizado e exteriorizado o rim esquerdo. Sua cápsula renal foi delicadamente aberta com auxílio de uma pinça de íris denteada 10 cm e os fragmentos previamente selecionados (n= 3-5) do tecido ovariano da fêmea doadora foram inseridos individualmente na região subcapsular utilizando-se a pinça de íris serrilhada (Figura 3c). Realizada a inserção dos fragmentos (Figura 3d), foi verificada a ocorrência de quaisquer anormalidades tanto no tecido renal quanto no ovariano recém-implantado, e na ausência dessas, os tecidos foram devolvidos à posição anatômica de origem dando sequência aos demais procedimentos.

Por fim, os tecidos muscular (Figura 3e), subcutâneo e dérmico (Figura 3f) foram suturados com fio cirúrgico inabsorvível (monofilamento nylon 6-0 agulhado³). Ao final do procedimento descrito, os animais foram acondicionados em mini-isoladores aquecidos a 37° C até a completa recuperação do plano anestésico.

³ Nylon, Brasuture - São Sebastião de Grama – SP.



Figura 3. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos para os xenotransplantes ovarianos em camundongas imunodeficientes: a) Anestesia sendo administrada por via intraperitoneal; b) Incisão sublombar para exteriorização dos órgãos abdominais; c) Inserção dos fragmentos no rim esquerdo após sua exteriorização e capsulotomia; d) Fragmentos (cinco), de córtex ovariano fetal bovino, inseridos na região subcapsular do rim das receptoras imunodeficientes; e) Sutura da camada muscular com fio inabsorvível; f) Finalização do procedimento com sutura de pele.

V.VI. Processamento do tecido ovariano destinado ao cultivo *in vitro*:

A colheita dos ovários que foram utilizados nesta etapa do experimento seguiu os mesmos procedimentos descritos no item V.II. Posteriormente, foram realizados os processamentos para obtenção dos fragmentos de tecido ovariano que seriam destinados ao cultivo tecidual *in vitro*.

Num pré-experimento com seis fetos definiu-se que o tamanho do tecido ovariano ideal para a visibilização ao cultivo dos FOPA inseridos no estroma seria de 0,5 a 1 mm³. Neste sentido, num dos experimentos de cultivo *in vitro* utilizou-se o equipamento “Tissue Chopper”, e no outro, adotou-se o processamento manual com bisturi n°11 para o corte do tecido e obtenção dos fragmentos no tamanho ideal predeterminado.

V.VII. Meios para o cultivo *in vitro* de tecido ovariano:

O meio base utilizado neste experimento foi composto por DMEM, com 300 mOsm/L, pH 7,2, suplementado com antibióticos (100µg/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina), ITS (insulina, transferrina e selênio, 50 ng/dL), 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, dAMPc (0,2mmol/L), 2 mM de hipoxantina, bFSH (100 ng/mL) e IGF-I (50 ng/mL). Os meios foram substituídos em dias alternados até o fim do experimento.

Todos os reagentes utilizados foram obtidos do laboratório SIGMA-ALDRICH⁴. Os tecidos foram cultivados em placas de quatro poços contendo 1 mL de meio de cultivo adicionado de soro fetal bovino (SFB) a 10%, albumina sérica bovina (BSA) a 0,1% ou álcool polivinil (PVA) a 1%, cobertas com óleo mineral e mantidas em estufa a 38,5°C com 5% de CO₂ em presença de ar.

⁴ Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA.

V.VIII. Processamento histológico:

Os tecidos colhidos durante os experimentos foram fixados em solução de Bouin durante 24 horas, lavados em álcool 70% para remoção do excesso de fixador e posteriormente incluídos individualmente em ágar de eletroforese a 2,5%, já que estes possuíam tamanho muito reduzido e poderiam ser perdidos durante o processamento histológico de rotina. No sentido de facilitar a localização do tecido nas etapas seguintes deste processamento histológico, as combinações ágar-tecido foram pré-coradas com hematoxilina. Os blocos ágar-tecido foram então desidratados, diafanizados, incluídos em histosec[®], e seccionados de forma seriada à espessura de 5 µm para posterior coloração com hematoxilina–eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM).

V.IX. Classificação dos folículos e avaliação do tecido ovariano:

Para análise dos folículos, estes foram classificados de acordo com o tipo e o número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito. Sendo os primordiais os que continham um oócito circundado por uma camada parcial ou completa de células pavimentosas da pré-granulosa. Folículos intermediários ou de transição, contendo uma camada de células da granulosa, tanto pavimentosas quanto cúbicas. Os primários com uma camada simples de células da granulosa cúbicas. Folículos secundários, sendo assim classificados, quando possuíam duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas sem antro visível e, por fim, folículos antrais aqueles com uma, ou mais, pequenas áreas de fluido folicular (antro).

Para evitar duplicidade na contagem das distintas categorias de folículos observados, a avaliação das lâminas foi realizada num intervalo mínimo de 50 µm. O tecido ovariano foi avaliado quanto à integridade do seu parênquima, qualidade e classificação dos folículos ovarianos em pré-antrais (categorias) e antrais, bem como vascularização e agregação das células do mesênquima.

V.X. Produção *in vitro* de embriões (PIV):

Os procedimentos de PIV foram baseados nos protocolos de rotina do Laboratório de Reprodução Animal da FCAV/UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

Para maturação *in vitro*, os complexos *cumulus oophorus* (COCs) selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 constituído por meio TCM-199⁵, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio, 16,67µg/µL de sulfato de amicacina⁶ e outra, em meio de maturação B-199 constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 83,4µg/µL de sulfato de amicacina, 1 µg/mL de estradiol, 1,0 µg/mL de FSH⁷, 50µg/mL de hCG⁸ acrescido de 10% de SFB⁹. As estruturas obtidas de cada receptora foram transferidas para microgotas de 100 µL. Os COCs foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

A fertilização foi realizada 24h após o início do cultivo de maturação. Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 35°C por 30 segundos. A concentração e motilidade espermática foram avaliadas com ajuste final da concentração para 25x10⁶ espermatozóides vivos por mililitro de meio de fertilização TALP-FIV suplementado com 6mg/mL de BSA, 30µg/mL heparina, 18µM penicilamina, 10µM hipotaurina, 1,8µM epinefrina, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. Aproximadamente 100x10³ espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100µL de meio TALP-FIV designado aos COCs. Os oócitos foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos e, uma vez em meio TALP-FIV, seguindo-se com o acondicionamento individual por receptora para a gota de FIV, incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

⁵Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA.

⁶ Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

⁷Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, EUA.

⁸Profasi™, Serono, São Paulo, SP, Brasil.

⁹Cripion, Andradina, SP, Brasil.

Para o desenvolvimento dos embriões, os prováveis zigotos foram lavados por três vezes em meio SOF (meio sintético de fluido de oviduto) sem SFB ou glicose, transferidos para microgotas contendo 200 μ L do mesmo meio utilizado para lavagem dos zigotos após a fertilização. Os oócitos colhidos foram cultivados em 1 poço por animal, mantidos em estufa a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, com umidade saturada. A clivagem foi avaliada 33 horas após a fertilização.

V.XI. Análise dos resultados:

Para comparação entre as médias de diâmetro ao longo dos dias de cultivo e para comparação entre o dia inicial e final dentro e entre tratamentos dos folículos foi feita a Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As percentagens entre as categorias de folículos ovarianos em função dos dias de avaliação ou tratamento proposto foram avaliadas por qui-quadrado ($p < 0,05$). A correlação entre o tempo necessário para o transplante e o seu efeito sobre a percentagem de FOPA saudáveis, assim como, a resposta à superovulação em função do tempo de transplante (dias) foram avaliadas pela correlação linear de Pearson ($p < 0,05$).

Nota de esclarecimento:

Os materiais utilizados e a metodologia descrita até este momento serviram de base para idealização das quatro investigações descritas pelo desenho experimental a seguir.

V.XII. Desenho experimental:

Experimento 1 - Efeito da suplementação dos meios de cultivo *in vitro* com macromoléculas sobre fragmentos de tecido ovariano contendo FOPA.

Objetivou-se estudar neste experimento o efeito da suplementação dos meios de cultivos com macromoléculas sobre tecido ovariano contendo FOPA. Para tanto, 12 fragmentos ovarianos, por ovário colhido, medindo aproximadamente 0,5 mm³, obtidos após utilização do equipamento “Tissue Chopper”, foram previamente analisados em microscópio invertido (100x) para a constatação da presença de FOPA e fotografados pelo software AxioVision 4.7.1 (Zeiss). Aleatoriamente selecionou-se um dos fragmentos para fixação e posterior análise histológica, constituindo assim a amostra controle; os outros doze foram subdivididos em três tratamentos com quatro momentos de observação cada e conduzidos ao cultivo individual em placas de quatro poços contendo 1 mL de meio de cultivo adicionado de soro fetal bovino (SFB) a 10%, albumina sérica bovina (BSA) a 1% ou álcool polivinil (PVA) a 0,1%; sendo esses cobertos com óleo mineral e mantidos em estufa a 38,5°C com 5% de CO₂ em presença de ar. Os meios foram substituídos em dias alternados até o 8° dia de cultivo, ocasião em que os fragmentos foram analisados após a remoção de um fragmento por tratamento.

Após a classificação qualitativa dos folículos em morfologicamente normais ou degenerados tipos I ou II, sob microscopia de inversão (FIGUEIREDO *et al.*, 1994), procedeu-se o registro fotográfico no dia inicial de cultivo (dia zero) utilizando-se para isto os tecidos que seriam cultivados até o último dia (dia 8), e das amostras de tecidos no momento de suas retiradas aos dois, quatro, seis e oito dias de cultivo (Figura 4). Seguindo-se este delineamento os tecidos contendo folículos foram retirados dos cultivos, fotografados e encaminhados para processamento histológico. A posterior morfometria dos folículos visibilizados e classificados como morfologicamente normais foi realizada por amostragem com o software AxioVision 4.7.1.

