

**VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS
AUTOTRANSPLANTADOS PARA O RIM DE
CAMUNDONGAS BALB-C**

NAYARA ALMEIDA DO CARMO

Médica Veterinária

MOSSORÓ-RN
2013

NAYARA ALMEIDA DO CARMO

**VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS
AUTOTRANSPLANTADOS PARA O RIM DE
CAMUNDONGAS BALB-C**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Profº. D.Sc. Marcelo Barbosa
Bezerra - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2013

Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA

C287v Carmo, Nayara Almeida do.

Viabilidade de folículos ovarianos autotransplantados para o rim de camundongas Balb-C. / Nayara Almeida do Carmo. -- Mossoró, 2013.
60f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal. Área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra
1. Camundongas - Autotransplante. 2. Autotransplante subcapsular renal. 3. Caspase 4. Atresia. I. Título.

CDD: 614.4

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza
CRB-15/452

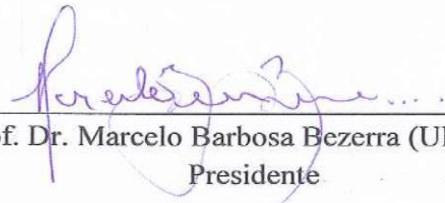
NAYARA ALMEIDA DO CARMO

**VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS AUTOTRANSPLANTADOS
PARA O RIM DE CAMUNDONGAS BALB-C**

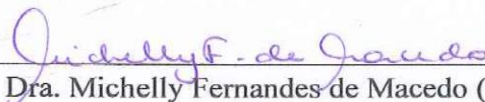
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do
Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal

APROVADA EM 30/08/13.

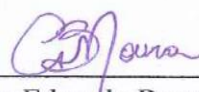
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)
Presidente



Prof. Dra. Michelly Fernandes de Macedo (UFERSA)
Primeira Conselheira



Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFRN)
Segundo Conselheiro

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAYARA ALMEIDA DO CARMO – Nascida no município de Mossoró-RN, no dia 06/08/1986, filha de Francisco Pedro do Carmo e Marilene Guilherme Almeida, concluiu o ensino fundamental e médio no Colégio Diocesano Santa Luzia em Mossoró-RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2011.1. Em agosto de 2011 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de mestrado desenvolveu trabalhos com transplantes gonadais.

À Deus que sempre me guia e me
abençoa e a todos que amo
incondicionalmente pelo apoio e
carinho.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS** por sempre ter me dado sabedoria e coragem para ir em busca da realização dos meus sonhos e a força que me impulsiona a nunca desistir.

Aos meus pais **MARILENE GUILHERME ALMEIDA** e **FRANCISCO PEDRO DO CARMO** pela educação e caráter a mim ensinados, e, apesar das situações difíceis que a vida nos coloca, o amor dedicado a mim.

Aos meus avós maternos **ANÁLIA ALMEIDA** e **ANTÔNIO GUILHERME** (*in memoriam*) por serem meus maiores exemplos de dignidade e honestidade e por terem me acolhido com tanto amor em um momento tão difícil da minha vida.

Ao meu namorado, amigo, companheiro, colega, irmão, pai, meu noivo “multifuncional” **CARLOS HENRIQUE COUTINHO MOURA** por todos os momentos maravilhosos que você tem me proporcionado ao longo desses seis anos juntos. Por mais que em algum momento a distância venha a nos separar, estaremos sempre juntos na mente e no coração.

Aos meus irmãos **FRANCISCA NADJA ALMEIDA DO CARMO** e **FRANCISCO PEDRO DO CARMO FILHO** pelo carinho e apoio.

À meus tios **FRANCISCA GUILHERME ALMEIDA** e **SÉRGIO ANTÔNIO CAVALCANTE SALES** por cuidarem de mim como uma filha.

À todos os meus familiares pela força e incentivo a sempre lutar para conquistar os nossos sonhos.

À **FRANCISCA ELIDE COUTINHO** e **IZA GOMES COUTINHO DE MACEDO** (*in memoriam*) pelo amor e carinho oferecidos e por me acolherem como parte da família.

Ao meu orientador **MARCELO BARBOSA BEZERRA**, pela oportunidade e confiança depositada.

À **MICHELLY FERNANDES DE MACEDO**, por todos os ensinamentos transmitidos e o carinho fraterno.

À **FERNANDA ARAUJO DOS SANTOS** por estar comigo em todos os momentos desta importante etapa da minha vida, por sempre me escutar e me estimular. Agradeço por sua imensa amizade.

À **GABRIELA HEMYLIN FERREIRA MOURA** por toda alegria, confiança e amizade a mim transmitida.

À **VALESCA BARRETO LUZ** que não foi apenas um anjo que Deus colocou em minha vida para me ajudar, mas como uma verdadeira luz que me guiou muito no final do experimento.

À **MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL** por ter devolvido a esperança de que tudo daria certo durante o processamento histológico com a sua habilidade e praticidade.

Aos **ESTAGIÁRIOS** do **LABORATÓRIO DE TRANSPLANTES GONADAIS E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES** pelo apoio e amizade e por colaborarem na realização deste trabalho.

Aos meus amigos **PRISCILA ELAINE DE FREITAS SANTOS, CARLOS EDUARDO VIEIRA DIAS, JOELMA MARTINS PEREIRA DE LIMA** e **ÉRIKA ALMEIDA**, pelos bons conselhos e ótimos momentos de descontração que me proporcionaram.

Ao professor e grande amigo **CARLOS IBERÊ ALVES FREITAS** pelos momentos de descontração

Aos professores do departamento de Ciências Animais, em especial a **RAIMUNDO ALVES BARRETO JÚNIOR, ALEXANDRO IRIS LEITE** e **JEAN BERG ALVES DA SILVA**.

Ao Professor Dr. **JOSÉ DOMINGUES FONTENELE NETO**, por disponibilização do laboratório de histologia.

À **RAONY** e **SÉRVULO**, pelo apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO** e a todos os **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL** pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. **CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA** por gentilmente aceitar o convite para integrar a banca desta dissertação.

À instituição financiadora **CAPES**, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original”.*

(Albert Einstein)

VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS AUTOTRANSPLANTADOS PARA O RIM DE CAMUNDONGAS BALB-C

CARMO, N. A. Viabilidade de folículos ovarianos autotransplantados para o rim de camundongas balb-c. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2013

RESUMO - Ao nascerem, os animais domésticos apresentam uma grande reserva de oócitos dos quais apenas um número mínimo atinge a maturação meiótica. Estes oócitos contidos em folículos pré-antrais são utilizados para o desenvolvimento de estudos com o intuito tanto de esclarecer questões relacionadas à ativação e crescimento de folículos primordiais quanto promover o desenvolvimento de novos métodos de contracepção e novas técnicas de recuperação da fertilidade através do seu cultivo. Dentre os tipos de cultivo ovariano destaca-se o *in vivo*, também conhecido por transplante, tem como principais objetivos promover o retorno da fertilidade em mulheres submetidas a tratamento gonadotóxico e a preservação da diversidade genética de animais ameaçados de extinção. Neste sentido, as pesquisas com o com cultivo *in vivo*, almejam determinar qual metodologia mostra-se mais viável e permite uma melhor manutenção e desenvolvimento do tecido transplantado. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade dos folículos ovarianos após o autotransplante sob a cápsula renal de camundongas. Para isso, foram utilizadas 10 camundongas (*Mus musculus*), divididas em dois grupos, Grupo 1: remoção dos transplantes após 15 dias a partir da inserção do fragmento, grupo 2: após 30 dias. Ainda foi estabelecido o grupo controle que corresponde a fragmentos corticais removidos do ovário destinados diretamente para o processamento histológico. Através da avaliação por microscopia ótica, observou-se que houve uma redução no número de folículos morfolologicamente normais com a progressão do tempo de duração dos transplantes de 15 para 30 dias. Com relação ao número folículos pré-antrais normais apenas o grupo 2 não diferiu estatisticamente do controle. Os folículos antrais normais dos grupos 1 e 2 não diferiram entre si mas apresentaram-se significativamente inferiores ao grupo controle. Quanto à avaliação da ocorrência de apoptose, obteve-se uma maior reação à Caspase-3 em folículos antrais nos três grupos. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o autotransplante subcapsular renal demonstrou ser uma técnica satisfatória para manutenção e estudo de foliculos pré-antrais.

