

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA
ANIMAL

AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO
OVARIANO EQUINO

Discente: Emília da Costa Garcia

Orientador: Prof. Dr. Benner Geraldo Alves

JATAÍ - GO
2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

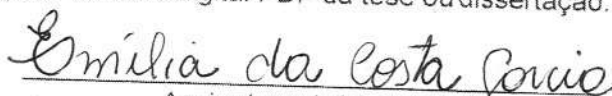
Nome completo do(a) autor(a): Emília da Costa Garcia

Título do trabalho: Autotransplante Heterotópico de Tecido Ovariano Equino

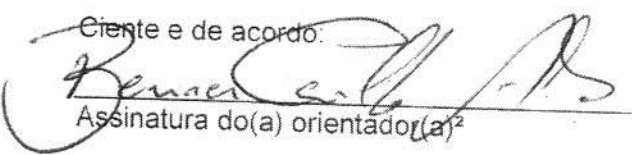
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 24 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

Emília da Costa Garcia

AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO EQUINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração:

Produção Animal

Linha de Pesquisa:

Biotecnologia e Eficiência Reprodutiva

Orientador:

Prof. Dr. Benner Geraldo Alves

Comitê de Orientação:

Prof^a Dr^a Kele Amaral Alves, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

JATAÍ - GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Garcia, Emília da Costa
AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO
EQUINO [manuscrito] / Emília da Costa Garcia. - 2020.
ix, 25 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Benner Geraldo Alves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2020.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biópsia ovariana. 2. Densidade folicular. 3. Tecido ovariano. 4.
Transplante. I. Alves, Benner Geraldo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **005/2020-PPGBA** da sessão de Defesa de Dissertação de **EMÍLIA DA COSTA GARCIA**, que confere o título de Mestra em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**.

Ao vigésimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte, a partir das 13 horas, no Auditório do Prédio de Pós-graduação da Universidade Federal de Jataí-GO, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “**AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO EQUINO**”. Os trabalhos foram instalados pela Orientador, Professor Doutor Bênnier Geraldo Alves (CIAGRA/UFJ) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Gustavo Desire Antunes Gastal (Inia Colonia Uruguai), membro titular externo, cuja participação ocorreu através de videoconferência; e Professor Doutor Gustavo Henrique Marques Araújo (CIAGRA/UFJ), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidate **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Bênnier Geraldo Alves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao vigésimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Bênnier Geraldo Alves, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 16:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Desire Antunes Gastal, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Marques Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1185974** e o código CRC **D7078C1F**.

“Dedico esse trabalho ao meu pai Valdeci Mariano Garcia, minha mãe Iraildes Vaz da Costa Garcia, ao meu esposo Danilo Marques Oliveira e minha filha Maria Clara Marques Garcia que durante todo esse tempo estiveram ao meu lado me apoiando e não mediram esforços para que meu sonho se tornasse realidade.”

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

Agradecimento especial aos professores das seguintes instituições: (i) Universidade Estadual do Ceará (Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira; Dr. José Ricardo de Figueiredo e Dr^a Ana Paula Ribeiro Rodrigues); (ii) Southern Illinois University, Carbondale, EUA (Dr. Eduardo Leite Gastal); e (iii) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (Dra. Kele Amaral Alves). Aos doutorandos da Universidade Estadual do Ceará (Samara Silva Souza; Fabiana A. S. Brandão; e Yago Pinto) e Universidade Federal do Ceará (Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho).

Agradeço pelo apoio financeiro, pois o projeto foi realizado com recursos provenientes dos laboratórios LADIAR (Laboratório de Diagnóstico por Imagem Aplicado a Reprodução Animal) e LAMOFOPA (Laboratório de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais) ambos da Universidade Estadual do Ceará.

Agradecimento especial ao Regimento de Polícia Montada da Cavalaria da Polícia Militar do Estado do Ceará pela disponibilidade dos animais e infraestrutura que foram essenciais para a realização deste projeto.

Agradeço o meu orientador Prof. Benner Geraldo Alves e a Prof^a Kele Amaral Alves por terem me acolhido e confiado em mim no momento em que mais precisei. Finalmente, agradeço a todos aqueles que mesmo indiretamente me ajudaram chegar até aqui.

RESUMO

O tecido ovariano quando coletado por procedimentos de biópsia permite a realização de diversos estudos com aplicações clínicas no campo da preservação da fertilidade feminina. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da idade da doadora e dos sítios de transplante intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) sobre a qualidade, ativação e densidade folicular em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados após 3 e 7 dias. Fragmentos de tecido ovariano foram obtidos (n = 8) por meio de biópsia e, em seguida, autotransplantados aleatoriamente nos sítios IM e SVU e recuperados após 3 e 7 dias. Os principais achados foram: (i) a viabilidade e ativação folicular foram menores nos fragmentos transplantados no sítio SVU; (ii) a depleção folicular pós-transplante variou entre animais e não foi influenciada pela idade e; (iii) a presença de estruturas ovarianas (folículos antrais e corpo lúteo) no momento da biópsia tem associação com a densidade folicular nos fragmentos obtidos.

Palavras-Chave: Biópsia ovariana, Densidade folicular, Tecido ovariano, Transplante

ABSTRACT

Ovarian tissue samples collected by biopsy pick-up method can be used to perform several studies related to fertility preservation. The aim of this study was to evaluate the effects of donor age and intramuscular (IM) and subvulvar (SVU) sites on the follicular viability, activation, and density in ovarian fragments autotransplanted. Biopsy pick-up was performed in mares (n = 7) and ovarian tissue samples were autotransplanted at IM and SVU sites by 3 or 7 days. In summary, our findings indicate that: (i) follicular viability and activation were lower in the ovarian fragments grafted at SVU site; (ii) the follicular depletion post-graft differed among animals and was not influenced by donor age; and (iii) the area of ovarian structures (antral follicles and corpus luteum) presents in the ovary at biopsy procedure had a positive effect on follicular density.

Keywords: Ovarian biopsy, Follicular density, Ovarian tissue, Transplant

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar o efeito dos sítios de transplante intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) sobre a viabilidade, ativação e densidade folicular. (A) Fragmentos de tecido ovariano equino foram coletados por (B) biópsia e, posteriormente, autotransplantados nos sítios (C) IM e (D) SVU por 3 e 7 dias.21
- Figura 2.** Porcentagem de suturas intactas registradas durante a recuperação de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias. Efeito sítio do transplante ($P > 0,05$). Efeito dia pós-transplante ($P > 0,05$).24
- Figura 3.** Análise de correlação entre os parâmetros macroscópicos (A, aderência vs. morfologia; B, hemorragia vs. morfologia; C, hemorragia vs. aderência) avaliados durante a recuperação de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias combinados. Cada círculo no gráfico representa um grupo de fragmentos ovarianos enxertados dentro do mesmo sítio ($n = 27$).25
- Figura 4.** (A) Média ($\pm$ epm) da área das estruturas ovarianas (folículos antrais e corpo lúteo) identificadas durante o procedimento de biópsia para obtenção de fragmentos de tecido ovariano. (B) Associação positiva entre densidade folicular/cm² e área das estruturas ovarianas (mm²). A regressão linear está representada pela reta linear (preta) e equação [(Log10 Densidade folicular = $-2,459 + (0,739 \times \text{Log10 área das estruturas})$; $r = 0,22$; $R^2 = 0,05$; $P < 0,05$].30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média ($\pm$ epm) da aderência, hemorragia e morfologia de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.25
- Tabela 2.** Média ($\pm$ epm) percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais avaliados em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.26
- Tabela 3.** Média ($\pm$ epm) percentual de ativação folicular (folículos de transição, primário e secundário) observada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.26
- Tabela 4.** Média ($\pm$ epm) da densidade folicular e porcentagem de depleção folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.28
- Tabela 5.** Média ($\pm$ epm) da densidade folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.29
- Tabela 6.** Média ($\pm$ epm) da densidade folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados em éguas de diferentes idades.....29