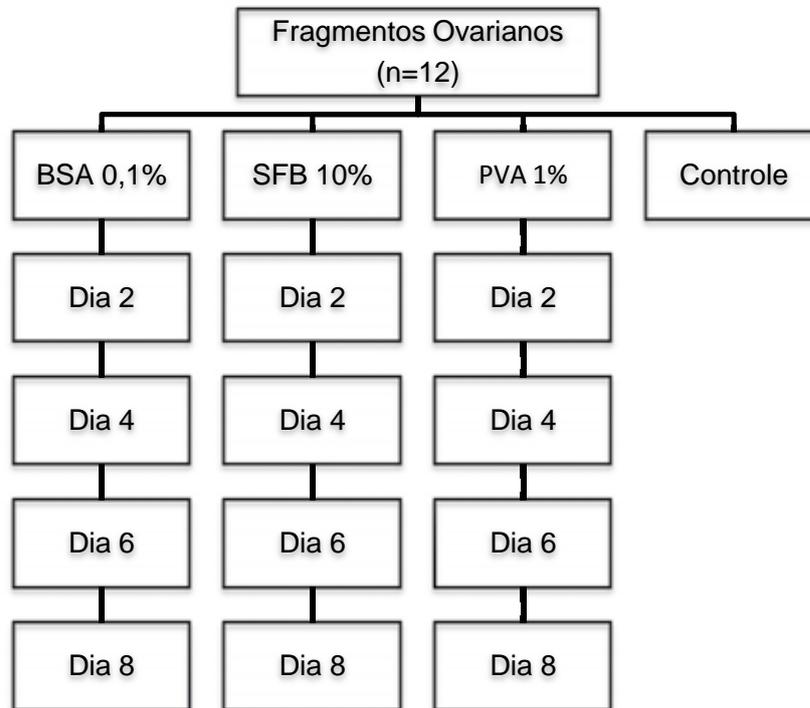


Figura 4. Representação esquemática do experimento 1.

Experimento 2 – Viabilidade de FOPA inseridos em tecidos ovarianos cultivados *in vitro* com diferentes fontes de macromoléculas: coloração pelo azul de tripan.

Objetivou-se estudar a coloração pelo azul de tripan como método auxiliar na classificação morfológica dos FOPA, mesmo quando inseridos no tecido ovariano, em normais ou degenerados após cultivo *in vitro* com diferentes fontes de macromoléculas. Foram obtidos nove fragmentos ovarianos a partir de cada ovário (total de oito ovários colhidos) medindo aproximadamente $0,5 \text{ mm}^3$, após processamento manual e utilização de lâmina de bisturi n°11. Posteriormente, estes fragmentos foram subdivididos aleatoriamente em três grupos de tratamentos em função da macromolécula inserida no

cultivo (BSA 0,1%, SFB 10% ou PVA 1%), distinguindo-se assim, do experimento anterior por serem avaliados após 1, 4 e 8 dias de cultivo (Figura 5) com o corante vital azul de tripan a 0,5% por 20 minutos. A viabilidade dos folículos foi comparada em função dos tratamentos com BSA, SFB e PVA dentro dos seus dias de cultivo. A posterior morfometria dos folículos visibilizados e classificados como morfologicamente normais foi realizada por amostragem com o software AxioVision 4.7.1.

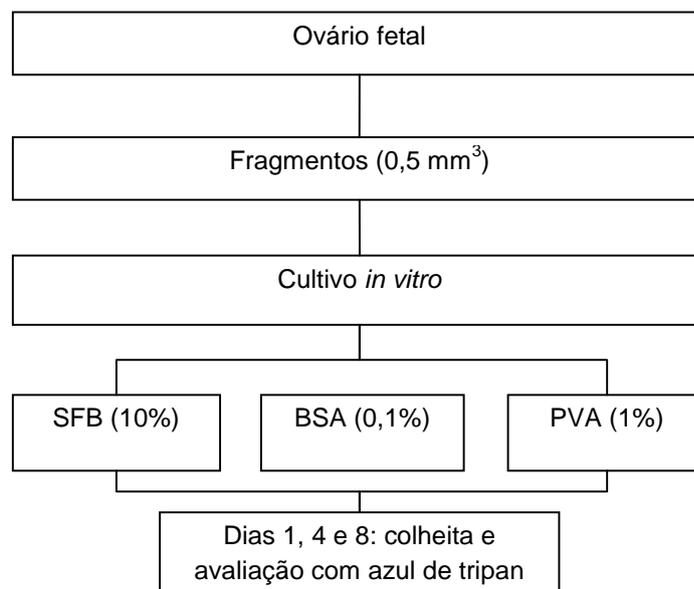


Figura 5. Representação esquemática do experimento 2.

Experimento 3 - Efeito do tempo de transplante sobre a percentagem e qualidade de FOPA inseridos em fragmentos de tecido ovariano e xenotransplantados para a região subcapsular do rim em camundongas com imunodeficiência severamente combinada (SCID).

Objetivou-se avaliar como o fator tempo pode influenciar a categoria e a qualidade dos folículos ovarianos contidos no tecido ovariano xenotransplantado para a região subcapsular do rim de camundongas severamente imunodeficientes. Após determinar este objetivo, subdividiram-se em três grupos, os animais que foram transplantados conforme metodologia descrita neste material e métodos (subitens V.II, V.III, V.IV e V.V). No grupo A (n=11) os animais foram submetidos a 1 (um) procedimento de biopsia 30 dias após o transplante; no grupo B (n=07) os animais foram submetidos ao mesmo procedimento 60 dias após o transplante; e por fim, o grupo C (n=05) que foi composto por animais submetidos a 2 (dois) procedimentos de biopsia, um realizado aos 30, e outro aos 60 dias pós-transplante.

A biopsia foi iniciada pela anestesia dos animais (conforme descrito no subitem V.IV.), seguida pelos procedimentos de tricotomia e antissepsia idênticos àqueles realizados durante as cirurgias (subitem V.V.). Procedeu-se uma incisão na região sublombar esquerda, numa extensão tal, que permitisse a exteriorização segura do rim esquerdo. Em seguida, os tecidos ovarianos transplantados foram identificados e aleatoriamente, selecionou-se um para colheita pela técnica de biopsia que preconizava, quando necessário, o uso de um “punch” dermatológico (2 mm diâmetro) para delimitação do tecido a ser colhido. A remoção deste foi realizada após incisão da cápsula renal e destacamento entre o tecido ovariano pré-selecionado e o renal com auxílio de lâmina de bisturi nº11. O referido fragmento foi então apreendido cuidadosamente por uma pinça de relojoeiro 10 cm, a fim de evitar danos estruturais. O fragmento foi então dividido e acondicionado em frascos identificados para processamento histológico de rotina e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Após a colheita do fragmento, o tecido renal foi irrigado com solução fisiológica 0,9% estéril para remoção de restos teciduais indesejáveis e eventuais microcoágulos

de sangue que pudessem induzir a formação de aderências entre os tecidos manipulados e aqueles circunjacentes, dificultando assim, a execução de procedimentos cirúrgicos posteriores no grupo em que estes fossem necessários, ou ainda causando qualquer sensação de desconforto ou dor aos animais. Realizados estes procedimentos, procederam-se as suturas dos planos cirúrgicos incididos.

Experimento 4 – Efeito da estimulação hormonal do tecido ovariano fetal bovino xenotransplantado para a região subcapsular do rim de camundongas imunodeficientes (SCID e NUDE).

Objetivou-se com este experimento avaliar após estímulo hormonal a resposta do tecido ovariano fetal bovino xenotransplantado para a região subcapsular do rim de animais imunodeficientes das linhagens SCID e NUDE. Foram utilizados fragmentos de tecidos ovarianos obtidos conforme descrição dos subitens V.II., V.III., V.IV e V.V. deste material e métodos. Os fragmentos mediam aproximadamente 1 mm³ e foram inseridos individualmente em número de 3 a 5, sob a cápsula renal das camundongas das linhagens C57Bl/SCID (n=23) , CB17/SCID (n=08) e BALB/c NUDE (n=05). Um dos fragmentos foi selecionado aleatoriamente e encaminhado para processamento histológico, constituindo a amostra controle. Decorrido um tempo mínimo de 32 dias de transplante, as receptoras foram submetidas à avaliação indireta da atividade hormonal por meio de lavado da cavidade vaginal e posteriormente dividida em dois grupos que receberam um tratamento à base de r-hFSH¹⁰ (10 UI; n=14) e o outro com dose única de 10UI de eCG¹¹ (n=22). A distribuição das camundongas nestes grupos (Figura 6) obedeceu principalmente ao critério da doadora do ovário e aquelas que não possuíam outra doadora em comum foram distribuídas de acordo com o tempo de transplante e linhagem. Após os tratamentos propostos, as receptoras foram eutanasiadas por deslocamento cervical e os tecidos ovarianos que continham folículos antrais foram dissecados e rompidos para a colheita e avaliação dos oócitos destinados à produção

¹⁰ Gonal-F, Merck Serono SA, USA.

¹¹ Novormon 5.000UI, Intervet Schering-Plough Animal Health, Cruzeiro-SP.

in vitro (PIV) de embriões (subitem V.X.). Os tecidos que não possuíam folículos antrais visíveis foram colhidos e encaminhados para processamento histológico.

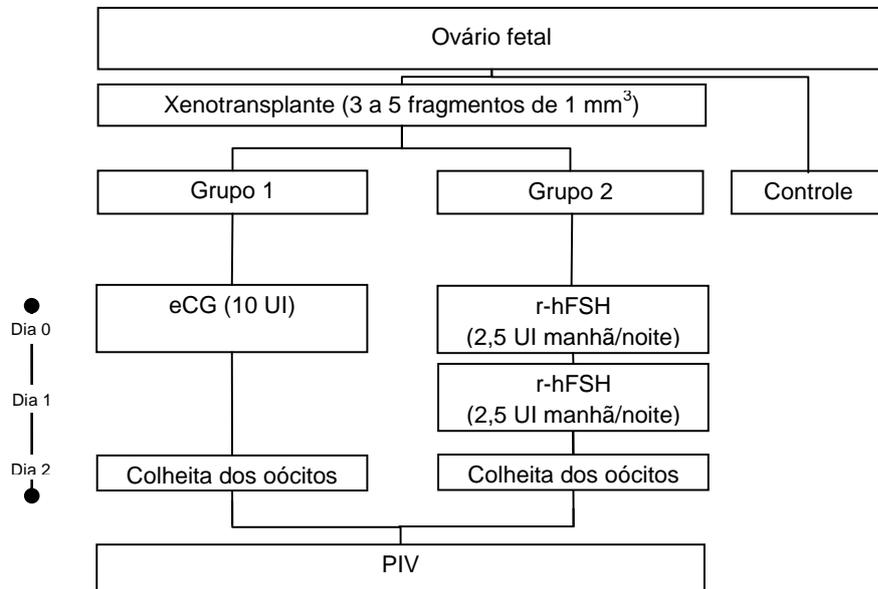


Figura 6. Representação esquemática do experimento 4.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O presente trabalho envolveu estudos sobre duas técnicas consideradas promissoras para o aproveitamento do tecido ovariano, técnicas essas cujas aplicações normalmente estão restritas às etapas tradicionais de produção *in vitro* de embriões. Nos primeiros experimentos de cultivo *in vitro*, abordou-se o uso de macromoléculas e a opção por meios quimicamente definidos com o intuito de melhor definir as necessidades foliculares e verificar a real necessidade do uso de meios à base de proteína animal, num segundo momento, buscou-se com o cultivo *in vivo* por xenotransplante estabelecer o quanto a comunicação entre duas espécies filogeneticamente distintas e com diferenças na maturidade sexual podem ser eficazes no desenvolvimento de FOPA oriundos de ovários fetais.