Palavras-Chave: Autotransplante, ovário, cápsula renal, caspase, atresia.

FEASIBILITY OF OVARIAN FOLLICLES SELF-TRANSPLANTED ON KIDNEY OF BALB-C MICE

Carmo, N. A. Feasibility of ovarian follicles self-transplanted on kidney of bald-c mice. In 2013. 58 p. Dissertation (Master in Animal Science: Animal Health) - Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA)

ABSTRAT: At birth , domestic animals exhibit a large stock of oocytes which only a minimum reaches meiotic maturation. These oocytes contained in primordial follicles are used for the development of studies in order to clarify issues related to the activation of primordial follicles and growth as well as promote the development of new contraceptive methods and new techniques for the recovery of fertility through its cultivation. Among the ovarian culture stands out in vivo , also known as transplantation, has as main objectives to promote the return of fertility in women undergoing treatment gonadotoxic and the preservation of genetic diversity of endangered animals. In this sense the research with the in vivo culture aims to determine which methodology seems more feasible and allows better maintenance and development of the transplanted tissue. Thus , this study aimed to assess the quality of ovarian follicles after transplantation under the kidney capsule of mice. For this, we used 10 female mice (*Mus musculus*) , divided into two groups , Group 1 : transplants removed after 15 days from the insertion of the fragment , group 2 after 30 days. It has been established the control group which are the ovarian cortical fragments removed directly for histological processing. Through evaluation by light microscopy , it was observed that there was a progressive reduction in the number of morphological normal follicles with progression of duration to 15 for 30 days of transplants. Regarding the number of normal preantral, only group 2 did not differ statistically from the control. The normal antral follicles in groups 1 and 2 did not differ but were significantly lower than the control group. Regarding the evaluation of apoptotic, we obtained a higher reaction to Caspase -3 in antral follicles in the three groups. According to the results obtained in this study, subcapsular renal autotransplantation technique has proved satisfactory for maintenance and study of preantral follicles.

Keywords: Autograft, ovarian, renal capsule, caspase

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µm	Micrômetros
15d	15 dias após o transplante
30d	30 dias após o transplante
Atg	Gene autofágico
Bcl-2	Proteínas reguladoras da morte celular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina
Dac	Dias após o coito
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNases	Desoxirribonuclease
g	Gramas
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Histologia clássica
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imunoistoquímica
Lamp	Glicoproteína de membrana associada Lisossoma
LC3	Proteínas associada aos microtúbulos
LH	Hormônio luteinizante
MCA	Membrana Corioalantóide
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
min	Minutos
ml	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
nº	Número

°C	Grau Celsius
$p < 0.05$	Probabilidade de erro menor do que 5%
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
X	Vezes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores proporcionais e porcentagens de achados macroscópicos de acordo com os critérios estabelecidos.....	47
Tabela 2: Valores totais e porcentagens de folículos de cada grupo.....	48
Tabela 3: Valores totais e porcentagens de folículos pré-antrais normais de cada grupo.....	49
Tabela 4: Valores totais e porcentagem de folículos antrais normais de cada grupo.....	45
Tabela 5: Valores totais de folículos pré-antrais normais e porcentagens de folículos ativados e não ativados.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1 Disposição dos córtices ovarianos logo após o autotransplante para região subcapsular renal.....	44
Figura – 2 Disposição dos córtices ovarianos durante a recuperação dos tecidos em um indivíduo pertencente ao grupo 1 (15 dias).....	46
Figura - 3 Em A: Folículo primário normal; B: Folículo primário atrésico.....	48
Figura - 4 Fotomicrografia de estruturas ovarianas imunorreativas à Caspase-3. Em A e C, setas apontam algumas células da granulosa imunopositivas. B ocorre imunorreação em células do estroma ovariano na borda livre do tecido. D apresenta corpos lúteos reativos a Caspase-3.....	46
Figura – 5 Fotomicrografia de estruturas ovarianas imunorreativas à caspase. A seta branca indica um folículo secundário não imunomarcado para Caspase-3 e com indícios de morte celular (picnose e descontinuidade da membrana oocitária). Na seta preta observa-se um folículo antral com células da granulosa imunomarcadas.....	52

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2.1 Oogênese e foliculogênese.....	19
1.2.2 População folicular ovariana e atresia.....	20
1.2.3 Modelos de estudo da foliculogênese.....	23
1.2.3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	23
1.2.3.2 Cultivo <i>in vivo</i> (Transplante).....	24
1.2.3.3 Cultivo <i>in ovo</i>	26
1.2.4 Técnicas para avaliação da qualidade folicular e oocitária.....	27
1.2.4.1 Histologia Clássica.....	27
1.2.4.5 Imunoistoquímica.....	28
1.3 OBJETIVOS	29
1.3.1 Geral.....	29
1.3.2 Específicos	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
2 CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS AUTOTRANSPLANTADOS PARA A REGIÃO SUBCAPSULAR RENAL DE CAMUNDONGOS BALB-C.....	38
2.1 RESUMO.....	39
2.2 INTRODUÇÃO.....	40
2.3 MATERIAIS E MÉTODO.....	42
2.3.1 Animais.....	42
2.3.2 Determinação dos tratamentos.....	42
2.3.3 Procedimento cirúrgico.....	42
2.3.4 Processamento histológico e contagem de folículos normais e atrésicos.....	44
2.3.5 Imunoistoquímica para microscopia de luz.....	45
2.3.6 Análise estatística.....	45
2.4 RESULTADOS.....	46

2.4.1 Procedimento cirúrgico.....	46
2.4.2 Análise macroscópica.....	46
2.4.3 Análise morfológica folicular.....	47
2.4.4 Distribuição da Caspase-3 nos transplantes.....	50
2.5 DISCUSSÃO.....	53
2.6 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Os animais domésticos assim como os humanos nascem com uma grande reserva de oócitos dos quais apenas um ínfimo número é capaz de atingir a maturação meiótica (GIOMETTI, 2003).

De um milhão de células germinativas presentes no ovário de recém-nascido apenas de 3 a 4 mil permanecerão na puberdade. A maior parte das células germinativas sofrerão atresia com um percentual inferior a 1% que efetivamente alcançará o estágio ovulatório (OKTEM; OKTAY, 2007). Porém, a origem dos eventos que iniciam o crescimento folicular é pouco compreendida (FORTUNE, 1994). Esta reserva é gerada durante a vida fetal, em algumas espécies (ex: primatas e ruminantes), ou durante o período neonatal em outras tais como roedores e coelhos (HIRSHFIELD, 1991; MARION, 1971). No entanto, têm sido crescentes as investigações que apontam para a formação folicular ao longo da vida das espécies, também conhecida como neofoliculogênese (ZOU et al., 2009; WHITE et al., 2012).