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1.1 Biópsia ovariana	10
1.2 Transplante de tecido ovariano.....	10
1.2.1 Autotransplante	11
1.2.2 Alotransplante	11
1.2.3 Xenotransplante	12
1.3 Biotecnologia da manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)	12
1.4 Ovogênese	13
1.5 Foliculogênese.....	13
1.6 Justificativa	14
1.7 Objetivo.....	15
1.8 Bibliografia	15
CAPÍTULO 2 - AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO EQUINO	18
1. Introdução	19
2. Material e métodos	19
2.1 Animais	20
2.2 Desenho experimental	20
2.3 Biópsia ovariana	21
2.4 Autotransplante e recuperação do tecido ovariano.....	22
2.5 Avaliação macroscópica dos fragmentos ovarianos	22
2.6 Processamento histológico	22
2.7 Classificação morfológica e viabilidade dos folículos pré-antrais	23
2.8 Densidade folicular	23
2.9 Análise estatística	23
3. Resultados	24
3.1 Avaliação macroscópica dos fragmentos.....	24
3.2 Viabilidade e ativação folicular	25
3.3 Densidade folicular	27
4. Discussão.....	30
5. Bibliografia.....	32

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Biópsia ovariana

A coleta de tecido ovariano possibilita o acesso a população de folículos pré-antrais seja para estudos avaliativos ou para preservação da fertilidade feminina sem comprometer a função ovariana [1]. O procedimento de biópsia é minimamente invasivo e, portanto, pode ser realizado repetidas vezes nos mesmos animais [2,3]. Animais que foram submetidos a técnica de biópsia ovariana continuaram ciclando, sem trauma significativo no parênquima ovariano após a avaliação ultrassonográfica [1].

A realização de pesquisas com fragmentos ovarianos provenientes de biópsia tem possibilitado aos pesquisadores estimar o potencial reprodutivo das espécies, assim como definir estratégias para o controle da fertilidade ou melhoria das biotécnicas de reprodução assistida. Por exemplo, a densidade folicular e celular em fragmentos de biópsia são fundamentais para o sucesso de técnicas de transplante de tecido ovariano [3,4].

1.2 Transplante de tecido ovariano

O transplante de tecido ovariano tem como principal objetivo a restauração da fertilidade e sua função endócrina. Mulheres portadoras de câncer e submetidas aos procedimentos de quimioterapia e/ou radioterapia podem criopreservar fragmentos de tecido ovariano que, posteriormente, podem ser transplantados com objetivo de restabelecer ou preservar a fertilidade [5,6].

Fatores angiogênicos encontrados no ovário favorecem o processo de neovascularização, por essas características, a região do ovário é considerada o local adequado para o transplante. O tipo de transplante pode ser classificado de acordo com o local em: ortotópico, quando o enxerto é aplicado em posição anatômica próxima à origem do ovário; e heterotópica, quando o tecido é transplantado distante da posição anatômica original [7,8]. Ainda há uma outra classificação que está relacionada com a relação filogenética entre doador e receptor, como exemplo: autotransplante, alotransplante e xenotransplante [9].

Um dos fatores mais importantes para o sucesso no transplante de tecido ovariano é o rápido estabelecimento da revascularização, que é crucial para a sobrevivência dos folículos ovarianos. A revascularização ocorre em torno de 48 horas pós-enxerto [10], portanto durante este período os fragmentos estão vulneráveis à isquemia [11]. Fatores angiogênicos como fator de crescimento de fibroblastos, fator de transformação de crescimento, gonadotrofinas e esteroides ovarianos influenciam a revascularização do tecido ovariano [10].

Em humanos, a manutenção da fertilidade foi mantida por dois anos em pacientes que tiveram o ovário fresco autoransplantado [12]. Pesquisas realizadas em animais têm demonstrado que progênes podem ser obtidas a partir de oócitos de ovários transplantados em diferentes locais, tanto ortotópicos quanto heterotópicos. No entanto, ainda são necessários mais estudos que elucidem o efeito do sítio de transplante sobre a qualidade dos oócitos produzidos [13].

1.2.1 Autotransplante

O autotransplante se caracteriza quando o tecido ovariano é transplantado para o mesmo indivíduo. É considerado uma das opções mais promissoras para restabelecer a função ovariana em mulheres que se tornaram inférteis por tratamentos quimioterápicos [14,15]. Atualmente, por meio do enxerto de fragmentos ovarianos criopreservados, já nasceram mais de 130 crianças. O autotransplante pode ser tanto ortotópico como heterotópico, o transplante ortotópico tem como vantagem o restabelecimento da função reprodutiva e também a concepção natural [6].

Um fator muito importante é levar em consideração o local a ser transplantado, pois pode influenciar em vários aspectos, como por exemplo, o número e a qualidade dos ovócitos viáveis, o período de isquemia e também a neovascularização do local [6]. Alguns locais já foram testados para utilização de transplantes heterotópicos os quais incluem: o peritônio [16], a cápsula renal [17] e o tecido subcutâneo [13].

1.2.2 Alotransplante

É o transplante realizado entre indivíduos da mesma espécie. O alotransplante de ovário em humanos permitiu a retomada da fertilidade de uma mulher submetida ao tratamento quimioterápico [18]. A grande vantagem dos alotransplantes é o reestabelecimento das funções endócrinas do ovário, evitando assim a necessidade de hormônios de substituição [10]. O principal desafio na aplicação de alotransplantes é a rejeição do enxerto. Dessa forma, há a necessidade de uso contínuo de imunossupressores, e, apesar do extenso desenvolvimento de novas terapias imunossupressoras, o alto custo das drogas e, principalmente, seus efeitos colaterais, ainda são um grande problema a ser superado [19].

1.2.3 Xenotransplante

É o transplante de órgãos e tecidos entre animais de espécies diferentes. Os principais desafios da técnica são: a necessidade de receptoras imunodeficientes; ambiente adequado para a manutenção das receptoras; acompanhamento constante dos animais transplantados, além de uma equipe especializada para fazer o transplante [20].

O primeiro xenotransplante de tecido ovariano (ovelhas para gatas) foi realizado por Gosden et al. [21], com o objetivo de entender o desenvolvimento folicular [21]. Outros modelos animais também foram utilizados como primatas [22], vacas [23] e porcas [24].

1.3 Biotecnologia da manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)

A biotécnica de MOIFOPA tem como objetivo resgatar e isolar dos ovários folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) antes que eles sofram atresia, visando a conservação por um curto período (resfriamento) ou longo (congelamento) e/ou cultivo folicular in vitro para o crescimento, maturação e fertilização dos ovócitos [25]. Sendo assim, a biotécnica permite diversas aplicações nas seguintes áreas: (i) formação de bancos de germoplasma animal; (ii) na pesquisa fundamental ou básica, possibilita o estudo in vitro de diferentes fármacos sobre os FOPA, visando elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial; (iii) biologia molecular, permite identificar e quantificar nos diferentes compartimentos

foliculares a expressão de genes responsáveis pelo controle do crescimento folicular; (iv) nanotecnologia, modelo para testar a inocuidade de nanopartículas utilizadas no carreamento de drogas de interesse médico e; (v) reprodução assistida, ferramenta para o aprimoramento de meios de cultura visando a maturação ovocitária e a produção de embriões in vitro.