Os experimentos de cultivo *in vitro* propostos foram divididos em dois momentos. No primeiro experimento, um total de 1291 mensurações de FOPA foram realizadas ao longo do experimento 1. Essas mensurações ocorreram a partir de 12 ovários fetais, cujos resultados estão apresentados na Figura 7.

À exceção do menor diâmetro dos FOPA cultivados em PVA no segundo dia de cultivo e do maior diâmetro dos FOPA cultivados com SFB no dia 6, os demais dias não apresentaram diferença estatística quanto a este parâmetro entre os tratamentos propostos. Não foi verificado crescimento folicular e estes resultados podem ser atribuídos ao fato de os fragmentos de tecido ovariano utilizados estarem mais próximos ao córtex contendo com isso um maior número de folículos primordiais (BEZERRA *et al.*, 1998) que foi posteriormente confirmada pela avaliação histológica realizada durante esse experimento.

Foi realizado ainda um acompanhamento dos mesmos FOPA a partir do mesmo tecido no dia zero e oito de cultivo, os resultados dos diâmetros médios foram de $47,6\mu\text{m} \pm 12,1 \mu\text{m}$ (n=110) contra $47,7\mu\text{m} \pm 11,5\mu\text{m}$ (n=94) no cultivo com BSA, de $44,6 \pm 11,6$ (n=114) para $43,5 \pm 14,6$ (n=86) no cultivo com SFB e de $44,6 \pm 11,0$ (n=124)

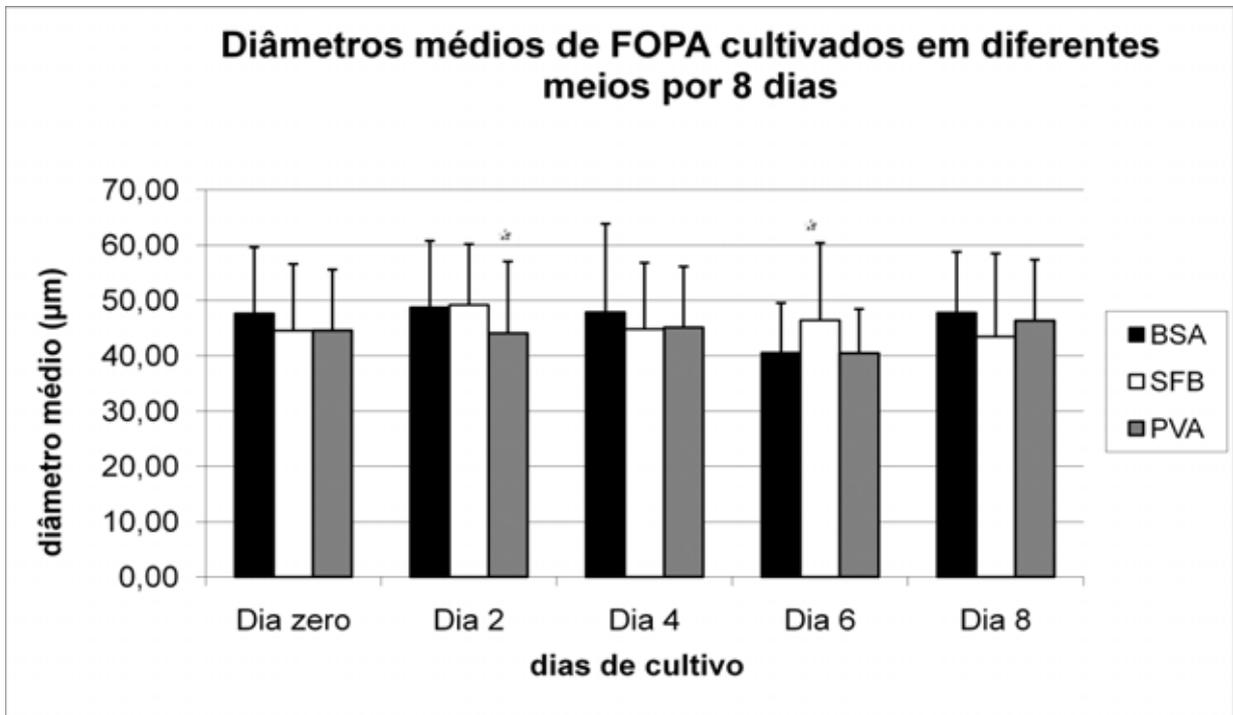


Figura 7. Diâmetros médios de FOPA cultivados em diferentes meios durante oito dias. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$), teste de Tukey.

para $46,4 + 11,3$ ($n=106$) no cultivo com PVA. Tais achados demonstraram não haver distinção entre os diâmetros médios dos FOPA saudáveis observados à microscopia de inversão nos cultivos com BSA, SFB e PVA (Figuras 7 e 8). Dessa forma, fica constatado que o tipo de macromolécula utilizada durante os tratamentos não influenciou sobre o diâmetro médio dos FOPA ao longo de oito dias de cultivo. Embora a degeneração de folículos morfológicamente normais já tenha sido relatada em cultivos foliculares (HULSHOF *et al.*, 1995) e também seja observada no presente experimento, nestes mesmos tecidos avaliados antes e após o cultivo para controle, observou-se uma variação na viabilidade de 75,4% (SFB) a 85,5% e 85,4% para os FOPA avaliados após cultivo em BSA e PVA, respectivamente.

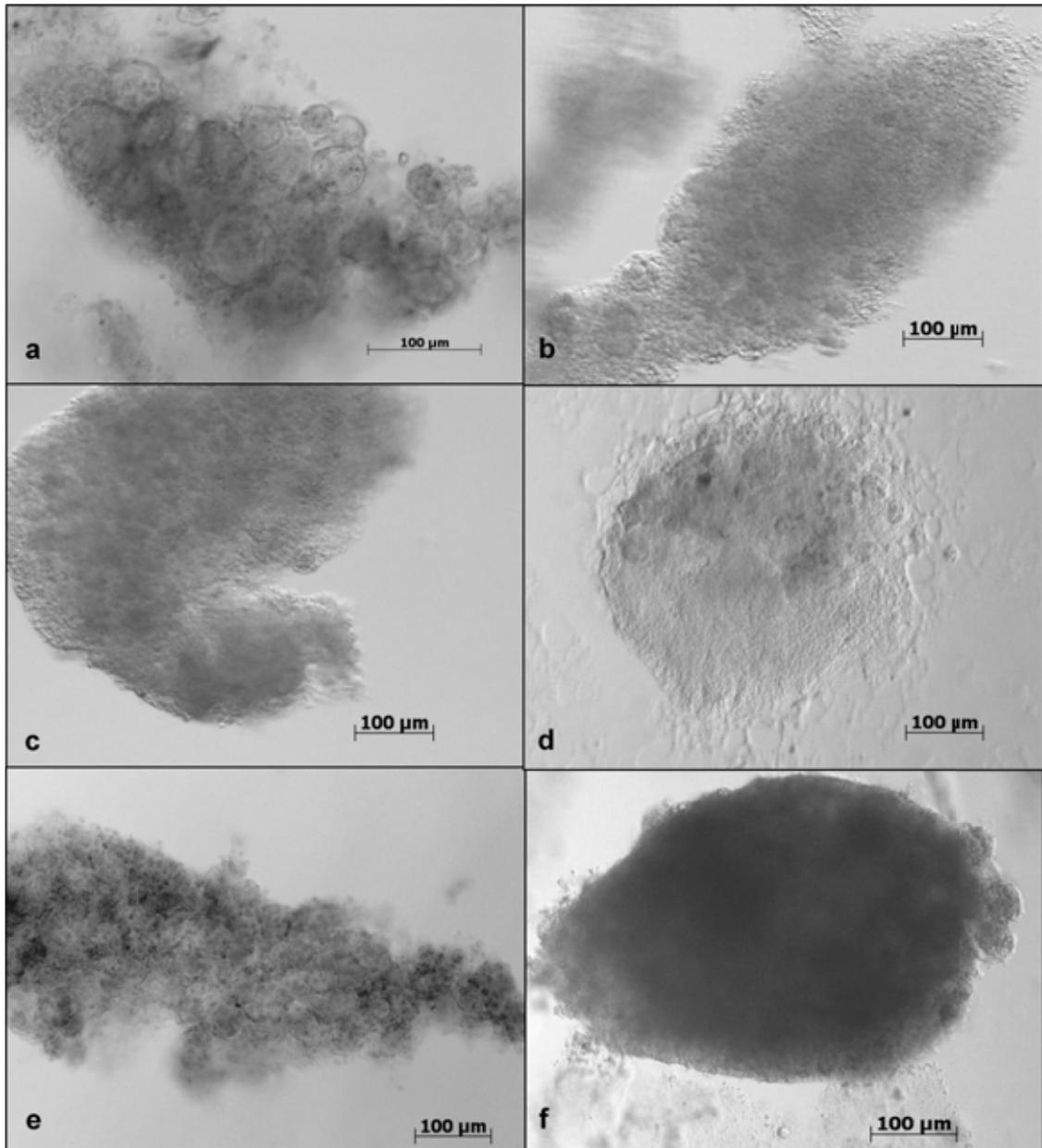


Figura 8: Tecidos ovarianos cultivados em diferentes fontes de macromoléculas. a) Cultivo em BSA 0,1% e observado aos 2 dias; b) Cultivo em BSA 0,1% e observado aos 8 dias; c) Cultivo em SFB 10% e observado aos 2 dias; d) Cultivo em SFB 10% e observado aos 8 dias; e) Cultivo em PVA 1% e observado aos 2 dias; f) Cultivo em PVA 1% e observado aos 8 dias.

O uso do soro fetal bovino é importante por fornecer fatores hormonais para o crescimento celular e suas funções. Em 3/12 (25%) dos tecidos cultivados com soro fetal bovino foram observadas adesão à placa de cultivo a partir do sexto dia. Sabe-se que o papel mais importante do soro está na promoção de adesão e expansão de uma linhagem através de fatores como o colágeno, fibronectina, dentre outros (BASTOS *et al.*, 2007).

Em todos os tratamentos, foram observados FOPA totalmente inclusos no estroma ovariano e projetando-se deste mesênquima, isso ocorre devido ao fato do corte ao “Tissue Chopper” agir inespecificamente em regiões do córtex em que podem ou não haver FOPA, provocando inclusive o isolamento de alguns destes. Os FOPA assim projetados mantiveram-se com estrutura arredondada à microscopia de inversão com graus variáveis de degeneração.

Assim como no experimento 1, no experimento 2, o meio de base utilizado no cultivo foi proposto por HUANMIN & YONG (2000) que obtiveram crescimento folicular a partir de FOPA iniciais e folículos antrais a partir de experimentos com soro fetal bovino. Podem ser observados o efeito dos meios BSA, SFB e PVA sobre o diâmetro (Figura 9) e a percentagem (1) dos FOPA após 1, 4 e 8 dias de cultivo.