Embora a maior parte dos estudos sobre folículos ovarianos sejam realizados com folículos antrais, também existe um segmento que trabalha com folículos pré-antrais com o intuito tanto de esclarecer diversas questões relacionadas à ativação e crescimento dos folículos primordiais até os estádios subsequentes quanto promover o desenvolvimento de novos métodos de contracepção e novas técnicas de recuperação da fertilidade através do cultivo desse tipo de folículo aliado a outras técnicas de criopreservação e/ou transplante de tecido ovariano (CUSHMAN et al., 2002).

Quando essas técnicas são utilizadas com o intuito de recuperação da fertilidade, a criopreservação de tecido ovariano seguida de autotransplante tem-se mostrado a única alternativa em casos de pacientes que precisam imediatamente de quimioterapia ou radioterapia (GOSDEN, et al. 1994; DONNEZ; BASSIL, 2006). A técnica de autotransplante mais utilizada é reimplantar o tecido cortical ovariano dentro da cavidade pélvica (sítio ortotópico) ou heterotopicamente, como por exemplo, na parede abdominal ou subcutâneo, uma vez que o tratamento esteja completo e o paciente esteja livre da doença (DONNEZ et al. 2006). Entretanto, assim como em outras técnicas, os transplantes ovarianos podem

apresentar algumas desvantagens como a possibilidade de rejeição do tecido transplantado e danos causados por falhas na revascularização (WOOD, 1982).

Tendo em vista a importância dos estudos com transplante para preservação da fertilidade, e para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir discorrerá sobre os seguintes tópicos: oogênese e foliculogênese, população folicular ovariana e atresia, modelos de estudo da foliculogênese e técnica de avaliação da qualidade folicular e oocitária.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Oogênese e foliculogênese

A formação dos oócitos é iniciada com a migração das células germinativas primordiais armazenadas no saco vitelínico e colonização da gônada indiferenciada (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Nas gônadas, as células germinativas primordiais multiplicam-se ativamente por mitose e diferenciam-se em oogônias, adquirindo um maior número de organelas intracelulares (ABIR et al., 2006).

Em camundongos, estas células chegam à crista gonadal em torno de 10,5 dias após o coito (dac) e sofrem divisão mitótica até 13,5 dac (MONK; MCLAREN, 1981). Nesta fase em que ocorre a primeira divisão meiótica, o núcleo dos oócitos estaciona na Prófase I e então as oogônias passam a ser classificadas de oócitos primários. Em seguida, uma camada de quatro a oito células somáticas planas, também conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do mesonefro ou epitélio ovariano, circunda os oócitos primários, formando os folículos primordiais, iniciando assim, o processo de foliculogênese (McNATTY et al., 2000; FAIR, 2003).

Os folículos primordiais podem permanecer quiescentes por um tempo indeterminado, ou imediatamente iniciar o seu desenvolvimento. O evento no qual ocorre a transição do folículo primordial para primário é chamado de ativação folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Este processo é caracterizado pelo aumento do diâmetro do oócito em tamanho e conteúdo proteico, mudança na morfologia das células da pré-granulosa de pavimentosa para cúbica, bem como, proliferação das mesmas (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; KNIGHT; GLISTER, 2006). Quando uma camada completa de células da granulosa circunda o oócito, os folículos passam a ser chamados de primários. Com o desenvolvimento do folículo, as células da granulosa aumentam em número e tornam-se mais volumosas (VAN DEN HURK et al., 1997; MOHAMMDPOUR, 2007), culminando com a formação do folículo secundário, o qual é caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas (PICTON et al., 1998).

À medida que o metabolismo folicular aumenta, ocorre a formação de um fluido folicular proveniente das células da granulosa e assim ocorre a formação da cavidade denominada de antro. Este folículo passa então a ser classificado com folículo antral. Existem

dois tipos de folículos antrais: terciários e pré-ovulatórios. O folículo denominado de terciário é composto de várias camadas de células da granulosa, antro em formação, membrana basal delimitando as camadas de células tecaais das células da granulosa e as duas camadas da teca interna e externa (FIGUEIREDO et al., 2008).

A fase final do desenvolvimento folicular é caracterizada pela formação do folículo pré-ovulatório. Este folículo é composto por um oócito circundado por células da granulosa especializadas, denominadas de células do cúmulus. Ocorre uma pausa na multiplicação das células da granulosa em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e inicia-se a fase final de diferenciação. Neste período é notória a formação de uma estrutura denominada de complexo cumulus-oophorus que também é resultante da ação do LH. A formação de folículos pré-ovulatórios acontece, em todas as espécies, durante a puberdade (DRIANCOURT, 2001).

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância, sendo a formação do folículo pré-ovulatório um pré-requisito para a ovulação, este folículo é considerado o estágio final do desenvolvimento folicular, com um oócito secundário no estágio da metáfase da meiose II (HULSHOF et al., 1994). Nesta fase a dimensão folicular apresenta-se facilmente visível macroscopicamente e sofre influência de níveis elevados de LH promovendo assim, a ovulação. Quando o oócito, em metáfase II, é fecundado pelo espermatozóide, seu núcleo passa pelos estádios de anáfase II e telófase II, seguidos pela liberação do segundo corpúsculo polar e pela formação do oócito haplóide fecundado, finalizando assim o processo da oogênese (FIGUEIREDO et al., 2008).

1.2.2 População folicular ovariana e atresia

A população folicular ovariana em animais domésticos está estimada em 35.000 em caprinos (LUCI et al., 1999); 160.000 em ovelha (DRIANCOURT, 1991); 235.000 em vaca (BETTERIDGE et al., 1989); 1.500 folículos em camundongos (SHAW et al., 2000); 114.000 em gatos domésticos (LIMA, 2006); e 2.000.000 em mulheres (ERICKSON, 1986). Dentre estes, é composta, em sua maioria (em torno de 90%), por folículos pré-antrais (SAUMANDE, 1991). Dentro deste grupo, os primordiais apresentam maior porcentagem.

Apesar disso, um grande número de folículos pertencentes a essa classe está sujeita a sofrer atresia, fenômeno este que pode ocorrer em todas as categorias foliculares (FORTUNE, 1994).

A atresia folicular pode ser definida como o processo fisiológico que aparenta exercer um controle seletivo no número de folículos através da perda da quase totalidade dos folículos presentes no ovário (FIGUEIREDO, 1995). Embora seja um fenômeno natural, ocorre uma redução significativa no número de oócitos a serem ovulados, diminuindo assim o número do potencial reprodutivo feminino. Desta forma, é necessário um melhor esclarecimento dos mecanismos de atresia nos folículos ovarianos para minimizar esta grande perda folicular (CELESTINO et al., 2009).

A atresia é um evento comum a todas as espécies domésticas e ocorre naturalmente por duas vias: necrose e apoptose (FIGUEIREDO et al., 2003). Além destas, tem sido descrita a autofagia que é considerada outro mecanismo de morte celular programada, a qual, por meio de um processo catabólico altamente regulado, atua por meio da participação de proteínas autofágicas (beclin-1, Atg, LC3, Lamp). Seus principais mediadores são as catepsinas ou proteínas proteossomais ativas (THOMÉ et al., 2009).

A atresia pela via apoptótica é considerada um processo geneticamente regulado e indispensável para a manutenção do desenvolvimento do tecido e homeostase controlando o número de células através da eliminação daquelas indesejáveis (DEGTEREV; YUAN, 2008). Ela envolve estímulos iniciais nos receptores de superfície celular (receptores de morte), compondo a via extrínseca ou ainda através da mitocôndria, constituindo-se a via intrínseca (JOZA et al., 2002). As principais características relacionadas a apoptose são: a perda do volume celular devido à condensação do citoplasma acompanhada pela picnose nuclear resultante da marginação da cromatina e sua distribuição contra o envelope nuclear (TILLY, 1996).