1.4 Ovogênese

A ovogênese é caracterizada pela diferenciação das células germinativas primordiais (GGP) até a formação do ovócito haploide [26]. Após a primeira divisão meiótica, os folículos primordiais surgem da porção final do cordão distal formando um ovócito cercado por uma camada de células somáticas escamosas, essas células são agora denominadas de células da granulosa. O cordão de células somáticas pode ter duas origens: as células epiteliais superficiais que são descendentes do ovário, e células derivadas do mesonéfron que se migram através do ovário [27].

As células da granulosa são indispensáveis para a diferenciação, meiose, crescimento e maturação citoplasmática e controle da atividade transcricional do ovócito. Ao atingir uma determinada fase do desenvolvimento, o ovócito produz fatores que inibem a capacidade das células da granulosa de promover seu crescimento, isso indica que o ovócito não determina somente o crescimento do folículo, mas indiretamente o seu próprio desenvolvimento [28].

1.5 Foliculogênese

O processo da foliculogênese envolve uma série de eventos como a formação dos folículos durante a fase fetal, seguido da ativação na fase da puberdade até o seu desenvolvimento final, tornando o ovócito apto para a fertilização. Portanto, a foliculogênese pode ser dividida em duas fases: a pré-antral e antral [3,29].

Os folículos pré-antrais compreendem os primordiais, primários e secundários, e o folículos antrais, são caracterizados pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, os quais passam a ser subclassificados como terciários e pré-ovulatórios [30]. Os folículos pré-antrais representam cerca de ~90%

de toda a população folicular e estão localizados na região periférica do córtex ovariano, constituindo o pool de reserva de folículos quiescentes.

Os folículos primordiais representam a unidade de desenvolvimento fundamental do ovário de mamíferos. São caracterizados pela presença de um ovócito imaturo circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa [28]. Quando estes folículos são ativados as células da granulosa mudam de formato pavimentoso para cubóide, sendo denominados como folículos de transição. Os folículos primários são circundados por uma única camada de células da granulosa totalmente cubóides, enquanto os folículos secundários possuem mais de duas camadas de células cubóides [3].

Os folículos antrais possuem uma área preenchida com fluido folicular (antro), e são denominados de folículos terciários e pré-ovulatórios. O fluido folicular é uma importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivadas do sangue ou das secreções das células foliculares, como por exemplo, os esteróides, gonadotrofinas, fatores de crescimento, proteoglicanos, lipoproteínas e enzimas [8]. A produção de fluido é intensificada durante o desenvolvimento folicular pelo aumento da vascularização e permeabilidade dos vasos sanguíneos [31,27].

1.6 Justificativa

Em mulheres, o sítio de eleição para o transplante de tecido ovariano é o ortotópico. No entanto, sítios heterotópicos apresentam algumas vantagens como: (i) menos invasivo e de fácil acesso, (ii) utilização de moderada sedação e/ou anestesia local e (iii) possibilidade de transplante de uma grande quantidade de tecido ovariano o que permite a rápida restauração da função endócrina do paciente. No entanto, no momento não existe um consenso na literatura sobre qual sítio heterotópico seria o ideal. Além disso, diversos estudos têm demonstrado que fragmentos ovarianos possuem uma alta heterogeneidade folicular e que a qualidade e a densidade folicular podem ser também diretamente influenciadas pela idade, independente da espécie avaliada. Dessa forma, estudos que avaliem os efeitos da idade, qualidade do tecido transplantado e do tipo de sítio utilizado sobre o desempenho de fragmentos de tecido ovariano autotransplantados são necessários.

1.7 Objetivo

Avaliar a influência da idade da doadora e dos sítios de transplante intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) sobre: (i) a qualidade, (ii) ativação e (iii) densidade folicular em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados após 3 e 7 dias.

1.8 Bibliografia

- [1] Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. *Theriogenology* 2013;79:599–609.
- [2] Aerts JMJ, Martinez-Madrid B, Flothmann K, De Clercq JB, Van Aelst S, Bols PEJ. Quantification and viability assessment of isolated bovine primordial and primary ovarian follicles retrieved through a standardized biopsy pick-up procedure. *Reprod Domest Anim* 2008;43:360-6.
- [3] Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, Tarso SGS, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLoS One* 2016a;11:e0149693.
- [4] Schmidt KL, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Muller J, Yding Andersen C. Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries. *Hum Reprod* 2003;18:1158-64.
- [5] Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;364:1405–1410.
- [6] Macedo MF, Bezerra MB, Vicente WRR. Transplante ovariano: aplicações na reprodução de animais domésticos, silvestres e humanos. *Acta Vet Bras* 2011;5:1-7.
- [7] Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Cordova A, Figueiredo JR, Smits J, et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote* 2017;25:391–403.
- [8] Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med* 2012;39:10–14.
- [9] Silber SJ, Derosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008;23:1531–1537.
- [10] Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 1994;134:1146-1154.
- [11] Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafriri A, Neeman M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. *Biol Reprod* 2003;68:2055–2064.

- [12] Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod*. 2012;18:59–67.
- [13] Yang HY, Cox SL, Jenkin G, Findlay J, Trounson A, Shaw J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. *Reproduction* 2006;131:851-859.
- [14] Ceschin AP, Biondo-Simões MLP, Thomaz BAC, Totsugui J. Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos. *Acta Cir Bras* 2004;19:27-30.
- [15] Ladanyi C, Mor A, Christianson MS, Dhillon N, Segars JH. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. *J Assist Reprod Genet* 2017;34:709–722.
- [16] D'acampora AJ, Tramonte R, Manoel FS, Schmidt RR, Muller CT, Silva HT, et al. Análise histológica a viabilidade do transplante autólogo de hemi-ovário em retroperitônio de ratos. *Acta Cir Bras* 2004;19:360-369.
- [17] Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV, et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 2004;61:581–594.
- [18] Donnez J, Dolmans MM. Endothelial cells are essential for ovarian stromal tissue restructuring after xenotransplantation of isolated ovarian stromal cells. *Hum Reprod* 2011;26:1431-1439.
- [19] Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff 05 meeting report. Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7:518-526.
- [20] Bezerra MB, Carmo NA, Macedo MF. Transplantes Gonadais: estado da arte. *Cienc Anim* 2012;22:325-338.
- [21] Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 1994;101:619-23.
- [22] Von schönfeldt V, Chandolia R, Kiesel L, Nieschlag E, Schlatt S, Sonntag B. Advanced follicle development in xenografted prepubertal ovarian tissue: the common marmoset as a nonhuman primate model for ovarian tissue transplantation. *Fertil Steril* 2011;95:1428-1434.
- [23] Hernandez-Fonseca H, Bosch P, Sirisathien S, Wininger JD, Massey JB, Brackett BG. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. *Fertil Steril* 2004;81:888-892.
- [24] Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N, Kaneko H. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. *Anim Sci J* 2011;82:495-503.
- [25] Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV. (2007). Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim* 2007;31:143-152.
- [26] Sadeu JC, Adiaenssens T, Smits J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril* 2006;85:1130-1141.
- [27] Van den hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005;63:1717-1751.
- [28] Palma GA, Arganaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto AA, Sinowatz F. Biology and biotechnology of follicle development. *Sci World J* 2012;2012:938138.

- [29] Silva JRV, Bão SN, Lucci CM, Carvalho FCA, Andrade E, Ferreira MAL, et al. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration in goat preantral follicles preserved *in vitro*. Anim Reprod Sci 2001;66:209-223.
- [30] Leitão CCF, Brito IR, Frota IMA, Silva JRV. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. Acta Sci Vet 2009;37:215-224.
- [31] Martins FS, Silva JRV, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Fatores Reguladores da Foliculogênese em Mamíferos. Ver Bras Reprod Anim 2008;32:36-49.