O BSA é uma molécula de pequeno tamanho, amplamente observada no soro de diversos animais que, quando purificada deste, apresenta baixa ação antigênica ao ser aplicada a outras espécies (TRIGATTI & GERBER, 1995). Em cultivos de FOPA, o BSA foi inicialmente utilizado por HULSHOF *et al.*, (1995) em substituição ao SFB e com isso foi verificado que tal macromolécula poderia ser adotada com sucesso no cultivo folicular. Assim como nos resultados obtidos nos cultivos de FOPA com BSA *in situ*, neste experimento observou-se que os FOPA cultivados com BSA não tiveram alteração nos seus diâmetros médios.

A utilização de FSH em meios de cultivo também tem sido responsabilizada pelo crescimento de FOPA de pequenos diâmetros quando isolados (SAHA *et al.*, 2000) e quando em combinação com o EGF em tecidos cultivados tendo o BSA como fonte de macromolécula (ANDRADE *et al.*, 2005), entretanto, o uso de FSH pode tornar-se restrito ao tamanho e sensibilização dos receptores para estes hormônios,

principalmente em folículos pré-antrais, pois o crescimento folicular inicial é multifásico (FORTUNE, 2003)

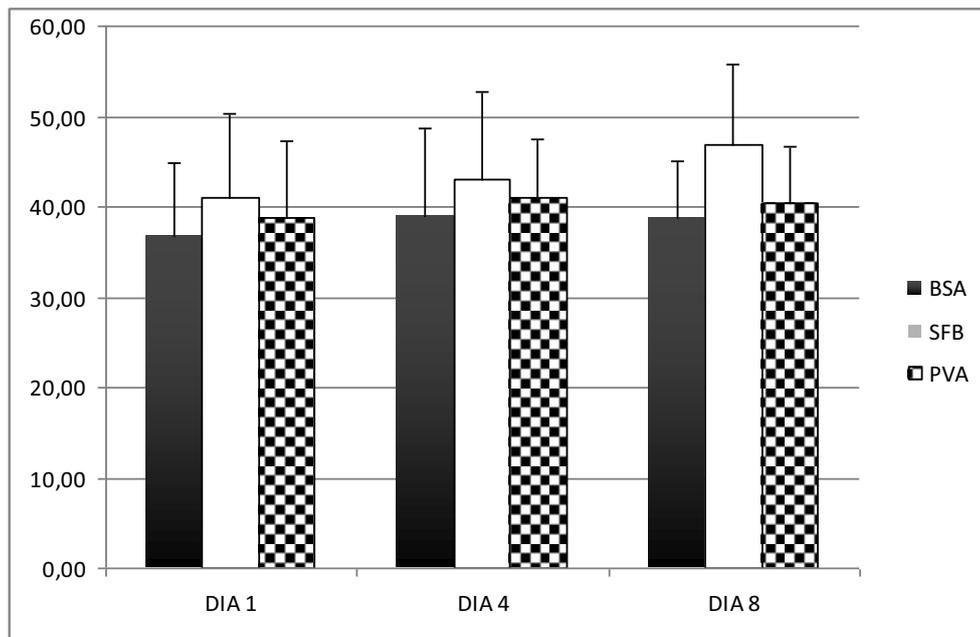


Figura 9: Diâmetros médios (μm) dos folículos ovarianos normais observados ao cultivo *in vitro* por 1, 4 e 8 dias.

Ainda neste experimento, foi utilizado o azul de tripan (0,5%) para avaliar os FOPA inclusos em tecido ovariano. Este corante foi utilizado anteriormente para demonstrar a viabilidade oocitária (ABD-ALLAH, 2009) e de FOPA isolados (SCHOTANUS *et al.*, 1997, TAMILMANI *et al.*, 2005, CELESTINO *et al.*, 2008). O teste de exclusão pelo azul de tripan é baseado na integridade da membrana plasmática, sendo um método rápido para avaliação de qualidade e viabilidade de folículos. Optou-se pelo seu uso também pelo seu baixo custo e rapidez de execução dos procedimentos inerentes à técnica, associados ainda à confiabilidade dos seus resultados.

Nossos achados demonstraram que folículos pré-antrais normais e degenerados *in situ* podem ser observados e avaliados pela coloração do azul de tripan, contudo este corante foi considerado mais efetivo quando os FOPA projetavam-se do estroma ou estavam mais periféricos (Figura 10).

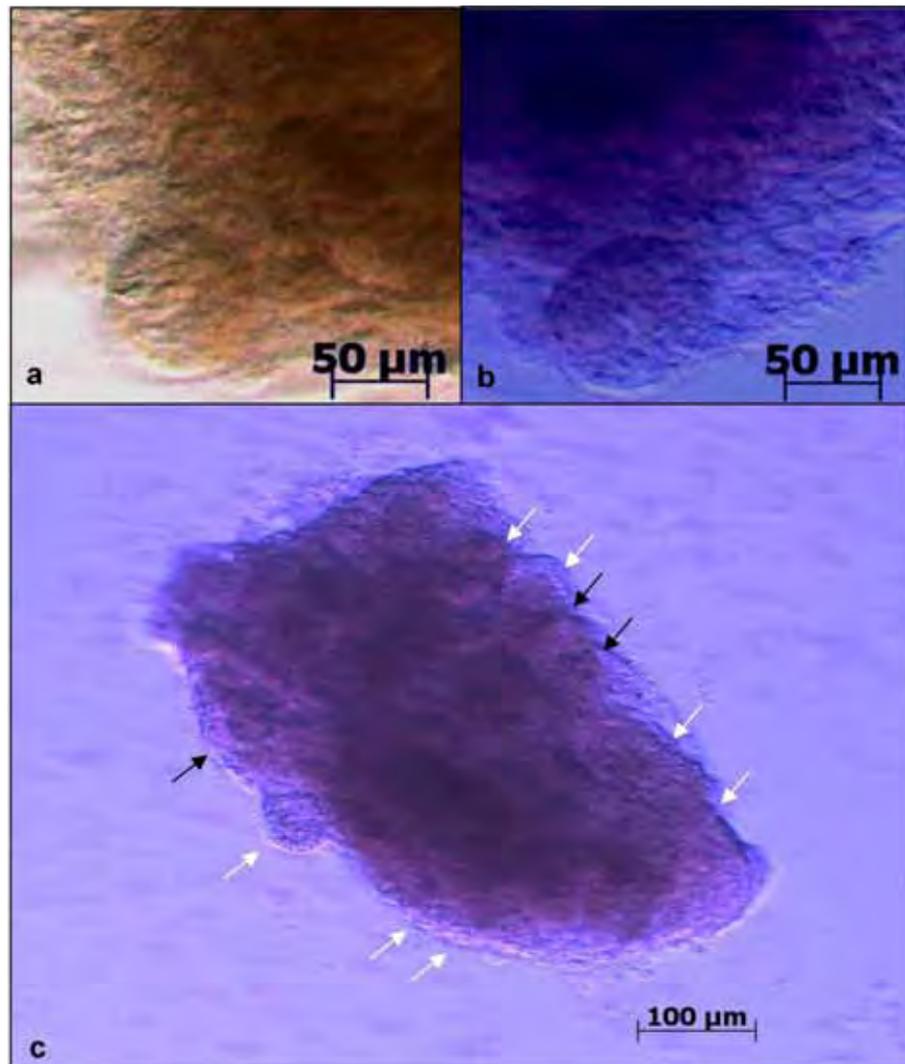


Figura 10: Folículos pré-antrais *in situ* antes e após a coloração pelo azul de tripan (0,5%) (a,b); Folículos pré-antrais normais (seta branca) e degenerados (seta preta) após 4 dias de cultivo em BSA 0,1%.

Tabela 1: *Percentagem* e número (entre parênteses) de folículos viáveis avaliados pelo azul de tripan e observados ao cultivo *in vitro* com diferentes macromoléculas e dias de cultivo.

Período	Tratamento		
	BSA	SFB	PVA
Dia 1	80,3 ^a	73,5 ^{a,b}	67,1 ^b
	(57)	(61)	(49)
Dia 4	70,7 ^{a,b}	72,4 ^a	57,8 ^b
	(53)	(63)	(37)
Dia 8	75,3 ^a	65,0 ^a	70,8 ^a
	(58)	(39)	(63)

Letras diferentes na mesma linha ($p < 0,05$), não houve diferença entre colunas.

No caso específico do cultivo de FOPA com PVA no presente estudo, a viabilidade dos folículos cultivados na presença dessa macromolécula foi semelhante a dos folículos cultivados em BSA no oitavo dia de cultivo. Em outro estudo com folículos isolados, o PVA foi utilizado em substituição à albumina sérica bovina (BSA) e ao soro fetal bovino (SFB) em FOPA isolados de fetos bovinos (COSTA *et al.*, 2001). Uma das moléculas presentes no meio que podem contribuir com a manutenção da viabilidade dos FOPA foi o selenito de sódio. Estudo recente demonstrou que a utilização de selenito de sódio aumenta a capacidade antioxidante no cultivo *in vitro* de FOPA recém coletados ou após a criopreservação aumentando a taxa de sobrevivência folicular *in vitro* (ABEDELAKHI *et al.*, 2010)

No tocante à avaliação histológica os primeiros resultados mostraram uma resposta tecidual variável em função do indivíduo doador do ovário, com a maioria dos folículos com células cúbicas e tamanho compatível com folículos primordiais. Este resultado é corroborado com achados da literatura que relatam uma massiva ativação de folículos primordiais quando isolados do tecido ovariano (AERTS *et al.*, 2009). Foi relatado que FOPA de origem fetal cultivados em laboratório, não apenas mantêm a integridade morfológica como também se desenvolvem para estádios subsequentes de crescimento dentro de um curto período de cultivo tecidual (TAN & ZHENG, 2000).

Essas observações são resultados da presença de fatores inibidores no feto ou no tecido ovariano fetal, que podem ter sido removidas quando os folículos foram cultivados *in vitro* (LAN *et al.*, 2008). Além disso, observações demonstradas adiante durante o trabalho com folículos primordiais xenotransplantados corroboraram essa hipótese. Foram observados ainda desagregação das células da granulosa e sinais de degeneração oocitária em FOPA, independente do dia de cultivo e tratamento proposto.

Os resultados obtidos pelos procedimentos da técnica de xenotransplante mostraram que apenas oito receptoras de um total de 65 transplantados vieram a óbito por decorrência da técnica. As causas observadas dos óbitos foram reação à anestesia (05 animais) e hipotermia (03 animais), isto, considerando-se que dois animais foram remanejados para outros procedimentos e outros cinco foram aproveitados em dois dos experimentos relatados (biopsia com 30 e 60 dias e estimulação hormonal) sem prejuízos.