Vários fatores bioquímicos estão envolvidos na iniciação, execução e regulação da apoptose e a família Caspase desempenha um papel central nesta rede de sinalização (CELESTINO et al., 2009). O processo de ativação extrínseca de apoptose inicia-se através da sinalização de receptores de membrana que quando ativados estimulam a formação do complexo de sinalização indutor de morte (CSIM). Quando ligadas a este complexo, várias moléculas pró-caspase-8 são recrutadas resultando na ativação cruzada pela (auto) proteólise. (CELESTINO et al., 2009). Após a ativação da Caspase-8 que é considerada iniciadora,

ocorre o acionamento da cascata de Caspase. A alta concentração de Caspase-8 tem efeito direto na funcionalidade da Caspase-3. Esta Caspase efetora direciona a sinalização de apoptose para o núcleo onde endonucleases são liberadas e acontece a degradação do DNA (HUSSEIN, 2005).

A família de proteínas Bcl-2 compreende membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e membros pró-apoptóticos, incluindo Bax, Bad, Bok (MARKSTROM et al., 2002). Este grupo de proteínas controlam a integridade mitocondrial e a liberação de citocromo-c dentro do citosol. Embora as principais funções relacionadas com a libertação do citocromo-c da mitocôndria para o citosol não estejam claramente elucidadas (SUZUKI et al., 2000), acredita-se que membros da família Bcl-2 podem inserir no interior da membrana mitocondrial externa formando grandes canais que permitem a passagem de moléculas. O citocromo-c estando presente no citosol desencadeia a formação do apoptosoma mitocondrial que é uma junção de citocromo c, Apaf-1 (Fator de ativação de protease apoptótica) e Caspase-9 (JOZA et al., 2002). Este conjunto promove o recrutamento de pró-caspase-9 que é clivada em sua forma ativa Caspase-9 que por sua vez cliva a Caspase-3 resultando na morte celular.

Independente da via, as Caspases são consideradas as executoras principais da via apoptótica e atuam ativando DNAses, que são endonucleases responsáveis pela fragmentação do DNA internucleossomal. Os mecanismos pelos quais ocorre a atresia variam de acordo com a espécie animal e o estágio de crescimento folicular, ocorrendo sob diversos aspectos morfológicos e bioquímicos. Segundo Camboni et al., (2005), as principais características morfológicas relatadas em folículos atrésicos são: a presença de núcleo picnótico, descontinuidade da lâmina basal, condensação da heterocromatina e do oolema folicular, descontinuação do perfil nuclear, presença de numerosos vacúolos ou gotas lipídicas.

1.2.3 Modelos de estudo da foliculogênese

1.2.3.1 Cultivo *in vitro*

São estudadas três formas básicas de cultivo de tecido ovariano: *in vitro*, *in vivo* (transplante) e *in ovo*. O cultivo *in vitro* tem como principal objetivo promover a ativação e o crescimento dos folículos pré-antrais ou antrais com o intuito de se obter oócitos maduros para a produção *in vitro* de embriões (PIV) através da tentativa de reprodução do ambiente fisiológico do ovário (CHAVES et al., 2010). Esta técnica é realizada de três formas: cultivo de ovário inteiro, de fragmentos corticais ou de folículos isolados (bi ou tridimensional).

Em roedores, um grande número de oócitos meioticamente competentes foi obtido através do sistema de cultivo de folículos pré-antrais onde ocorreu até nascimentos de crias vivas (EPPIG; SCHROEDER, 1989). Segundo Boland et al., (1993), o tempo necessário para o desenvolvimento dos folículos pré-antrais de camundongos cultivados até o estágio de folículo pré-ovulatório é de apenas 6 dias.

Embora tenham ocorridos bons resultados em camundongos, com o nascimento de crias vivas (O'BRIEN et al., 2003), o sistema de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos apresenta algumas limitações quanto ao aporte nutricional e desenvolvimento do tecido. Alguns estudos evidenciaram que o estroma pode exercer um controle inibitório no início do crescimento dos folículos primordiais (WANDJI et al., 1996).

De acordo com Rosseto et al., (2011), o cultivo de folículos *in situ* mantém toda a população celular presente no ovário e configura-se como o tipo de cultivo que oferece uma melhor integridade folicular por manter o contato entre os folículos e as células do estroma ovariano. Isto representa uma vantagem quando comparado à técnica de isolamento folicular.

Embora pesquisas desenvolvidas com este tipo de cultivo mostrem que poucos folículos primários consigam progredir até o estágio secundário este modelo causa uma expressiva ativação folicular (ROSSETO et al, 2011; FORTUNE, 2003). O crescimento de folículos, desde a fase primordial até a produção de folículos ovulatórios contendo oócito maduro e competente utilizando-se o cultivo *in vitro*, apenas foi alcançado em camundongos (SMITZ, et al.,2010).

1.2.3.2 Cultivo *in vivo* (Transplante)

O cultivo *in vivo*, ou transplante, é definido como a transferência por meios cirúrgicos para um indivíduo de partes de tecido ou órgão retirado dele mesmo ou de um doador (MACEDO, 2007). Os transplantes ovarianos podem ser classificados de acordo com a espécie receptora como: auto (mesmo indivíduo), iso (animal geneticamente idêntico), alo (outro ser da mesma espécie) ou xenotransplante (de outra espécie) (ANDRADE et al., 2004; DEMEESTERE et al, 2009). Segundo a sua localização no tecido receptor, os transplantes podem ser classificados em: ortotópicos (próximo à localização anatômica original) ou heterotópicos (distante da localização anatômica original) (KRONH, 1977; DONNEZ et al., 2006).

Os primeiros relatos de transplante ovariano foram realizados pelo pesquisador Paul Bert em Paris no ano de 1863 onde realizou o transplante dos ovários de um coelho para a cavidade abdominal de um animal receptor da mesma espécie, mas ambos não sobreviveram. Após 30 anos desta primeira tentativa, na Áustria, Chrobach orientou seu assistente Emil Knauer a repetir o experimento e observaram que apenas um indivíduo alotransplantado havia sobrevivido. Com base neste resultado positivo, Knauer resolveu testar outra modalidade, os autotransplantes que por sua vez demonstraram uma sobrevivência notavelmente melhor, e pela primeira vez, resultava na recuperação da fertilidade.

Entretanto o primeiro sucesso efetivo de transplante ovariano em humanos foi obtido por Robert Morris em 1895. Objetivando conservar a função ovariana após a realização de histerectomias que eram realizadas com a remoção dos ovários normais, ele realizou um alotransplante ovariano para uma mulher com amenorreia primária obtendo a retomada da menstruação dois meses após o transplante. No entanto, seu caso de maior sucesso ocorreu em 1906 com um alotransplante em mulheres onde a receptora dos tecidos ovarianos conseguiu retomar a fertilidade possibilitando a ocorrência de gestações (GOSDEN, 2008).

A partir da década de 1940, com o advento das pílulas de reposição hormonal, houve uma diminuição das investigações sobre o assunto. Todavia, foi apenas no final do século XX que houve um aumento no interesse por esse procedimento, graças aos conceitos emergentes de endocrinologia e imunologia, que possibilitaram investigação mais apurada com base em transplantes experimentais (PETROIANU et al., 2004).

Em 1960, Parrot demonstrou a recuperação das funções endócrinas e da fertilidade, embora por curto período, através do autotransplante ortotópico de fragmentos ovarianos congelados após incidência de radiação em camundongo, obtendo nascimento de fetos normais. Em 1977, Krohn aplicou, pela primeira vez, a técnica na prática da medicina reprodutiva humana. Esta técnica também foi testada em outras espécies como rato (AUBARD et al., 1998) e ovelha (GOSDEN et al., 1994).