CAPÍTULO 2 - AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO EQUINO

(Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Theriogenology; Fator de impacto = 2,29)

Emília da Costa Garcia^a, Samara Silva Souza^{bc}, Fabiana A. S. Brandão^{bc}, Yago Pinto^{bc}, Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho^d, Benner Geraldo Alves^{abc}, Kele Amaral Alves^{bce}, Dárcio Ítalo Alves Teixeira^b, José Ricardo Figueiredo^c, Eduardo Leite Gastal^f

^aUniversidade Federal de Goiás, Regional Jataí, GO, Brasil

^bLaboratório de Diagnóstico por Imagem Aplicado a Reprodução Animal, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil

^cLaboratório de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil

^dUniversidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^eUniversidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^fSouthern Illinois University, Carbondale, Illinois, EUA

ABSTRACT

Ovarian tissue samples collected by biopsy pick-up method can be used to perform several studies related to fertility preservation. The aim of this study was to evaluate the effects of donor age and intramuscular (IM) and subvulvar (SVU) sites on the follicular viability, activation, and density in ovarian fragments autotransplanted. Biopsy pick-up was performed in mares (n = 7) and ovarian tissue samples were autotransplanted at IM and SVU sites by 3 or 7 days. In summary, our findings indicate that: (i) follicular viability and activation were lower in the ovarian fragments grafted at SVU site; (ii) the follicular depletion post-graft differed among animals and was not influenced by donor age; and (iii) the area of ovarian structures (antral follicles and corpus luteum) presents in the ovary at biopsy procedure had a positive effect on follicular density.

Keywords: Ovarian biopsy, Follicular density, Ovarian tissue, Transplant

1. Introdução

Em humanos, tecnologias de reprodução assistida como o transplante de tecido ovariano tem sido amplamente utilizado. Além disso, a criopreservação de tecido ovariano seguida de transplante é a única abordagem disponível para crianças, adolescentes e mulheres submetidas aos procedimentos clínicos de radioterapia e/ou quimioterapia [1].

Apesar dos trabalhos promissores, fragmentos de tecido ovariano possuem uma alta heterogeneidade quanto à população, qualidade, distribuição folicular e densidade celular. Além disso, alterações no tecido transplantado devido à apoptose e fibrose tecidual, ativação folicular, “burn out”, isquemia tecidual, interações hormonais e moleculares e tipo de sítio utilizado ainda não foram bem elucidados [2-4]. Em mulheres, o sítio de eleição para o transplante de tecido ovariano é o ortotópico. No entanto, sítios heterotópicos apresentam algumas vantagens como: (i) menos invasivo e de fácil acesso, (ii) utilização de moderada sedação e/ou anestesia local e (iii) possibilidade de transplante de uma grande quantidade de tecido ovariano, o que permite a rápida restauração da função endócrina do paciente [5]. No entanto, no momento não existe um consenso na literatura sobre qual sítio heterotópico seria o ideal.

Diversos estudos têm demonstrado que fragmentos de tecido ovariano possuem uma alta heterogeneidade folicular [6-8]. Além disso, a qualidade e a densidade folicular podem ser também diretamente influenciados pela idade, independente da espécie avaliada [9]. Dessa forma, estudos que avaliem os efeitos da idade, qualidade do tecido transplantado e do tipo de sítio utilizado sobre o desempenho de fragmentos de tecido ovariano autotransplantados são necessários. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da idade da doadora e dos sítios de transplante intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) sobre: (i) a qualidade, (ii) ativação e (iii) densidade folicular em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados após 3 e 7 dias.

2. Material e métodos

2.1 Animais

O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Ceará (UECE). Foram utilizadas éguas mestiças ($n = 7$) com peso médio de 500 kg e idade entre 4 e 17 anos, provenientes do Regimento de Polícia Montada (Cavalaria) da Polícia Militar do Ceará. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) registrado com o protocolo nº 6520796/205. Durante o experimento, os animais foram mantidos em piquetes sombreados e alimentados com ração, feno e água ad libitum.

2.2 Desenho experimental

No laboratório, os fragmentos ovarianos ($n = 12$) de cada égua foram lavados em meio α -MEM suplementado com 1,25 mg/mL de soro albumina bovina (BSA), 100 mg/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 0,047 mM de piruvato de sódio e 2,5 mM HEPES. Em seguida, os fragmentos foram aleatoriamente direcionados para os seguintes tratamentos (Figura 1):

- 1) Controle, fragmentos ovarianos imediatamente fixados em 4% de paraformaldeído;
- 2) Autotransplantados no sítio intramuscular (IM) no pescoço, e recuperados após 3 (IM-3) e 7 (IM-7) dias;
- 3) Autotransplantados na mucosa da vulva, sítio subvulvar (SVU) e recuperados após 3 (SVU-3) e 7 (SVU-7) dias.

Os antímeros direito (3 dias) e esquerdo (7 dias) de cada animal foram utilizados como referência de período pós-transplante para a remoção dos fragmentos. Neste estudo oito réplicas foram realizadas (cada égua foi considerada uma réplica).

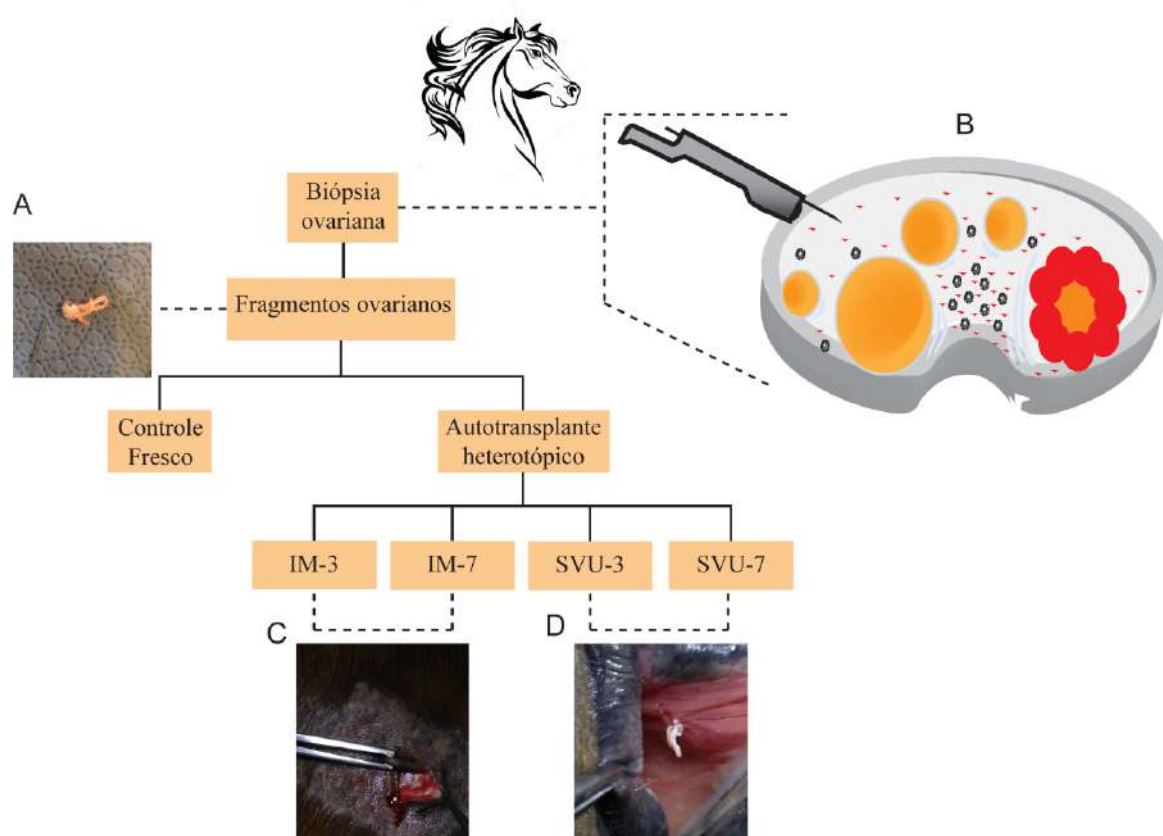


Figura 1. Ilustração dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar o efeito dos sítios de transplante intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) sobre a viabilidade, ativação e densidade folicular. (A) Fragmentos de tecido ovariano equino foram coletados por (B) biópsia e, posteriormente, autotransplantados nos sítios (C) IM e (D) SVU por 3 e 7 dias.