Em anexo encontra-se um quadro (anexo 1) com informações a respeito do número de animais submetidos aos experimentos de biopsia e eventuais óbitos para cada um dos grupos.

Os resultados mostraram que os animais submetidos ao xenotransplante apresentaram boa sedação, sendo, contudo, necessários repiques anestésicos que variaram conforme o indivíduo e linhagem. Na maioria dos casos a sedação foi considerada boa e apenas em seis animais a sedação foi regular. A principal dificuldade encontrada foi o ajuste da dose anestésica em função da linhagem, que foi solucionado com a apresentação do tribromoetanol diluído a 1,25% e aplicado com o dobro de volume para o ajuste da dose de 0,25 mg/g de peso, permanecendo assim com a mesma concentração final e proporcionando maior segurança nos procedimentos anestésicos. A partir desse ajuste na diluição do anestésico, não foram observadas intercorrências com os animais durante o ato cirúrgico. Também, não foi observada relação entre o peso do animal e a necessidade de repique anestésico. Todos sobreviveram ao procedimento de transplante e retornaram da anestesia com o tribromoetanol em menos de 30 minutos depois de terminado o procedimento.

O tempo médio (\pm desvio padrão) de transplante foi de 48 ± 17 minutos e a variação encontrada pode ser explicada pela habilidade adquirida ao longo dos procedimentos e condições próprias dos indivíduos durante a sedação, em 5/65 (7,7%) das fêmeas foi observada excitação no momento que antecedeu às cirurgias.

Os instrumentais utilizados mostraram-se adequados para a execução dos procedimentos de ovariectomia e xenotransplante. A inserção do tecido ovariano na região subcapsular do rim exigiu uma maior precisão dos movimentos; principalmente no sentido de preservar e evitar maiores danos à cápsula na curvatura da borda lateral do rim. Para que não houvesse o rompimento acidental dessa estrutura, uma atenção diferenciada foi necessária durante esta fase do procedimento, além de um constante umedecimento com solução salina fisiológica 0,9% para evitar seu ressecamento.

Durante o procedimento de biópsia, as receptoras apresentaram pequeno sangramento subcapsular que foi prontamente controlado pela hemostasia de compressão local com auxílio de gazes estéreis. Além desse fato relatado, não houve intercorrência durante o procedimento preconizado.

Os tecidos transplantados (Figura 11a) e colhidos por biópsia (Figura 11b) apresentaram dimensões adequadas para a avaliação e estavam na sua maioria íntegros, em alguns casos com evidência de tecido renal circunvizinho. A vascularização foi observada e a presença dos FOPA no tecido colhido confirmada (Figuras 11c, 11d). O procedimento de biópsia foi considerado satisfatório à medida que garantiu a colheita das amostras com tamanho aproximado de 1 mm^3 de 33 receptoras por uma vez e de outras 06 em dois procedimentos sucessivos.

Os resultados com relação ao experimento de biópsia aos 30 dias após o xenotransplante apresentaram 13 indivíduos (59%) com indícios macroscópicos de manutenção ou crescimento tissular (Figura 11a), em duas receptoras foram observados folículos antrais com aproximadamente 3 mm de diâmetro (Figura 12a) puncionados durante o procedimento e em outros nove indivíduos (41%) não houve implantação satisfatória do tecido transplantado. Considerando que dos 13 animais com tecidos encaminhados para a avaliação histológica, 11 provinham de doadores

diferentes, os outros dois indivíduos que tinham doadores em comum foram eliminados desta avaliação para evitar tendências na percentagem média.

Os animais SCID possuem uma mutação no cromossomo 16 que é responsável pela agamaglobulinemia severa e ausência de linfócitos B e T, que os torna tolerantes aos transplantes (GOSDEN *et al.*, 1994; OKTAY *et al.*, 1998) enquanto as camundongas NUDE são homozigotas recessivos para o gene autossômico NUDE e desenvolvem anormalmente o timo tornando-o deficiente para a diferenciação de linfócito T (SHULTZ *et al.*, 1995).

Apesar destas características, o desenvolvimento da técnica de biopsia tecidual justificou-se pela redução do número de animais, situação esta, desejada e recomendada por conselhos e entidades relacionadas à experimentação animal (PIMENTA & SILVA, 2001). Além disso, esta técnica pode vir a ser útil quando a intenção do estudo for acompanhar a evolução dos transplantes num mesmo receptor ao longo de períodos pré-determinados.

As observações histológicas e de microscopia eletrônica de varredura permitiram que fossem avaliados: a integridade dos tecidos envolvidos (Figura 12b) (córtex renal das camundongas e tecido ovariano de fetos bovinos), manutenção e percentagem dos folículos ovarianos transplantados em relação ao tecido original (amostra controle) e a neovascularização do tecido transplantado e sua distribuição vascular ao longo do córtex renal (Figuras 11e, 11f).

A percentagem (média \pm erro padrão) dos folículos observados nas lâminas histológicas pode ser observada na tabela 2. Nela, pode ser observada a diferença na percentagem de folículos primordiais observados entre a doadora (amostra controle) e o tecido transplantado dos animais submetidos à biopsia aos 30 dias pós-transplante, apresentando um desvio populacional que nos permitir inferir que houve crescimento folicular. Embora não tenha havido diferença na percentagem média dos folículos de transição observados entre a doadora e 30 dias após o transplante, a percentagem apresentada de folículos primários corrobora com a possibilidade de transposição dos folículos que estavam como transição na doadora e que tenham tornado-se primários no tecido transplantado.

Os indícios de crescimento folicular até o estágio antral observados macroscopicamente no momento da biópsia foram confirmados com a observação de folículos secundários e antrais aos 30 dias (três indivíduos) (Figuras 12a, 12b). A percentagem de folículos primordiais diminuiu consideravelmente após o período de transplante. De um modo geral, os folículos primordiais encontravam-se em pequena quantidade e percentagem nos tecidos observados após 30 dias.

A avaliação dos tecidos ovarianos também foi realizada após 60 dias de transplante (tabela 3). Assim como no experimento de 30 dias, não foi verificada diferença entre as percentagens de folículos de transição normais e degenerados quando se comparou o tecido da doadora e o colhido por biópsia aos 60 dias pós-transplante. A percentagem de folículos primários também se mostrou diferente em relação aos 60 dias pós-transplante, com folículos secundários e antrais presentes após este período, resultados de três e duas receptoras que os apresentaram, respectivamente.

Partindo-se das informações das biópsias isoladas e da hipótese de que as percentagens de FOPA não seriam alteradas em animais submetidos a duas biópsias sucessivas, um terceiro experimento foi realizado com o objetivo de verificar a resposta tecidual após 30 e 60 dias de transplante numa mesma receptora. No caso deste experimento, 07 fêmeas foram submetidas ao xenotransplante, sendo constatado um óbito por razões desconhecidas ao longo do período experimental (23 dias pós-transplante) e um animal não respondeu ao transplante tecidual, restando desse modo, cinco animais que demonstraram implantação do tecido transplantado e foram submetidos à colheita por biópsia aos 30 e 60 dias.

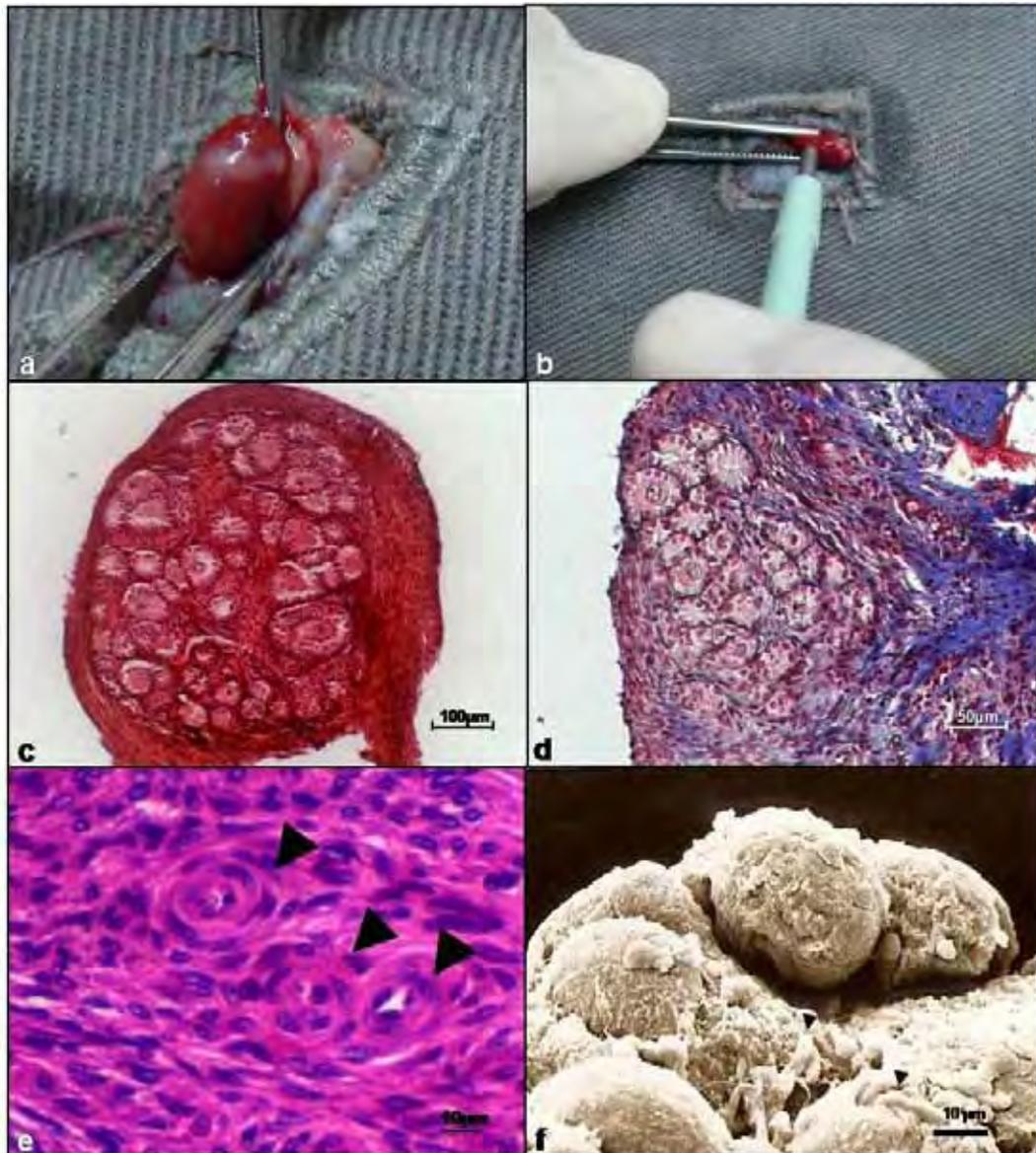


Figura 11. Obtenção e análise de fragmentos de tecido ovariano: a) Macroscopia do tecido ovariano após 30 dias de transplante; b) Biopsia do tecido ovariano com auxílio de um “punch” 2mm; c) Fotomicrografia de tecido ovarianos colhido por biopsia: circunscrito contendo FOPA; d) folículos primordiais, de transição e primários (TM, 40x); e) Neoformação vascular (ponta de seta) (HE, 400x); f) Folículos primordiais em tecido transplantado observados à microscopia eletrônica de varredura; notar forma esférica com revestimento pavimentoso e distribuição vascular (ponta de seta; 1500x).