Alguns estudos realizando este tipo de cultivo objetivam a manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer que necessitavam submeter-se a tratamento de quimio ou radioterapia, que são gonadotóxicos. Para isso, partes desses ovários foram criopreservados para que pudessem ser retransplantados ao sítio de origem após o tratamento (DONNEZ et al., 2004). Outra meta almejada por alguns grupos de estudo seria a preservação da diversidade genética de animais ameaçados de extinção através da técnica de xeno ou alotransplante (DEMIRCI et al., 2003).

Com relação ao autotransplante, as principais vantagens estão no retorno rápido e espontâneo da fertilidade que em ovelhas ovariectomizadas, foi de 3 a 6 meses (TURNBULL et al., 1977), normalmente sem a necessidade de hormonioterapia, chances mínimas de rejeição do tecido transplantado não necessitando de terapia imunossupressiva, não havendo relatos de dificuldades na obtenção de folículos maduros bem como não esbarra em questões éticas, como por exemplo, a chance de transmissão de agentes infecciosos e o risco de alteração do genoma do receptor como ocorre no xenotransplante (AUBARD, 1998).

O objetivo do reestabelecimento da fertilidade após autotransplante de tecido ovariano criopreservado foi alcançado em humanos, obtendo-se 14 bebês nascidos vivos, (DONNEZ, et al, 2004; MEIROW et al., 2005; DEMEESTERE, et al., 2007; ANDRESEN et al., 2008). Apesar dos resultados animadores, alguns aspectos ainda limitam a aplicação desta técnica com total sucesso. Um fator fundamental é o dano isquêmico causado durante o tempo necessário para o estabelecimento da revascularização do tecido transplantado para o local implantado. Esta injúria influencia a sobrevivência folicular assim como na viabilidade do tecido transplantado (DEMEESTERE, et al., 2009). Neste sentido, as pesquisas com o cultivo *in vivo*, almejam determinar qual metodologia mostra-se mais viável e permite uma melhor manutenção e desenvolvimento do tecido transplantado (ISRAELY et al., 2003; YANG et al., 2006).

O autotransplante também é utilizado como modelo para o estudo dos primeiros estádios de desenvolvimento folicular, visto que sobre estes estádios existem poucas informações (CAMPBELL et al., 2000), assim como os fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento folicular (COSKUN et al., 1995). Entretanto, devido ao fato de ser impossível presumir com exatidão o início do efeito colateral resultante desse tratamento, algumas linhas de pesquisas sugerem que a ooforectomia e conservação de fragmentos de córtex de ovariano previamente ao período de tratamento poderiam ser a melhor alternativa para esses pacientes.

A escolha do local de implantação do transplante de córtex ovariano está intimamente relacionada com o sucesso da técnica, desenvolvimento dos fragmentos e recuperação das funções ovarianas de acordo com o objetivo almejado. Para cada sítio receptor, algumas questões devem ser levadas em consideração tais como a possibilidade de concepção natural, a facilidade do procedimento, acesso conveniente para a colheita de oócitos e volume de tecido transplantado (DEMEESTERE et al., 2009).

1.2.3.3 Cultivo *in ovo*

Além dos tipos de cultivo *in vivo* já mencionados, existe ainda o modelo de cultivo de tecido ovariano *in ovo* utilizando-se a membrana cório-alantoide (MCA). Este tipo de transplante, que também é considerado um cultivo *in vivo*, é um modelo experimental utilizado experimentalmente como sítio para cultivo de diversos tecidos (BERTOSSO, et al., 1998; HANCOX, 1947) tais como: pele (KUNZI, et al., 1999), fígado (KATOH et al., 2001), para a músculo esquelético (NAKADA et al., 1998), retina (LENG et al., 2004) e testando a resposta tecidual a biomateriais (VALDES et al., 2002; BORGES et al, 2004). Alguns estudos utilizaram-se deste tipo de cultivo para realização de transplante de fragmentos de córtex ovariano obtendo a viabilidade desses tecidos, sem que houvesse, no entanto, a ativação folicular (CUSHMAN et. al., 2002; GIGLI et al., 2005; QURESHI et al., 2008; YUAN et al., 2009; MARTINEZ-MADRID et al., 2009).

1.2.4 Técnicas para avaliação da qualidade folicular e oocitária

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para análise folicular durante os cultivos foliculares *in vitro* e *in vivo*, auxiliando assim no sucesso destes. Dentre elas, podemos destacar aquelas que permitem a avaliação da qualidade folicular, como por exemplo, a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de fluorescência. Além disso, existem ainda as técnicas de biologia molecular que permitem o estudo da expressão de genes que codificam ligantes e/ou receptores de diferentes substâncias importantes para a foliculogênese, dentre estas a imunoistoquímica a qual permite a detecção de antígenos em cortes histológicos contribuindo para uma melhor elucidação desse processo (RAMOS-VARA, 2005). A seguir, serão abordadas brevemente apenas as técnicas empregadas nesse trabalho.

1.2.4.1 Histologia Clássica

Uma importante técnica para avaliação de folículos ovarianos é a histologia clássica. Esta tecnologia permite verificar a morfologia do oócito assim como das células que compõem o folículo e determinar tanto o número destas quanto eventuais mudanças na estrutura celular. Tais alterações incluem a desorganização das células da granulosa e seu destacamento da membrana basal, bem como, a retração oocitária e a picnose nuclear. O processamento histológico pode ser aplicado para avaliação tanto de folículos inclusos no córtex ovariano quanto aos isolados. Os processos que compõe a histologia clássica são: fixação, desidratação, diafanização ou clarificação, infiltração, inclusão, microtomia e coloração das lâminas (MATOS et al, 2007).

Autores como Aerts et al., (2010); Candy et al., (2000); Eimani, et al., (2009); Gunasena et al., (1997) utilizaram semelhantes protocolos de histologia clássica em experimentos de transplantes de tecido ovariano. Nestes estudos, a utilização da coloração hematoxilina-eosina (HE) possibilitou a avaliação da integridade tecidual justificando-se o seu uso para este tipo de cultivo. Martinez-Madrid et al. (2007) relatou em seus resultados na utilização de (HE) ou ácido de Schiff-hematoxilina foram satisfatórios para avaliação da morte celular por necrose por meio da presença de vacúolos.

1.2.4.2 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica (IHQ) se refere ao processo de localizar antígenos, por exemplo, proteínas em células de uma amostra de tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. Marcadores moleculares específicos são característicos de eventos celulares particulares, tais como proliferação ou morte celular (apoptose). IHQ é também amplamente utilizada na pesquisa básica para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas distintamente expressas em diferentes partes de um tecido biológico. A visualização de uma interação antígeno-anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é conjugado a uma enzima como uma peroxidase que pode catalisar uma reação que produzirá coloração, alternativamente, o anticorpo pode ser marcado com fluoróforo como fluoresceína, rodamina, Flúor (RAMOS-VARA, 2005)

As caspases são classificadas como proteases de cisteína que são diretamente envolvidos no processo de apoptose. Basicamente existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras (8, 9, 2 e 10) e a efetoras (3, 6 e 7;). A Caspase-3 é essencialmente necessária para a ativação citoplasmática da DNase, que é responsável pela promoção da clivagem do DNA nos espaços internucleossômicos. Desta maneira esta protease pode ser utilizada como um marcador de apoptose em células da granulosa e oócitos em humanos (GLAMOCLIJIA et al., 2005; HURST et al., 2006) , galinhas (SUNDARESAN et al., 2008), ratos (BOONE; TSANG., 1998) e camundongos (FENWICK; HURST, 2002) , uma vez que é ativada em fases finais da apoptose.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