2.3 Biópsia ovariana

Fragmentos ovarianos foram obtidos pelo procedimento de biópsia ovariana desenvolvido para equinos [10]. Resumidamente, antes de cada procedimento os animais foram submetidos a analgesia (flunixin meglumine; 1,1 mg/kg, iv), relaxamento da mucosa retal (brometo de n-butil hioscina; Buscopan, 0,2 mg/kg iv) e sedação (xilazina, 1 mg/kg; tartarato de butorfanol, 0,5 mg/kg iv). Antibioticoterapia foi realizada no dia da biópsia (penicilina, 6500 U/kg im) e durante 48 horas pós-procedimento.

O dispositivo de biópsia utilizado foi automático com 48 cm de comprimento e com um trocarte interno contendo uma calha de 15 × 16 mm circundado por uma agulha de 16 Gauges (US Biopsy, Franklin, IN, USA). O dispositivo foi introduzido na

vagina com auxílio de uma guia de biópsia acoplada com um transdutor microconvexo (5 a 10 MHz) e ultrassom (Honda HCV-3710MV). O ovário foi manipulado transretalmente e posicionado contra a parede vaginal, de forma que a posição da agulha de biópsia possa ser visualizada. Quando a agulha foi posicionada corretamente no ovário, o estilete interno foi disparado, em seguida, a agulha foi retirada e a amostra de tecido ovariano avaliada no laboratório. Todos os procedimentos de biópsia foram realizados pelo mesmo operador.

2.4 Autotransplante e recuperação do tecido ovariano

Fragmentos ovarianos foram transplantados nos sítios IM (n = 6) e SVU (n = 6) de cada animal. Para o procedimento de transplante, foi realizada uma sedação (xilazina, 1 mg/kg; tartarato de butorfanol, 0,5 mg/kg iv) e anestesia local (lidocaína, 10 mg/kg sc). Em seguida, uma incisão (~3 cm) foi realizada para o transplante do fragmento ovariano. Antes da inserção, os fragmentos (3 fragmentos por sítio) foram envoltos por um fio de sutura não absorvível (6/0 Prolene; Ethicon, Diegem, Belgium). Após 3 ou 7 dias, os animais foram submetidos novamente ao procedimento para a retirada dos fragmentos. Todos os procedimentos cirúrgicos (transplante e recuperação dos fragmentos) foram realizados pelo mesmo operador.

2.5 Avaliação macroscópica dos fragmentos ovarianos

Após o transplante de tecido ovariano (3 ou 7 dias), os fragmentos foram classificados macroscopicamente quanto a: (i) morfologia, 1 = necrótico (totalmente escuro) a 5 = intacto e túrgido com aumento de volume; (ii) adesão, 1 = pobre (fácil remoção) a 5 = intensa (difícil remoção); e (iii) hemorragia, 1 = ausente a 5 = presente em todo fragmento. Todas as classificações foram realizadas pelo mesmo operador.

2.6 Processamento histológico

Os fragmentos ovarianos retirados após o transplante foram fixados em solução de 4% de paraformaldeído por 2 horas e mantidos em álcool 70% até a preparação histológica. Em seguida, foram embebidos em parafina e cortados em

secções seriais de 7 μm [6]. Cada secção histológica foi montada e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva de 40x (Nikon E200; Toyo, Japão).

2.7 Classificação morfológica e viabilidade dos folículos pré-antrais

Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o seu grau de desenvolvimento em primordial (folículos circundados por apenas uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso), transição (folículos com uma camada de células da granulosa pavimentosas e cubóides), primário (folículos com uma camada de células da granulosa cubóides) e, secundário (folículos com duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides) [6]. Quanto à viabilidade os folículos foram classificados em: normal, quando apresentavam o núcleo do oócito com ausência de picnose e células da granulosa bem organizadas; e anormal, quando possuíam oócito com núcleo picnótico, citoplasma retraído e camadas de células da granulosa desorganizadas [9]. Todas as classificações foram realizadas pelo mesmo operador.

2.8 Densidade folicular

A densidade folicular foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Alves et al., 2015 [6]. Resumidamente, o perímetro de cada secção histológica foi delimitado por meio de um software de edição de imagens (Image J, versão 1.45, National Institutes of Health, EUA) e a área foi mensurada em cm^2 . Portanto, a densidade folicular foi calculada pela seguinte fórmula: densidade folicular = número de folículos observados/área da secção histológica.

2.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas por meio do software estatístico Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software, Inc., EUA). Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene). A comparação de médias entre os tratamentos e dias pós-transplante foi avaliada pelo teste t ou por ANOVA seguida do teste de Fisher (LSD). Variáveis apresentadas na

forma de porcentagem foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Os resultados foram apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média) e porcentagem e considerados significativos quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Avaliação macroscópica dos fragmentos

Neste estudo, a porcentagem de suturas intactas não diferiu ($P > 0,05$) entre os sítios e dias pós-transplante (**Figura 2AB**). Em relação aos parâmetros macroscópicos (**Tabela 1**), a aderência e hemorragia foram maiores ($P < 0,05$) no sítio IM após 3 dias em comparação ao SVU. No entanto, após 7 dias a aderência, hemorragia e morfologia foram similares ($P > 0,05$) entre os sítios. Dentro do mesmo sítio avaliado e entre os dias, todos os parâmetros aumentaram no sítio SVU após 7 dias de transplante, enquanto no sítio IM permaneceram ($P > 0,05$) constantes. A análise de correlação demonstrou associações positivas ($P < 0,05$) da morfologia com a aderência (**Figura 3A**) e hemorragia (**Figura 3B**) e entre aderência e hemorragia (**Figura 3C**).

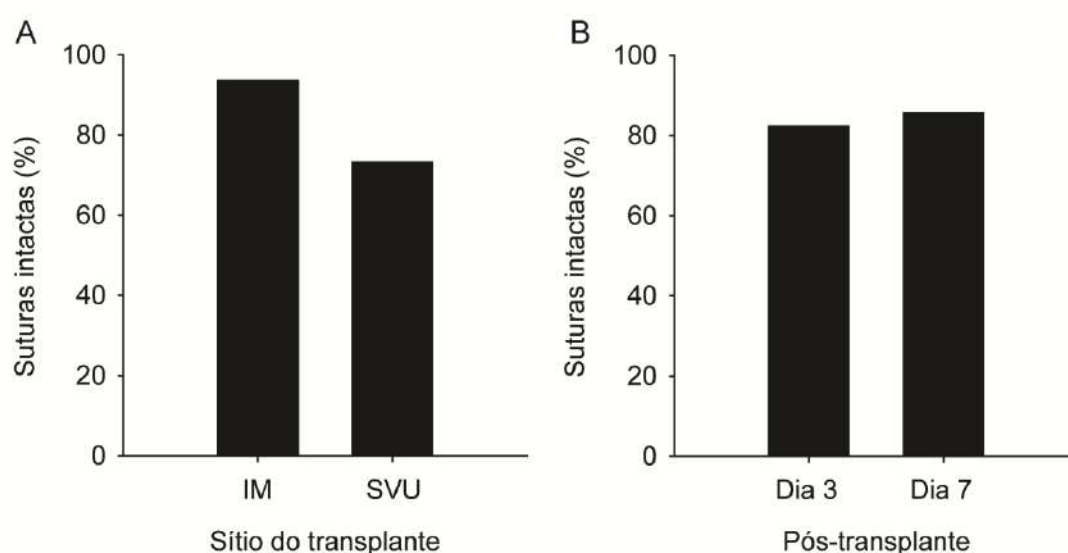


Figura 2. Porcentagem de suturas intactas registradas durante a recuperação de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias. Efeito sítio do transplante ($P > 0,05$). Efeito dia pós-transplante ($P > 0,05$).