Figura 12. Relação tecidual entre tecidos doador e receptor: a) Folículo antral de aproximadamente 3 mm observado aos 30 dias pós-transplante; b) Visão geral da relação tecidual obtida entre tecido doador (ovário) e receptor (rim) a partir dos 30 dias (TM, 40x).

Tabela 2: Comparação entre a percentagem média e erro-padrão de folículos (normais e degenerados) no tecido ovariano de fetos bovinos doadoras (Controle) e após 30 dias de xenotransplante (n=11) (FCAV, *Campus* de Jaboticabal-UNESP / 2010).

		Folículo				
		Primordial	Transição	Primário	Secundário	Antral
Normal	Controle	27,1±5,8 ^a	33,5±5,2	10,7±3,7 ^a	0,05±0,05	0,02±0,02
	30 dias	4,6±2,0 ^b	37,9±6,9	43,3±5,0 ^b	2,4±2,0	1,0±0,8
Degenerado	Controle	16,5±5,2 ^a	8,3±1,6	3,7±2,3	0,0±0,0	0,0±0,0
	30 dias	0,68±0,4 ^b	15,3±6,2	8,2±2,5	0,6±0,3	0,0±0,0

Letras diferentes entre doadoras e receptoras (p<0,05)

Tabela 3: Comparação entre a percentagem média e erro-padrão de folículos (normais e degenerados) no tecido ovariano de fetos bovinos doadoras (Controle) e colhidos por biopsia após 60 dias de xenotransplante (n=07) (FCAV, *Campus* de Jaboticabal-UNESP / 2010).

		Folículo				
		Primordial	Transição	Primário	Secundário	Antral
Normal	Controle	24,0±4,5 ^a	39,1±7,7	5,6±2,0 ^a	0,0±0,0	0,0±0,0
	60 dias	2,6±1,5 ^b	27,1±5,2	33,7±6,1 ^b	4,6±3,7	0,2±0,2
Degenerado	Controle	22,0±7,4 ^a	8,5±1,7	0,9±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0
	60 dias	2,3±1,5 ^b	14,2±5,6	9,7±4,1	5,6±4,5	0,0±0,0

Letras diferentes entre doadoras e receptoras (p<0,05)

Os resultados apresentados na tabela 4 demonstraram padrão de distribuição folicular (Figuras 13a, 13b) similar aos apresentados nas biopsias isoladas (30 ou 60 dias) e este fato indica que o procedimento de biopsia tecidual sob a cápsula renal não interferiu na percentagem dos folículos e na sobrevivência das receptoras após os procedimentos, havendo inclusive, receptoras que sobreviveram por até 138 dias após o último procedimento.

A ativação de folículos primordiais com o subsequente crescimento até os estádios antrais iniciais (3-6 mm) foi observada em diferentes espécies após o xenotransplante de tecido ovariano oriundos de gatas (GOSDEN *et al.*, 1994), ovelhas (GOSDEN *et al.*, 1994) vacas (HERNANDEZ-FONSECA *et al.*, 2001), elefantas (GUNASENA *et al.*, 1998) macacas (CANDY *et al.*, 1995) e marsupiais (WOLVEKAMP *et al.*, 2001). Associados às informações destes autores, os achados deste experimento demonstram que os mecanismos que envolvem a ativação folicular e o crescimento pré-antral para o estágio antral não é espécie-dependente e que também não dependem da idade do doador do ovário, conforme demonstrado com doadoras novilhas (HERNANDEZ-FONSECA *et al.*, 2005) e neste experimento com tecidos ovarianos oriundos de fetos bovinos. Tal crescimento parece ser regulado por condições hormonais próprias das camundongas receptoras, fato ainda observado em suínos (KIKUCHI *et al.*, 2006) e fetos humanos (LAN *et al.*, 2008). Ressalte-se ainda, a importância de fatores existentes no próprio rim das camundongas que, a depender da homologia existente podem exercer papel análogo aos produzidos na espécie doadora. Além disso, folículos primordiais são normalmente resistentes às perdas durante o transplante devido ao fato de desenvolverem-se relativamente bem em ambientes hipóxicos (GOSDEN & BYATT-SMITH, 1986) e terem uma baixa taxa metabólica (GOSDEN *et al.*, 1994).

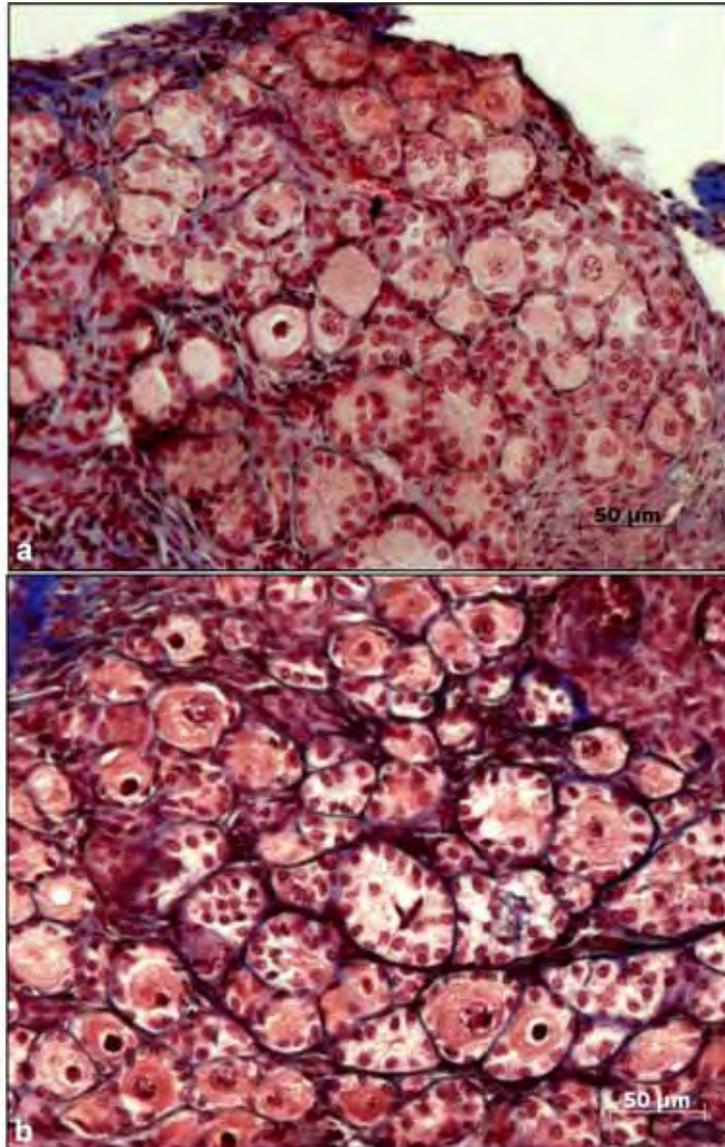


Figura 13. Padrão de distribuição entre categorias e densidade dos FOPA: a) aos 30 dias após o transplante e b) aos 60 dias após o transplante. Notar adensamento folicular em ambas as situações.

Tabela 4: Comparação entre a percentagem média e erro-padrão de folículos (normais e degenerados) no tecido ovariano de fetos bovinos doadoras (Controle) e colhidos por biopsia após 30 e 60 dias de xenotransplante (n=05) (FCAV, *Campus* de Jaboticabal-UNESP / 2010).

		Folículo				
		Primordial	Transição	Primário	Secundário	Antral
Normal	Controle	22,8±6,4 ^a	38,6±11,0	4,8±2,7 ^a	0,0±0,0	0,0±0,0
	30 dias	2,3±0,8 ^b	37,0±7,4	42,6±9,4 ^b	0,1±0,1	0,0±0,0
	60 dias	1,9±1,9 ^b	26,7±7,5	39,3±6,2 ^b	6,5±5,1	0,2±0,2
Degenerado	Controle	24,8±10,2 ^a	8,2±2,4	0,8±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0
	30 dias	0,5±0,3 ^b	8,8±6,1	8,3±2,9	0,3±0,3	0,0±0,0
	60 dias	0,0±0,0 ^b	6,3±3,3	11,2±5,7	7,9±6,1	0,0±0,0

Letras diferentes entre doadoras e receptoras (p<0,05)

A escolha do rim como suporte aos transplantes deu-se por razões que foram desde o aporte vascular existente nesse órgão, à sua capacidade de selecionar moléculas (nutrientes, fatores de crescimento e hormônios) de alto peso molecular provenientes da própria receptora e também moléculas importantes ao organismo e tecido transplantado, como por exemplo, a albumina e o IGF-I, além dos próprios hormônios exógenos utilizados, como o eCG (LEGARDINIER *et al.*, 2005). Ademais, a localização dos transplantes sob a cápsula renal e a possibilidade de neovascularização derivada das artérias arciformes localizadas no rim e que trazem toda sorte de moléculas ao tecido mostrou um benefício ao crescimento folicular.

No experimento 4 foram obtidos oócitos de tamanho apropriado para os procedimentos de produção *in vitro* a partir de folículos ovarianos pré-antrais oriundos de fetos e xenotransplantados sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes. Como optou-se por encaminhar os oócitos para fertilização *in vitro*, informações sobre a competência meiótica não foram colhidas.

Optou-se por trabalhar com o eCG pelo fato desta combinação de hormônios (FSH/LH) já haver sido testada com sucesso em folículos secundários de vacas

xenotransplantados sob condições semelhantes a deste experimento, isto é, inseridos sob a cápsula renal de camundongas SCID (SENBON *et al.*, 2005) e por saber que a relação FSH/LH existente nesta gonadotrofina apresenta resultados satisfatórios com uma única dose para o crescimento folicular em bovinos (BARUSELLI *et al.*, 2008). Acrescente-se ainda que, devido ao alto peso molecular e à presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida (LEGARDINIER *et al.*, 2005)

Os resultados das técnicas de xenotransplante do presente experimento demonstraram que, de um total de 36 fêmeas utilizadas, apenas quatro vieram a óbito, restando 27 fêmeas destinadas exclusivamente para esta finalidade e 05 das receptoras provenientes de procedimento prévio de dupla biopsia de tecido ovariano com 30 e 60 dias.