- Avaliar a qualidade dos folículos ovarianos após o autotransplante sob a cápsula renal de camundongas Balb-c

1.3.2 Específicos

- Averiguar a interação do tecido ovariano transplantado por meio da observação macroscópica.
- Avaliar os folículos morfolologicamente normais e degenerados nas diferentes categorias foliculares.
- Verificar a presença do processo de apoptose nos transplantes pela detecção da Caspases-3 através da técnica de imunoistoquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. *in vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 21, p.887-898. 2006.
- AERTS, J.M. J.; MARTINEZ-MADRID, B.; LEROY, J. 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** v. 94, n. 2, July 2010
- AUBARD, Y.; NEWTON, H.; SCHEFFER, G.; GOSDEN, R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.79 p.83 –87. 1998.
- ANDERSEN, C.Y.; ROSENDAHL, M.; BYSKOV, A.G.; LOFT, A.; OTTOSEN, C.; DUEHOLM, M.; SCHMIDT, K.L.; ANDERSEN, A.N.; ERNST, E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 23 p.2266–2272. 2008.
- ANDRADE, E. R.; SILVA, L. D. M.; MORAES, M. O.; SENEDA, M. M.; TONIOLLI, R. Cultivo in vivo de folículos prÈ-antrais - Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-72. 2004.
- BERTOSSI, M.; VIRGINTINO, D.A.; COLTEY, P.; ERREDE, M.; MANCINI, L.; RONCALI, L. Vascularization of embryonic adrenal gland grafted onto chorioallantoic membrane. **Anatomy of Embryology**, v. 198 p.267–275. 1998.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C. STUBBINGS, R. B., XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal in vitro. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 38, p.87-98, 1989.
- BOLAND N.I.; HUMPHERSON P.G.; LEESE H.J.; GOSDEN R.G.; Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. **Biology of Reproduction**, v.48, p.798-806. 1993.
- BOONE D.L.; TSANG B.K.; Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. **Biology of Reproduction**, v.58, p. 1533-1539. 1998.
- BORGES J.; TEGTMEIER F.T.; PADRON N.T.; MUELLER M.C.; STARK G.B.; Angiogenesis investigations in tissue engineering. The cylinder model on the chorioallantoic membrane. **Chirurg**, v.75 p.284–90. 2004.
- BRISTOL-GOULD S.; WOODRUFF T.K.; Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*) **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13. 2006.

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

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting o cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, p.1300-1304, 2000.

CELESTINO, J.J.H. ; CHAVES, R.N; , MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, J.R.V.; BRUNO, J.B., MAIA-JÚNIOR, J.E. ; FIGUEIREDO, J.R. ; Mechanisms of atresia in ovarian follicles, **Animal. Reproduction.**, v.6, n.4, p.495-508, 2009

CHAVES, R.N.; DUARTE,A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução**, Animal, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49. 2010.

COSKUN, S.; UZUMCU, M.; LIN, Y.C.; FRIEDMAN, C.I.; ALAK, B.M. Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s) **Biology of Reproduction**, v.53, p.670–675. 1995.

CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; FORTUNE, J.E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: A model for studies on the activation of primordial follicles. **Human Reproduction**. v.17, n. 1, p. 48-54. 2002.

DEGTEREV A, YUAN J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol** v. 9 p.378-90. 2008

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIRELA, M.P.; GUERINB, J.F.; FRANCKA, M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, New York, v.60, p.999-1010. 2003.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian Ovarian tissue transplantation **Oncologist**, v.12, p.1437–1442. 2007.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation **Human Reproduction Update**, Vol.15, No.6 p. 649–665, 2009.

DONNEZ,J.; BASSIL,S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. **Human Reproduction Update**, v.4, n.3, p. 248-259. 2006

DONNEZ, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; JADOUL, P.; LANGENDONCKT, A. V.; DEMYLLÉ, D.; DOLMANS, M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation:a review **Human Reproduction Update**, Vol.12, No.5 p. 519–535. 2006.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; LANGENDONCKT, A.V. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue, **Lancet**, v.364, p.1405–1410. 2004.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle **Reproductive fisiology** v. 35. n. 1 , 1991

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

EIMANI, H.; SIADAT, S.F., EFTEKHARI-YAZDI, P., PARIVAR, K., REZAZADE, M., SHAHVERDI, A. Comparative study between intact and non-intact intramuscular autologous mouse ovaries. **Reprod Biomed Online** v.18 p.53–60. 2009

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, p.268-276. 1989.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v. 4, p. 233–254, 1986.

FENWICK, M.A.; HURST, P.R. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. **Reproduction**, v.124, p.659-665. 2002.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Varela, p. 227-260, 2003.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOFF; S. C. J; THIRY, M., VAN DEN HURK, B. 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 p.845-858, 1995

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. et al. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais . In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Editora Roca, p. 303-327. 2008.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216. 2003.

FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals **Biology of reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

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

GIOMETTI, I. C. **Cultivo de folículos pré-antrais**. 2003. 22 p. Monografia Seminários II, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2003.

GIGLI, R.A.; CUSHMAN, C.M.; WAHL, FORTUNE, J.E. Evidence for a Role for Anti-Müllerian Hormone in the Suppression of Follicle Activation in Mouse Ovaries and Bovine Ovarian Cortex Grafted Beneath the Chick Chorioallantoic Membrane **Molecular reproduction and development**, v.71, p.480–488. 2005.

GLAMOCLJIA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v.83, p.426-431. 2005.

GOSDEN, R. G. Ovary and uterus transplantation **Reproduction** v. 136 p.671–680, 2008

GOSDEN, R.G.; BAIRD, D.T.; WADE, J.C.; et.al Restoration of Fertility to oophorectomized sheep by ovarian autograft stored – 196°C. **Human Reproduction**, v.9, p.597-530. 1994.

GUNASENA, K.T.; VILLINES, P. M.; SYMPTOMS; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries **Human Reproduction** v.12 n.1 pp.101–106, 1997

HANCOX, N. M. The survival of transplanted embryo bone grafted to chorioallantoic membrane, and subsequent osteogenesis **Journal of Physiology**, io6, p.279-285. 1947.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p.43-101. 1991.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; ; HURK, R.V.D. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 18 p.78-80, 1994.

HURST, P.R.; MORA, J.M.; FENWICK, M.A. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. **Human Reproduction**, v.21 (Suppl 8), p.1974-1980. 2006.

HUSSEIN M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11 p.162-178. . 2005.

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. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2055-2064, 2003.

JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genetic**, v. 18, n. 3, p. 142-149, 2002.

KATOH, M.; NAKADA, K.; MIYAZAKI, J. Liver regeneration on chicken chorioallantoic membrane. **Cells Tissues Organs**, v.169 p.125–33. 2001.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p.191-206, 2006.

KROHN, P.L. Transplantation of the ovary. In: ZUCKERMAN, L; WEIR, B.J. **The Ovary**, v.2 2. Ed. New York, San Francisco and London: Academic Press, Cap. 3, p. 101-128, 1977.

KUNZI-RAPP, K.; REUCK, A.; KAUFMANN, R. Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. **Archives of Dermatological Research**, v. 5, p.290–291. 1999.

LENG, T.; MILLER, J.M.; BILBAO, K.V.; PALANKER, D.V.; HUIE, P.; BLUMENKRANZ, M.S. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. **Retina**, v.24, p.427–434. 2004.

LIMA, A.K.F.. Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. **Tese** (Universidade Estadual do Ceará) 2006

LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V., GONCALVES, P.B.D., Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.56, p. 39-49. 1999.

MACEDO, M.F. **Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas**. 2007. Dissertação(Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Área de concentração (Cirurgia Veterinária). UNESP Campus de Jaboticabal – SP, Brasil, 2007.