Tabela 1. Média ($\pm$ epm) da aderência, hemorragia e morfologia de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.

Parâmetros	Fragmentos ovarianos transplantados (n = 84)			
	Dia 3		Dia 7	
	IM	SVU	IM	SVU
Aderência (1 - 5)	3,2 $\pm$ 0,5 ^b	1,8 $\pm$ 0,4 ^a	4,3 $\pm$ 0,4 ^b	4,2 $\pm$ 0,3 ^b
Hemorragia (1 - 5)	2,5 $\pm$ 0,4 ^b	1,6 $\pm$ 0,1 ^a	2,2 $\pm$ 0,2 ^{ab}	2,6 $\pm$ 0,2 ^b
Morfologia (1 - 5)	3,6 $\pm$ 0,4 ^a	3,2 $\pm$ 0,4 ^a	4,0 $\pm$ 0,3 ^{ab}	4,8 $\pm$ 0,1 ^b

^{a,b} Na linha, letras diferentes indicam significância ($P < 0,05$).

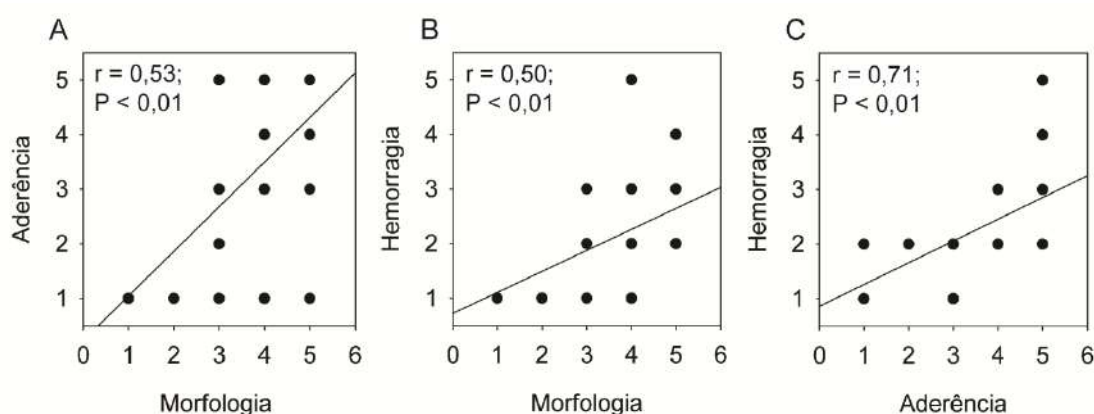


Figura 3. Análise de correlação entre os parâmetros macroscópicos (A, aderência vs. morfologia; B, hemorragia vs. morfologia; C, hemorragia vs. aderência) avaliados durante a recuperação de fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias combinados. Cada círculo no gráfico representa um grupo de fragmentos ovarianos enxertados dentro do mesmo sítio (n = 27).

3.2 Viabilidade e ativação folicular

A porcentagem de folículos morfologicamente normais (**Tabela 2**) foi semelhante ($P > 0,05$) entre os dias 3 e 7 pós-transplante para ambos os sítios IM e SVU. Após 7 dias de transplante, a viabilidade folicular foi superior ($P < 0,05$) no sítio

IM. Em adição, o sítio SVU apresentou menor ($P < 0,05$) viabilidade folicular em relação ao controle após 7 dias. A ativação folicular (**Tabela 3**) não diferiu ($P < 0,05$) dentro do mesmo sítio avaliado e entres os dias pós-transplante (D3 vs. D7). No entanto, ativação folicular foi maior ($P < 0,05$) no sítio IM após 7 dias em comparação ao SVU. Em relação ao grupo controle fresco, a ativação folicular foi superior ($P < 0,05$) em todos os sítios e dias pós-transplante avaliados.

Tabela 2. Média ($\pm$ epm) percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais avaliados em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.

Sítio do transplante	Folículos normais (%)	
	Pós-transplante	
	Dia 3	Dia 7
IM	100,0 $\pm$ 0,0 ^A	95,3 $\pm$ 2,8 ^A
SVU	91,6 $\pm$ 6,1 ^A	81,8 $\pm$ 4,3 ^{B*}

Entre os dias dentro do mesmo sítio de transplante ($P > 0,05$). ^{A,B} Na coluna, letras diferentes sobrescritas indicam significância ($P < 0,05$). *Difere do grupo controle ($P < 0,05$).

Tabela 3. Média ($\pm$ epm) percentual de ativação folicular (folículos de transição, primário e secundário) observada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.

Controle fresco	Primordial: 91,0 ± 1,5		Ativados: 9,0 ± 1,5	
Sítio do transplante	Pós-transplante			
	Dia 3		Dia 7	
	Primordial	Ativados	Primordial	Ativados
IM	70,0 ± 10,5*	30,0 ± 10,5 ^{A*}	57,3 ± 6,8*	42,7 ± 6,8 ^{A*}
SVU	70,6 ± 11,3*	29,4 ± 11,3 ^{A*}	69,7 ± 5,3*	30,3 ± 5,3 ^{B*}

^{A,B} Entre os sítios de transplante dentro do mesmo dia e categoria folicular ($P < 0,05$). Entre os dias dentro do mesmo sítio de transplante e categoria folicular ($P > 0,05$). *Diferem do grupo controle dentro da mesma categoria folicular ($P < 0,05$).

3.3 Densidade folicular

A densidade folicular variou entre 0,1 e 49 folículos por cm^2 e diferiu ($P < 0.05$) entre as éguas, independente do dia e sítio de transplante utilizado (**Tabela 4**). Após 7 dias de transplante, duas éguas (#4 e #6) apresentaram fragmentos ovarianos em ambos os sítios IM e SVU com densidade folicular semelhante ($P > 0.05$) ao grupo controle. A taxa de depleção folicular variou entre 0 e 96%. No geral, a densidade folicular não diferiu ($P > 0,05$) entre os dias e sítios de transplante avaliados (**Tabela 5**). No entanto, a densidade folicular foi menor ($P < 0,05$) em todos os dias e sítios em relação ao grupo controle.

A densidade folicular foi avaliada de acordo com o grupo de idade antes e após o transplante (**Tabela 6**). As éguas entre 15-17 anos apresentaram densidade folicular superior ($P < 0,05$) em relação ao grupo de 4-8 anos. No entanto, após o transplante (dados dos sítios IM e SVU combinados) a densidade folicular foi similar ($P > 0,05$) entre os grupos de idade. Dentro do mesmo grupo avaliado, a densidade folicular decresceu ($P < 0,05$) após o transplante.

A área das estruturas ovarianas (mm^2) identificadas no momento da biópsia e sua associação com a densidade folicular foi avaliada (**Figura 4AB**). No geral, a área das estruturas ovarianas foi maior ($P < 0,05$) nas éguas entre 15-17 anos de idade em comparação com o grupo de 4-8 anos (**Figura 4A**). Em adição, a regressão linear verificou uma associação positiva entre a densidade folicular e a área das estruturas ovarianas (**Figura 4B**).