Dos óbitos verificados, duas fêmeas foram da linhagem CB-17/SCID e duas da linhagem NUDE, não havendo mortalidade das camundongas da linhagem C57Bl/SCID. A primeira linhagem apresentou problemas relativos à sedação e recuperação anestésica enquanto que na segunda, as fêmeas apresentaram além dessas dificuldades, hipotermia. Uma vez que o protocolo estava bem ajustado para a linhagem C57Bl/SCID, não houve óbito em função do transplante para esses animais.

Dos 32 animais utilizados e divididos para os tratamentos r-hFSH (n=14) e eCG (n=18) foi observado ao longo das aplicações um óbito de animal do grupo r-hFSH que foi desconsiderado para coleta de dados.

Embora se tenha conhecimento sobre a presença de folículos antrais em fetos bovinos (CHOHAN & HUNTER, 2000), a produção da enzima esteroideogênica P450 aromatase associada à presença de receptores para estradiol foi detectada em ovários fetais bovinos (BURKHART *et al.*, 2010) o que pode explicar a presença de atividade estrogênica em 69% (r-hFSH) e 72% (eCG) das fêmeas receptoras em algum momento do período de monitoramento por lavagem vaginal antes da aplicação dos respectivos hormônios (Figuras 14a, 14b).

Após a aplicação dos hormônios, folículos antrais foram observados em número 1 a 5 em 46% (6/13) dos animais com média de 2,7 folículos/animal responsivo e média

geral de 1,2 folículos no grupo tratado com r-hFSH (Figura 14c). Quanto ao grupo eCG, foram observados folículos antrais em 38% (7/18) das camundongas receptoras (Figura 14d) com média de 2,0 folículos/animal responsivo e de 0,77 folículos no grupo (Tabela 5). Em suínos, o xenotransplante em camundongas seguido da aplicação de eCG e colheita de oócitos após 48 horas desta aplicação, os oócitos obtidos não proporcionaram competência meiótica para a fertilização *in vitro* (KIKUCHI *et al.*, 2006).

Tabela 5: Número de folículos observados, taxa de recuperação de oócitos e expansão do *cumulus* em receptoras responsivas ao eCG e r-hFSH.

Tratamento (número de receptoras)	Número de folículos observados	Recuperação oocitária	Expansão do <i>cumulus</i> (MIV)
eCG (n=5)	05	05 (100%)	02 (40%)
r-hFSH (n=5)	07	05 (71%)	02 (40%)
Total	12	10 (83,3%)	04 (40%)

Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

A correlação entre o tempo de permanência dos transplantes nas receptoras e a resposta ao tratamento foi averiguada e não foi verificada correlação dos grupos tratados com o eCG ($R= 0,3320$, $P= 0,1783$) e com r-hFSH ($R= 0,0540$, $P= 0,4240$) em relação à permanência do tecido nas receptoras, mesmo se avaliados apenas naquelas fêmeas responsivas aos tratamentos. Apesar de haver uma massiva ativação de folículos primordiais e o aparecimento de maior quantidade de folículos secundários com 60 dias, 10 oócitos (Tabela 5) foram recuperados a partir da estimulação hormonal proposta, o que pode ser ainda consequência do número reduzido de folículos responsivos às gonadotrofinas.

Os oócitos recuperados após o procedimento apresentaram uma massa uniforme de células do *cumulus oophorus* e citoplasma compactos, zona pelúcida intacta e não resultaram em clivagem (Figuras 14e, 14f). A ausência de clivagem pode ser explicada pelo baixo número de oócitos utilizados. Além disso, fatores intrínsecos

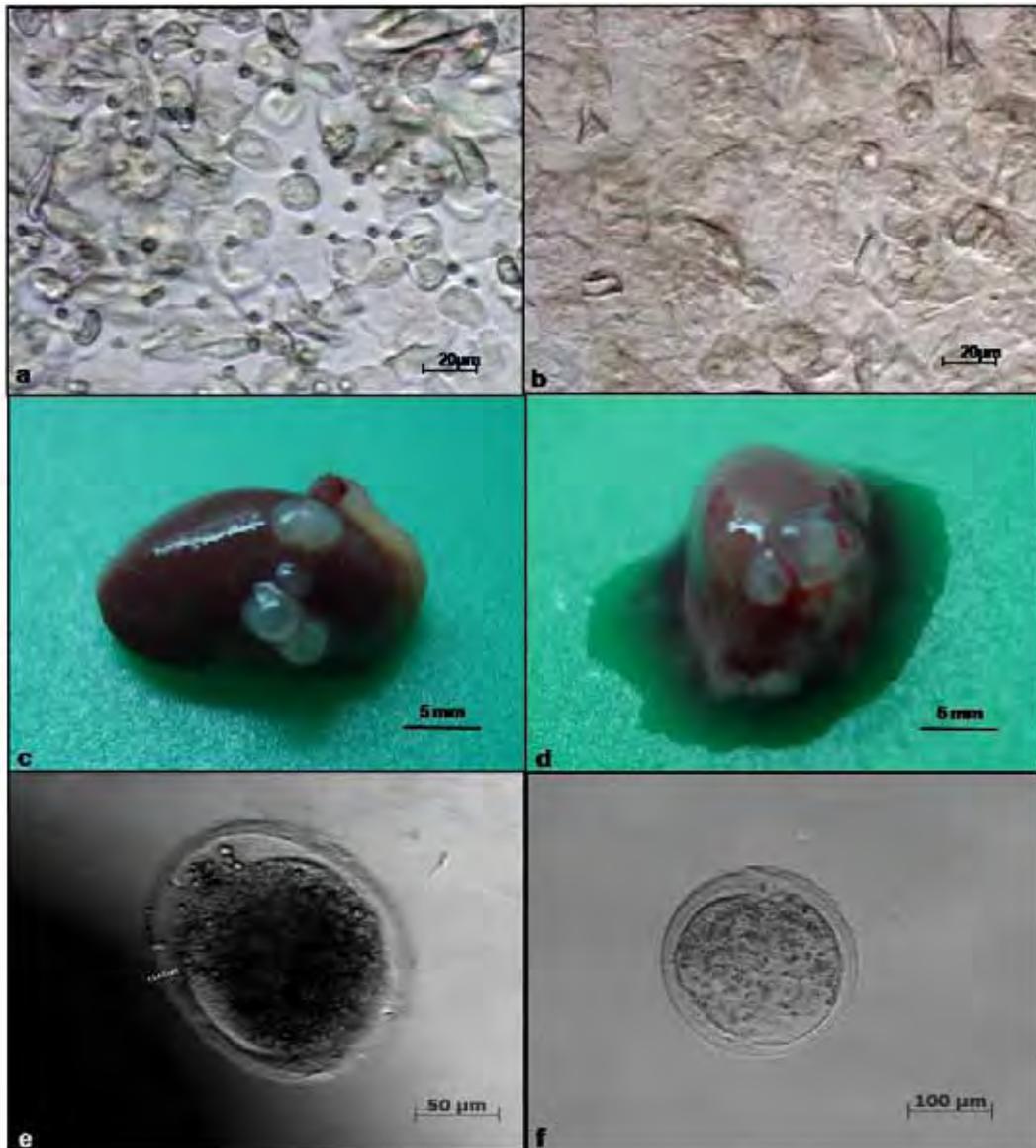


Figura 14. Atividade estrogênica, resposta aos tratamentos hormonais e oócitos submetidos à FIV: a-b) Padrão de atividade estrogênica observada em 69% e 72% antes da estimulação hormonal com r-hFSH e eCG, respectivamente; c) Resposta ao tratamento com r-hFSH; d) Resposta ao tratamento com eCG; e) Oócito colhido em transplante após tratamento da receptora com r-hFSH e fotografado 48 horas após a FIV; f) Oócito colhido em transplante após tratamento da receptora com eCG e fotografado 48 horas após a FIV.

da receptora associados no desenvolvimento e origem dos ovários fetais podem explicar o baixo rendimento nesse experimento. Num estudo com PIV de ovários fetais bovinos, Chohan & Hunter (2000) demonstraram que oócitos pré-natais apresentam uma alta taxa de bloqueio oocitário nos estádios de vesícula germinativa e metáfase I quando comparados com ovários de vacas (12% versus 2,3%, $p < 0,05\%$).

VII. CONCLUSÕES.

A análise conjunta dos resultados apresentados permitiu concluir que:

- O meio de cultivo *in vitro* com PVA apresenta resultados similares aos cultivos com BSA e SFB e garante sobrevivência aos folículos pré-antrais por pelo menos 8 dias de cultivo.
- Tecidos ovarianos xenotransplantados sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes podem ser colhidos com sucesso pela técnica de biópsia desenvolvida, permitindo qualidade de vida às receptoras e com dimensões apropriadas para avaliação.
- Tecidos ovarianos derivados de ovários fetais bovinos, quando xenotransplantados para camundongas imunodeficientes, apresentam-se viáveis após 30 e 60 dias FOPA e com aumento da percentagem de folículos antrais.
- O crescimento de FOPA a estádios antrais ocorre espontaneamente e quando o tecido xenotransplantado é estimulado por hormônios exógenos (r-hFSH ou eCG), os tecidos transplantados respondem de modo igualmente variável, resultando em folículos aptos à punção para posteriores estudos com PIV.

VIII. IMPLICAÇÕES.

Esta pesquisa forneceu subsídios sobre o uso de macromoléculas no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais e, paralelamente, à técnica de cultivo *in vivo* por xenotransplante. A eficácia apresentada por esta última técnica no crescimento folicular pode contribuir com o maior rendimento do ovário além de oferecer perspectivas na implantação desta linha de pesquisa no país, associando-se com estudos envolvendo protocolos de superovulação, em genômica, MOIFOPA, imunologia, doenças infecciosas e na aplicação de cultivos com tecidos ovarianos criopreservados de animais domésticos voltados ou não para a produção animal e animais silvestres.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABEDELAKH A., SALEHNIA M., ALLAMEH, A.A.; DAVOODI, D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity. **Human Reproduction**, v. 25 n.4, p. 977-985, 2010.

ABD-ALLAH, S.M. Successful cryopreservation of buffalo ovaries using *in situ* ovary cryopreservation. **Veterinaria Italiana**, v.45, n.4, p.507-512, 2009.

AERTS, J.M.J.; OSTE, M.; BOLS, P.E.J. Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guided biopsy collection of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.64, p.947–57, 2005.

AERTS, J.M.J.; MARTINEZ-MADRID, B.; LEROY, L.M.R.; AELST, S.V.; BOLS, P.E.J. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. **Fertility and Sterility**, Artigo impresso, 2009.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.; ALFIERI, A.; OLIVEIRA, J.; BRACARENSE, A.; FIGUEIREDO J.R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH *in vitro* the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, n.5, p.1104–1113, 2005.

ARENDONK, A.M.J.; BIJMA, P. Factors affecting commercial application of embryo technologies *in dairy cattle in Europe – a modeling approach*. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.635-649, 2003.