MARION, G.B; GIER, H.T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. **Journal of Animal Science**, v.32(suppl 1), p.24-47. 1971.

MARKSTROM, E.; SVENSSON, E.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction** v.1 p.23:23–30. 2002

MARTINEZ-MADRID, B; CAMBONI, A; DOLMANS, M.M.; NOTTOLA, S.; LANGENDONCKT, A.V.; DONNEZ, J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. **Fertility and Sterility**, v. 87 pp.1153-1165, 2007

MARTINEZ-MADRID, B.; DONNEZ, J.; EYCK, A.V.; VEIGA-LOPEZ, A.; DOLMANS, M.; LANGENDONCKT, A. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue **Fertility and Sterility**, Vol. 91, No. 1, January, 2009.

MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para a avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31,p. 433-442. 2007.

McNATTY, K.P.; FIDLER, A.E; JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p. 11–20. 2000.

MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; HARDAN, I.; FRIDMAN, E.; ZALEL, Y.; SCHIFF, E.; DOR, J.; Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.318-321. 2005.

MOHAMMDPOUR, A.A. Comparative Histomorphological Study of Ovary and Ovarian Follicles in Iranian Lori-Bakhtiari Sheep and native Goat. **Pakistan journal of Biological Sciences**, v.4 n.10, p. 673-675, 2007.

MONK, M.; MCLAREN, A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. **Journal of Embryology and. Experimental Morphology**,v.63, p.75-84. 1981.

NAKADA, K.; YAO, Y.; MASHIMA, J.; KATOH, M.; MIYAZAKI, J.; HIRABAYASHI, T.; Skeletal muscle regeneration induced by chorio-allantoic grafting. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.19, p.169–77. 1998.

O'BRIEN. M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J; A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v.8, p.1682-1686, 2003.

OKTEM; OKTAY, Quantitative Assessment of the Impact of Chemotherapy on Ovarian Follicle Reserve and Stromal Function **Cancer** v.110, n.10, 2007

PETROIANU, A.; ALBERTI, L. R.; VASCONCELLOS, L. S. Histoarquitetura, função endócrina e taxa de gravidez após auto-implante ovariano ortotópico íntegro e fatiado em coelha. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 2, p. 117-123. 2004.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.

QURESHI, A. I.; NUSSEY, S. S.; BANO, G.; MUSONDA, P.; WHITEHEAD, S. A.; MASON, H. D. Testosterone selectively increases primary follicles in ovarian cortex grafted onto embryonic chick membranes: relevance to polycystic ovaries. **Reproduction**, v. 136 p.187–194. 2008.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v.42, p.405–426. 2005.

ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, I. B.; SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.15-23. 2011.

SAUMANDE, J. La Folliculogenèse Chez les Ruminats. **Veterinary Record - British Veterinary Association journals** , v.167, p.205-218. 1991.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, J. M.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SMITZ, J.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J.E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, O.K.; PICTON, H.M.; PLANCHA, C.; SHEA, L.D.; STOUFFE, R.L.; TELFER, E.E.; WOODRUFF, T.K.; ZELINSKI, M.B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Human Reproduction Update**, Vol.16, No.4 p. 395–414. 2010.

SUNDARESAN, N.R; SAXENA, V.K.; SASTRY, K.V.H.; ANISH, D.; MARCUS, L.M.D.; KANTARAJA, C.; SAXENA, M.; AHMED, K.A. Caspase-mediated apoptosis in chicken postovulatory follicle regression. **Veterinary Research Communication** v.32 p.13-19. 2008.

SUZUKI M, YOULE RJ, TJANDRA N.. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. **Cell**, v. 103 p.645-654, 2000

THOMÉ, R. G., SANTOS, H.B., ARANTES, F.P., DOMINGOS, F. F.T., BAZZOLI, N. RIZZO, E. Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary **Autophagy** v.5-1, p.117-119; 2009

TILLY, J.L., Apoptosis and ovarian function, **Reviews of Reproduction** v. 1, p.162–172 (1996)

TURNBULL, K.E.; BRADEN, A.W.H.; MATTNER, P.E. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. **Australian Journal of Biological Sciences**, p. 229–241. 1977.

VALDES, T.I.; KREUTZER. D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, p. 273–82. 2002.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles **Theriogenology** v.47, p.73-82, 1997

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles **Theriogenology** v.63, p.1717–1751, 2005

WHITE Y.A.R.; WOODS D.C.; TAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nature medicine**, in press, 2012.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology Reproduction**, v.55, p.942-948. 1996.

WOOD, C. Ovarian transplantation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 89, n. 8, p. 595-597. 1982.

YANG, H. Y.; COX, S. L.; 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**, v. 131, p. 851-859. 2006.

YUAN, J.H.; GAO, J.S.; ZHAN, Z.F.; LIU, H.W; JIN, W.J. ; LI, Z.D. Development-promoting effect of chicken embryo membrane on chicken ovarian cortical pieces of different age **Poultry Science**, v.88, p.2415–2421. 2009.

ZOU, K.; YUAN, Z.; YANG, Z.; LUO, H.; SUN, K.; ZHOU, L.; XIANG J.; SHI, L.; YU, Q.; ZHANG, Y.; HOUR, WU, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nature Cell Biology**, v. 11, p. 631-636. 2009.

CAPÍTULO 2 - Avaliação de folículos ovarianos autotransplantados para região subcapsular renal de camundongas Balb-c

Evaluation of ovarian follicles autotransplanted for renal subcapsular region from Balb-c mice

Nayara Almeida do Carmo, Fernanda Araújo Santos, Michelly Fernandes de Macedo, José Domingues Fontenele Neto, Raimundo Alves Barreto Júnior, Muriel Magda Lustosa Primentel, Valesca Barreto Luz, Marcelo Barbosa Bezerra.

Artigo submetido ao periódico
Ciência Rural

Avaliação de folículos ovarianos autotransplantados para região subcapsular renal de camundongas Balb-c

2.1 RESUMO

A população folicular ovariana de mamíferos domésticos é composta, em sua maioria, por folículos pré-antrais dos quais um grande número está sujeito a sofrer atresia. Para prevenção da atresia, os sistemas de cultivo são desenvolvidos com o intuito de fornecer condições necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos folículos. Os estudos de cultivo *in vivo* de ovário inteiro ou fragmentos corticais objetivam principalmente a manutenção da fertilidade ocasionada por tratamentos gonadotóxicos e como base para estudos de retardamento da menopausa. Objetivou-se avaliar o desenvolvimento folicular de fragmentos de córtex ovariano sob a cápsula renal de acordo com o tempo de permanência dos transplantes. Para tanto, 10 fêmeas da espécie *Mus musculus* foram subdivididas em Grupo 1: remoção dos transplantes após 15 dias a partir da inserção dos fragmentos, Grupo 2: após 30 dias. O grupo controle foi representado por tecidos não transplantados obtidos imediatamente após a fragmentação do ovário. Os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral e em seguida córtices do ovário esquerdo foram destinados para a inserção sob a cápsula renal. À medida os fragmentos eram recuperados, foram avaliados quanto a presença de folículos antrais ou corpos lúteos. Logo após seguiram para processamento histológico. Para a avaliação de ocorrência de apoptose, os folículos e demais estruturas ovarianas foram classificados em reativos ou não à Caspase-3. Através da avaliação microscópica observou-se que houve uma redução progressiva no número de folículos morfológicamente normais com a progressão do tempo de duração dos transplantes de 15 para 30 dias. Com relação ao percentual dos folículos pré-antrais normais o grupo 1 não diferiu estatisticamente do controle e o grupo 2 foi diferente estatisticamente tanto do grupo 1 quanto do controle. Em relação aos folículos antrais normais, os dois grupos mostraram-se estatisticamente inferiores ao grupo controle. Quanto à avaliação da ocorrência de apoptose, obteve-se uma maior reação à Caspase-3 em folículos antrais nos três grupos. De acordo com os resultados obtidos, o autotransplante subcapsular renal demonstrou ser uma técnica satisfatória para manutenção e estudo de folículos pré-antrais.