Tabela 4. Média ($\pm$ epm) da densidade folicular e porcentagem de depleção folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.

Animal	Densidade folicular/cm ²					Depleção após 7 dias (%)	
	Controle	IM - Dia 3	IM - Dia 7	SVU - Dia 3	SVU - Dia 7	IM	SVU
#1	49,0 $\pm$ 8,2 ^{Ca}	2,5 $\pm$ 1,1 ^{Bb}	-	-	-	-	-
#2	6,3 $\pm$ 1,5 ^{ABa}	0,3 $\pm$ 0,2 ^{Ab}	0,9 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	0,8 $\pm$ 0,4 ^{Ab}	0,8 $\pm$ 0,4 ^{Ab}	85,7	87,3
#3	9,7 $\pm$ 1,9 ^{Ba}	0,1 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	0,3 $\pm$ 0,2 ^{Ab}	0,1 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	1,5 $\pm$ 0,8 ^{ABb}	96,9	84,5
#4	6,0 $\pm$ 1,7 ^{ABa}	0,5 $\pm$ 0,3 ^{Ab}	4,4 $\pm$ 2,1 ^{Bab}	2,2 $\pm$ 1,6 ^{Aab}	4,0 $\pm$ 1,5 ^{Bab}	26,6	33,3
#6	2,4 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	0,1 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	2,1 $\pm$ 1,3 ^{Aab}	1,0 $\pm$ 0,5 ^{Aab}	2,8 $\pm$ 0,7 ^{ABa}	12,5	0,0
#7	7,4 $\pm$ 1,3 ^{ABa}	0,6 $\pm$ 0,3 ^{ABb}	0,7 $\pm$ 0,2 ^{Ab}	1,0 $\pm$ 0,6 ^{Ab}	0,4 $\pm$ 0,1 ^{Ab}	90,5	94,5
#8	7,9 $\pm$ 1,7 ^{ABa}	-	0,4 $\pm$ 0,2 ^{Ab}	0,7 $\pm$ 0,4 ^{Ab}	1,6 $\pm$ 0,5 ^{Ab}	94,9	79,7

^{A,B,C} Na coluna, letras diferentes sobrescritas maiúsculas indicam significância ($P < 0,05$). ^{a,b} Na linha, letras diferentes sobrescritas minúsculas indicam significância ($P < 0,05$). Animal #1: não contribuiu no restante do desenho experimental. Animal #8: fragmentos ovarianos não foram recuperados no sítio IM após 3 dias de transplante.

Tabela 5. Média ($\pm$ epm) da densidade folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados nos sítios intramuscular (IM) e subvulvar (SVU) após 3 e 7 dias.

Sítio do transplante	Densidade folicular/cm ²	
	Dias pós-transplante	
	Dia 3	Dia 7
IM	0,9 $\pm$ 0,4*	1,1 $\pm$ 0,3*
SVU	0,8 $\pm$ 0,2*	1,8 $\pm$ 0,4*

Na linha, entre os dias dentro do mesmo sítio de transplante ($P > 0,05$). Na coluna, entre os sítios de transplante dentro do mesmo dia ($P > 0,05$). *Diferem do grupo controle ($P < 0,05$).

Tabela 6. Média ($\pm$ epm) da densidade folicular avaliada em fragmentos de tecido ovariano equino autotransplantados em éguas de diferentes idades.

Categoria de idade (anos)	Densidade folicular/cm ²	
	Controle	[†] Pós-transplante
4 – 8	7,6 $\pm$ 0,9 ^{Aa}	1,1 $\pm$ 0,2 ^{Ab}
15 – 17	17,6 $\pm$ 2,7 ^{Ba}	1,3 $\pm$ 0,2 ^{Ab}

[†] Dados dos sítios IM e SVU combinados. ^{A,B} Na coluna, letras diferentes sobrescritas maiúsculas indicam significância ($P < 0,05$). ^{a,b} Na linha, letras diferentes sobrescritas minúsculas indicam significância ($P < 0,05$).

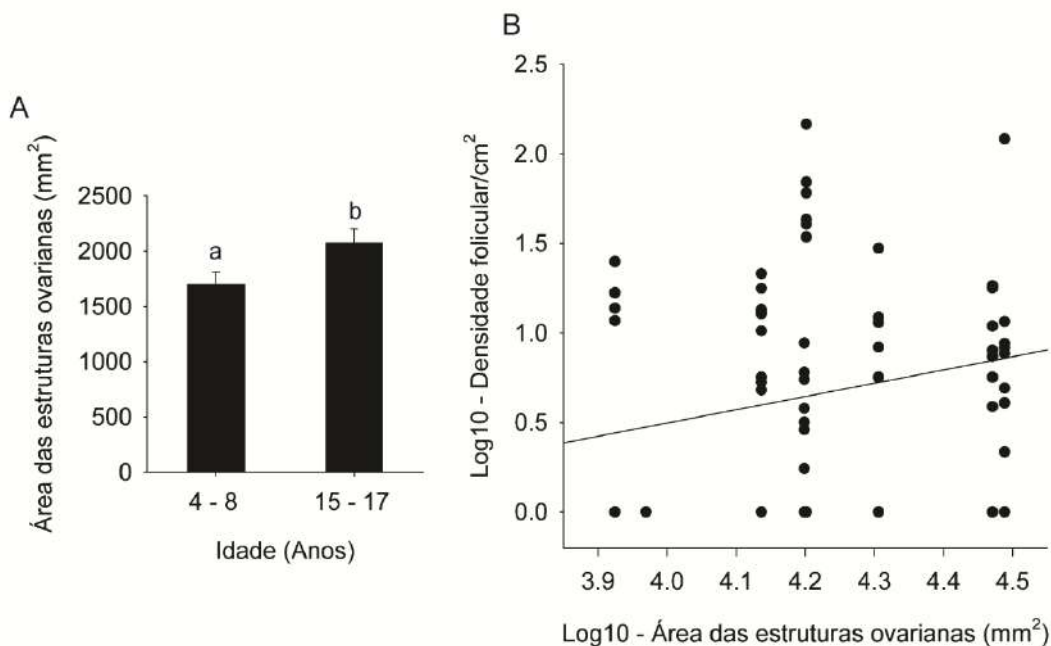


Figura 4. (A) Média ($\pm$ epm) da área das estruturas ovarianas (folículos antrais e corpo lúteo) identificadas durante o procedimento de biópsia para obtenção de fragmentos de tecido ovariano. (B) Associação positiva entre densidade folicular/cm² e área das estruturas ovarianas (mm²). A regressão linear está representada pela reta linear (preta) e equação [(Log10 Densidade folicular = $-2,459 + (0,739 \times \text{Log10 área das estruturas})$); $r = 0,22$; $R^2 = 0,05$; $P < 0,05$].

4. Discussão

Este é o primeiro estudo na espécie equina que avaliou o desenvolvimento de folículos pré-antrais após o autotransplante heterotópico (IM e SVU) de tecido ovariano. Os principais achados foram: (i) a viabilidade e ativação folicular foram menores nos fragmentos transplantados no sítio SVU; (ii) a depleção folicular pós-transplante varia entre animais e não foi influenciada pela idade; (iii) e a presença de estruturas ovarianas (folículos antrais e corpo lúteo) no momento da biópsia tem associação com a densidade folicular dos fragmentos obtidos.