AUBARD, Y. Ovarian tissue xenotransplantation, **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.108, p.14–18, 2003.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.36, p.433-448, 2008.

BASTOS, C.V.; VASCONCELOS, M.M.C.; RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F. Manutenção *in vitro* de células IDE8 em dois tipos de soro bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.543-546, 2007.

BEZERRA, M.B.; RONDINA, D.; LIMA, A.K.F.; OLIVEIRA, L.C.; CECCHI, R.; LUCCI, C.M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.8, p.47-56, 1998.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, n.1, p.147-158, 1982.

BURKHART, M.N.; JUENGEL, J.L.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; PERRY, G.A.; SMITH, M.F.; GARVERICK, H.A. Morphological development and characterization of aromatase and estrogen receptors alpha and beta in fetal ovaries of cattle from days 110 to 250. **Animal Reproduction Science**, v.117, n.1-2, p.43-54, 2010.

CAMPBELL, B.K.; TELFER EE, W. R.; BAIRD, D.T. Ovarian autografts *in sheep* as a model for studying folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, n.1, p.131–139, 2000.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development *in cryopreserved marmoset ovarian tissue after xenotransplantation*. **Human Reproduction**, v.10, n.9, p.2334–2338, 1995.

CARROL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, n.1, p.321–327, 1990.

CECCONI, S.; CAPACCHIETTI, G.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. *In vitro* Growth of Preantral Follicles Isolated from Cryopreserved Ovine Ovarian Tissue **Biology of Reproduction**, v.70, n.1, p.12–17, 2004.

CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; LOPES, C.A.P.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; MELO, M.A.P.; BAO, S.N.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.108, n.3-4, p.309-318, 2008.

CHOHAN, K.R.; HUNTER, A.G. *In vitro* maturation, fertilization and early cleavage rates of bovine fetal oocytes. **Theriogenology**, v.61, n.2, p.373–380, 2004.

COSTA, L.F.S.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.C.; CARÁMBULA, S.F.; NEVES, J.P.; MONTAGNER, M.M. *In vitro* development of bovine preantral follicles *in* monolayer of ovarian cells. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.323-327, 2001.

COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LÔBO, R.N.B.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of goat preantral follicles enclosed *in* ovarian tissue *in* saline or TCM 199 solutions. **Journal of Small Ruminant Research**, v.58, n.2, p.189–193, 2005.

CUPERSCHMID, E.M.; CAMPOS, T.P.R. Os curiosos xenoimplantes glandulares do doutor Voronoff. **História, Ciências e Saúde**, v.14, n.3, p.737-760, 2007.

DRIANCOURT, M.A.; GOUGEON, A.; MONNIAUX, D.; ROYÈRE, D.; THIBAUT, C. Folliculogenèse et ovulation. *In*: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C. **La Reproduction Chez Les Mammifères Et L'Homme**. 2ed. Paris: Ellipses, 2001. cap.15. p.316- 347.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.41, n.2, p.268-276, 1989.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, n.3, p.800–805, 1966.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J. Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, n.4, p.789-799, 1993.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; ECTORS, F.J.; BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology *in* bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, n.6, p.1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification *in* bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v.43, n.5, p.845-858, 1995.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. *In*: GONÇALVES,

P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Roca; 2008.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3, p.135–163, 2003.

GOSDEN, R.G.; BYATT-SMITH, J.G. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. **Human Reproduction**, v.1, n.2, p.65–68, 1986.

GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes *in* mammalian ovaries and their allometric relationships. **Journal Zoology of London**, v.211, n.1, p.169–175, 1987.

GOSDEN, R.G.; BAIRD, D.T.; WADE, J.C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomised sheep by ovarian autografts stored at - 196°C. **Human Reproduction**, v.9, n.1, p.597–603, 1994.

GUNASENA, K.T.; LAKEY, J.R.T.; VILLINES, P.M.; BUSH, M.; RAATH, C.; CRITSER, E.S. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.53, n.1, p.265–75, 1998.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, n.1, p.57–63, 2008.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles *in* long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.62, n.5, p.1322–1328, 2000.

HERNANDEZ-FONSECA HJ, BOSCH P, WININGER JD, MASSEY JB, CHO H, BRACKETT BG. Recovery of oocytes from bovine ovarian tissue transplanted to NOD SCID mice. **Fertility and Sterility**, v.76, n.1 p.56. 2001.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BOSCH, P.; MILLER, D.P.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; BRACKETT, B.G. Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation *in* male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. **Fertility and Sterility**, v.83, n.1, p.1180-1187, 2005.

HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia *in* cycling rats. **Biology of Reproduction**, v.38, n.5, p.1181-1188, 1988.

HOLMBERG, D. Métodos cirúrgicos. In: SLATTER, D.; p. 143-322. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. v. 1. São Paulo: Manole, 1998.

HUAMMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v.54, n.4, p.641-650, 2000.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary Quartely**, v.16, n.2, p.78-80, 1994.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN DONK, H.A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, n.1, p.217-226, 1995.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v.54, n.4 , p.641-650, 2000.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured *in* a serum-free medium. **Biology of Reproduction**, v.67, n.4, p.1099–1105, 2002.

JANG, M.; LEE, E.J.; LEE, S.T.; CHO, M.; LIM, J. M. Preimplantation and fetal development of mouse embryos cultured in a protein-free, chemically defined medium. **Fertility and Sterility**, v.87, n.2, p. 445-447, 2007.

KIKUCHI, K.; KANEKO, H.; NAKAI, M.; NOGUCHI, J., OZAWA, M.; OHNUMA, K.; KASHIWAZAKI, N.; *In vitro* and *In vivo* Developmental Ability of Oocytes Derived from Porcine Primordial Follicles Xenografted into Nude Mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p. 51-57, 2006.

KROHN, P.L. Transplantation of the ovary. *In*: EDS, S.; ZUCKERMAN, A.; WEIR, B.J. **The Ovary**, v.2, p.101-128, Academic Press, New York and London, 1977.

LAN, C.; XIAO, W.; XIAO-HUI, D.; CHUN-YAN, H.; HONG-LING, YU. Tissue culture before transplantation of frozen thawed human fetal ovarian tissue into immunodeficient mice. **Fertility and Sterility**, Artigo impresso, 2008.

LEGARDINIER, S., CAHOREAU, C., KLETT, D., COMBARNOUS, Y. Involvement of equine chorionic gonadotropin (eCG) carbohydrate side chains in its bioactivity; lessons from recombinant hormone expressed in insect cells. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p. 255-259. 2005

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECKE, R.; DHONT, M. Early massive follicle loss and apoptosis *in* heterotopically grafted newborn mouse ovaries **Human Reproduction**, v.17, n.3, p.605-611, 2002.

LUSSIER, J.P.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles *in* the ovary of the cow. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 81, n.2, p. 301–307, 1987.

MACEDO, M.F. **Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas**. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

McCAFFERY, F.H.; LEASK, R.; RILEY, S.C.; TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles *in* a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v.63, n.1, p.267-273, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R.G. Development of human primordial follicles to antral stages *in* SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, v.13, n.5, p. 1133-1138, 1998.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4262–4271, 1999.

PIMENTA, L.G.; SILVA, A.L. Ética e experimentação animal. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.16, n.4, p.255-260, 2001.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Biblitocha Anatomy**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science** v.63, p.27-39, 2000

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v. 77, n.2, p.403-408, 2002.

SANTOS, R.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-preservation. **Thesis**. 143p, University of Utrecht, Netherlands.2007.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed *in* ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v.327, n.1, p.167-176, 2007.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.48, n.3 , p.471-483, 1997.

SENBON, S.; OTA, A.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Bovine oocytes *in* secondary follicles grow and acquire meiotic competence *in* severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v.11, n.2, p.139–149, 2003.

SENBON, S.; ATSUSHI, O.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Xenotransplantation of bovine secondary follicles into ovariectomized female severe combined immunodeficient mice. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.439-444, 2004a.

SENBON, S.; ATSUSHI, O.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Xenotransplantation of Bovine Secondary Follicles into Male and Female SCID Mice. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.21, p.157-161, 2004b.

SENBON, S.; ISHII, K.; FUKUMI, Y.; MIYANO, T. Fertilization and development of bovine oocytes grown *in* female SCID mice. **Zygote**, v.13, n.4, p.309-315, 2005.

SNOW, M.; COX, S.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.; SHAW, J. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. **Science**, v.297, n.5590, p. 2227, 2002.

SHULTZ, L.D.; SCHWEITZER, P.A.; CHRISTIANSON, S.W.; GOTT, B.; SCHWEITZER, I.B.; TENNENT, B.; McKENNA, S.; MOBRATEEN, L.; RAJAN, T.V.; GREINER, D.L. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. **The Journal Immunology**; v.154, n.1, p.180–191, 1995.

SUMMER, M.C.; BIGGS, J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Human Reproduction Update**. v.19, n.6, p.557-582, 2003.

TAMILMANI, G.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; AMAMTH, D.; NAIK, B.R.; MUTHARAO, M. RAO, V.H. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.60, n.3, p.295-305, 2005.

TAN, L.; ZHENG, Y. The follicle development of fetal ovaries in tissue culture. **Journal of Henan Medical University**, v.35, n.1, p.3–5, 2000.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species. **Embryo Transfer Newsletter**, v.24, n.4, p.12-17, 2006.

TRIGATTI, B.L.; GERBER, G.E. A direct role of serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. **Biochemical Journal**. v.308, n.1, p.155-159, 1995.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. *In-Vivo* and *In-Vitro* Development of Preantral Follicles. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.73-82, 1997.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v.54, n.3, p.433-446, 2000.

WEISSMAN, A.; GOTLIEB, L.; COLGAN, T.; JURISICOVA, A.; GREENBLATT, E.M.; CASPER, R.F. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation *in* the NOD-SCID mouse. **Biology of Reproduction**, v.60, n.6, p.1462–1467, 1999.

WOLVEKAMP, M.C.; CLEARY, M.L.; COX, S.L.; SHAW, J.M.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.O. Follicular development *in* cryopreserved common Wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. **Animal Reproduction Science**, v.65, n.1, p.135-147, 2001.

ANEXO

Anexo 1: Número de óbitos em função do procedimento adotado durante os procedimentos de biopsia.

Procedimento em que ocorreu o óbito	Biopsia aos 30 dias	Biopsia aos 60 dias	Biopsia aos 30 e 60 dias
Xenotransplante	26	12	07
Óbito após procedimento	03	01	-
Biopsia 30 dias	23	-	06*
Óbito pós-biopsia	-	-	-
Biopsia 60 dias	-	10*	06
Óbito pós-biopsia	-	-	-
Avaliação macroscópica	22	10	05
Crescimento ou manutenção tissular	13	07	05
Não implantou	09	03	01
Microscopia	11	07	05
Outro destino	02	-	05

* constatado um óbito de causa desconhecida ao longo do período experimental