No presente estudo, parâmetros macroscópicos foram avaliados pós-transplante. No geral, a hemorragia, adesão e morfologia não diferiram entre os sítios (IM e SVU) após 7 dias. No sítio SVU, todos os parâmetros aumentaram durante o transplante. Em adição, associações positivas entre morfologia, adesão e hemorragia foram observadas. A partir da inserção do fragmento ovariano, é

necessário um período de 4 a 5 dias para se estabelecer uma revascularização local, com suporte de oxigênio e nutrientes [11]. Após este período, oxigênio e nutrientes nutrem o tecido circundante, difundindo-se para o fragmento transplantado até que a revascularização seja restabelecida. Independente do sítio de transplante utilizado, eventos desfavoráveis como isquemia e atresia folicular foram observados previamente à revascularização tecidual [12]. Os escores visuais aqui elaborados para a avaliação do tecido ovariano, podem ser utilizados como uma ferramenta para pré-seleção de fragmentos pós-transplantados que poderão ser direcionados para outras técnicas de reprodução assistida como criopreservação ou cultivo *in vitro*.

O percentual de folículos morfolologicamente normais não diferiu entre os dias avaliados, independente do sítio (IM e SVU). No entanto, ao final do transplante a viabilidade folicular foi superior no sítio IM. Em camundongos [13], maior viabilidade folicular foi observada no sítio IM em relação ao subcutâneo (SC), sugerindo que o suprimento vascular e a perfusão tecidual fornecidas pela musculatura podem contribuir para a neovascularização do tecido transplantado, minimizando os danos relacionados à isquemia. O sítio de transplante pode interferir diretamente sobre o desenvolvimento e a qualidade folicular [14]. Além disso, algumas variáveis devem ser consideradas previamente à sua escolha como a acessibilidade ao local do transplante, temperatura, pressão e vascularização.

A ativação folicular nos fragmentos ovarianos transplantados foi no mínimo 3 vezes superior em relação ao controle fresco, independente do dia e sítios avaliados. Em adição, o sítio IM apresentou maior proporção de folículos ativados após 7 dias de transplante. A ativação de folículos primordiais é um processo irreversível e pode ser ocasionada por fatores como ausência de mecanismos inibitórios reguladores da foliculogênese e deficiência na vascularização do tecido após o transplante [15]. O conjunto destes fatores pode induzir o consumo precoce (“burnout”) da reserva folicular inclusa em fragmentos de tecido ovariano transplantados. Apesar disso, nossos achados sugerem que ambos os sítios IM e SVU foram capazes de estimular o desenvolvimento folicular inicial em equinos após o autotransplante de tecido ovariano.

Neste estudo, a densidade folicular decresceu após 3 e 7 dias em ambos os sítios IM e SVU e a taxa de depleção folicular variou de 0 a 96%. O efeito idade sobre a densidade folicular foi avaliado e, curiosamente, as éguas entre 15-17 anos

apresentaram densidade superior no pré-transplante. Entretanto, o efeito idade não foi observado no pós-transplante. Em adição, verificamos uma associação positiva entre a densidade folicular e a área das estruturas ovarianas no momento da biópsia. O potencial de fertilidade de uma fêmea pode ser mensurado pela quantidade e qualidade dos folículos pré-antrais presentes em um determinado fragmento de tecido ovariano [9]. No entanto, em fragmentos ovarianos provenientes de biópsia, uma alta variabilidade da densidade folicular foi reportada entre espécies (camundongos [16]; mulheres [17]; caprinos [7]), dentro da mesma espécie (equino [6,10,18]), entre ovários do mesmo animal (equino) [9], e entre secções histológicas dentro do mesmo fragmento ovariano (caprinos) [7]. Além disso, a densidade folicular pode ser influenciada pela idade (humanos [19]; macaco [20]; égua [21]; vaca [22]) e presença de estruturas ovarianas como folículos terciários, pré-ovulatórios e corpo lúteo [9]. A heterogeneidade folicular no estroma ovariano associada ao efeito idade deve ser considerada quando fragmentos ovarianos são utilizados em biotecnologias de reprodução assistida como criopreservação, cultivo e/ou transplante. Curiosamente, a densidade folicular foi superior nas éguas de 15-17 anos, e tal achado, pode ser explicado pela presença de estruturas ovarianas presentes durante a biópsia. Recente estudo em equinos [9], demonstrou o efeito físico destas estruturas ovarianas sobre o parênquima ovariano resultando em maior densidade folicular e celular e melhor qualidade dos folículos.

Concluindo, o sítio IM pode ser utilizado como opção para o transplante de tecido ovariano na espécie equina, uma vez que cirurgias minimamente invasivas são necessárias. Além disso, após 7 dias de transplante a viabilidade e ativação folicular foram superiores no sítio IM. Embora exista uma associação benéfica entre a presença de estruturas ovarianas e a densidade folicular, este efeito não foi observado sobre a qualidade, ativação e manutenção da população folicular no pós-transplante de tecido ovariano.

5. Bibliografia

- [1] Donnez J, Dolmans MM. Natural hormone replacement therapy with a functioning ovary after the menopause: dream or reality? *Reprod Biomed Online* 2018;37:359–366.

- [2] Damous LL, Nakamuta JS, Carvalho AETS, Carvalho KC, Soares-Jr JM, Simões MJ, et al. Does adipose tissue-derived stem cell therapy improve graft quality in freshly grafted ovaries? *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:108.
- [3] Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod* 2002; 17:605–611.
- [4] Scalercio SR, Amorim CA, Brito DC, Percário S, Oskam IC, Domingues SF, et al. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reprod Fertil Dev* 2015;28:1854–1864.
- [5] Gao JM, Yan J, Li R, Li M, Yan LY, Wang TR, et al. Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel. *Hum Reprod* 2013;28:2784–2793.
- [6] Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RF, Gastal MO, et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology* 2015;83:1048-1055.
- [7] Brandão FAS, Alves BG, Alves KA, Souza SS, Silva YP, Freitas VJF, et al. Laparoscopic ovarian biopsy pick-up method for goats. *Theriogenology* 2018; 107:219–225.
- [8] Fransolet M, Labied S, Henry L, Masereel MC, Rozet E, Kirschvink N, et al. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. *PLoS One* 2014;9:e91073.
- [9] Alves KA, Alves BG, Gastal GD, De Tarso SG, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The Mare Model to Study the Effects of Ovarian Dynamics on Preantral Follicle Features. *PLoS One* 2016;11:e0149693.
- [10] Haag KT, Magalhaes-padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. *Theriogenology* 2012; 79:599–609.
- [11] Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertil Steril* 2009;92:374–381.
- [12] Wang Y, Chang Q, Sun J, Dang L, Ma W, Hei C, et al. Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2012;24:646–653.
- [13] Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafriri A, Neeman M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. *Biol Reprod* 2003;68:2055–2064.
- [14] Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril* 2009;91:2349–2354.
- [15] Zhang JM, Li LX, Liu XL, Yang YX, Wan XP. Sucrose affecting successful transplantation of vitrified-thawed mouse ovarian tissues. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:137–142.
- [16] Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY)* 2011;3:782–793.
- [17] Fabbri R, Vicenti R, Macciocca M, Pasquinelli G, Lima M, Parazza I, et al. Cryopreservation of ovarian tissue in pediatric patients. *Obstet Gynecol Int* 2012;2012:910698.

- [18] Haag KT, Magalhaes-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, et al. Equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method: histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. *Theriogenology* 2012;79:735–743.
- [19] Wallace WH, Kelsey TW. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography. *Hum Reprod* 2004;19:1612–1617.
- [20] Nichols SM, Bavister BD, Brenner CA, Didier PJ, Harrison RM, Kubisch HM. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod* 2005;20:79–83.
- [21] Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 2008;69:23–30.
- [22] Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005;73:45–53.