Palavras-chave: Ovário, População folicular, Atresia, Autotransplante, Caspase

2.2 INTRODUÇÃO

A maior parte da população folicular ovariana de mamíferos domésticos é composta por folículos pré-antrais (SAUMANDE, 1991) e dentre eles, a maior porcentagem é de primordiais. Apesar disso, um grande número de folículos pertencentes a essa classe sofre um processo natural conhecido como atresia folicular (FORTUNE, 1994). Como principal estratégia para prevenção deste evento, são desenvolvidos diversos sistemas de cultivo com o objetivo de fornecer condições necessárias para o crescimento e desenvolvimento dos folículos *in vivo* até a obtenção de nascimento, ou visando uma grande recuperação folicular para destinar à maturação e fertilização *in vitro* dos mesmos (McCAFFERY et al., 2000). São estudadas três formas básicas de cultivo de tecido ovariano: *in ovo*, *in vitro* e *in vivo*.

O cultivo *in vivo* define-se como o transplante de ovários inteiros ou fragmentos do seu córtex para o mesmo indivíduo (autotransplante) ou outro, que pode ser da mesma espécie (alotransplante) ou de espécies diferentes (xenotransplante). Este tipo de cultivo ainda pode ser realizado entre indivíduos geneticamente idênticos (isotransplante) (DEMEESTERE et al., 2009).

O transplante de ovário objetiva a recuperação das funções ovarianas e diminuição dos efeitos indesejáveis da falência ovariana precoce. Embora existam vários estudos a cerca do assunto, não se chegou a uma conclusão de qual o melhor sítio receptor para implantação do ovário ou fragmentos dele (CORLETA et al., 1998, STIFF et al., 1997; WEISSMAN, et al., 1999).

Alguns estudos realizados utilizando-se deste tipo de cultivo objetivam a manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer que necessitavam submeter-se a tratamento de quimio e/ou radioterapia, que são gonadotóxicos. Anterior ao transplante, partes desses ovários são criopreservados para que possam ser retransplantados ao sítio de origem após o tratamento (DONNEZ et al., 2004). Outro objetivo do cultivo *in vivo* consiste na preservação da diversidade genética de animais ameaçados de extinção através da técnica de xeno ou alotransplante (DEMIRCI et al., 2003).

Com relação ao autotransplante, as principais vantagens estão: no retorno rápido e espontâneo da fertilidade, geralmente não havendo a necessidade de hormonioterapia, e chances mínimas de rejeição do tecido transplantado não necessitando de terapia imunossupressiva. Além disso, não há relatos de dificuldades na obtenção de folículos

maduros e não esbarra em questões éticas, como por exemplo, a chance de transmissão de agentes infecciosos e o risco de alteração do genoma do receptor como ocorre no xenotransplante (AUBARD, 1998).

O reestabelecimento da fertilidade após autotransplante de tecido ovariano criopreservado tem sido alcançado sendo que 14 bebês nascidos vivos são provenientes deste procedimento (SILBER, 2012). Apesar dos resultados animadores, alguns aspectos limitam a aplicação desta técnica com total sucesso, um destes é o dano isquêmico causado durante o tempo necessário para o estabelecimento da revascularização do tecido transplantado no local implantado. Tal injúria influencia a sobrevivência folicular assim como na viabilidade do tecido transplantado (DEMEESTERE, et al., 2009). Neste sentido, as pesquisas com cultivo *in vivo* almejam determinar qual metodologia mostra-se mais viável e permite uma melhor manutenção e desenvolvimento do tecido transplantado (ISRAELY et al., 2003; YANG et al., 2006).

Embora o sítio heterotópico subcutâneo permita um fácil monitoramento e seja mais indicado em casos que a região pélvica não for adequada para transplante, o processo de maturação oocitária parece ocorrer mais lentamente neste tipo de transplante quando comparado ao sítio ortotópico. Desta forma é necessário o desenvolvimento de novos estudos para esclarecer se este atraso na maturação oocitária está relacionado à diminuição do fluxo sanguíneo ou diferenças no ambiente do transplante (SONMEZER; OKTAY; 2010).

A região subcapsular do rim, como sítio receptor, oferece diversas vantagens para a manutenção do tecido transplantado: mesma origem embriológica do trato reprodutivo e o suporte vascular potencial em torno de 20 a 25% do débito cardíaco. (CHRISTIE; BJORLING, 1998). Para este estudo, foi escolhido a região subcapsular renal como sítio receptor dos tecidos ovarianos por este sítio prevenir a extrusão do tecido ovariano para a cavidade abdominal como comprovado por Aerts et al., (2010). Outro motivo para a eleição deste local ainda segundo o mesmo autor foi que o parênquima renal propicia uma melhor vascularização, pois evita o crescente distanciamento do tecido transplantado do suprimento sanguíneo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o estágio de desenvolvimento bem como a sobrevivência folicular alcançado no cultivo *in vivo* de amostras de córtex ovariano de camundongas autotransplantados sob a cápsula renal de acordo com o tempo de permanência do transplante.

2.3 MATERIAIS E MÉTODO

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido sob o número de protocolo 23091.001244/2013-66.

2.3.1 Animais

Foram utilizadas 10 camundongas (*Mus musculus*) da linhagem Balb-C, adultas, pesando entre 20 e 40 gramas. Durante a realização do experimento os animais foram mantidos no Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *in Vitro* de Embriões, pertencente à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Anteriormente ao experimento, os animais foram submetidos à quarentena em seguida mantidos durante todo o experimento em caixas mini-isoladores (20x32x21 cm), livres do contato com outros animais e patógenos, com acesso a água e ração comercial *ad libidum*, sob-regime claro-escuro de 14:10 horas.

2.3.2 Determinação dos tratamentos

Os animais experimentais (n=10) foram subdivididos aleatoriamente em dois grupos compostos por cinco animais cada. Os fragmentos de córtex ovariano transplantados foram recuperados 15 dias (grupo 1) e 30 dias (grupo 2) após a realização dos transplantes.

2.3.3 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi precedido pela preparação dos animais que incluiu a aplicação do anestésico hipnótico (2,2,2 tribromoetanol) AVERTIN[®] na dose de 0,1ml/5g por via intraperitoneal, tricotomia e antissepsia da região abdominal. Durante a intervenção cirúrgica foram analisados a duração do processo e o aspecto morfológico dos fragmentos de tecido ovarianos selecionados para a realização dos transplantes.

Por meio de uma incisão abdominal bilateral, realizou-se a ovariectomia bilateral. Após a ligadura do pedículo, o ovário esquerdo foi imediatamente imerso em solução fisiológica, em seguida, dissecado para remoção da gordura e resquícios da tuba uterina. Enquanto as amostras de córtex estavam sendo preparadas, procedeu-se a remoção do ovário direito e a localização do rim esquerdo.

Após o tracionamento e isolamento do rim esquerdo, para a inserção dos fragmentos, foi feita uma secção na cápsula utilizando pinça de íris denteada. Os tecidos foram inseridos (sem fixação) na região do polo cranial por meio de uma pinça e em seguida o rim foi devolvido a sua posição anatômica. Logo após, foram feitas as suturas das camadas musculares e pele.

Quanto à dissecação dos fragmentos a serem transplantados, oito amostras de córtex foram seccionadas em torno de 1mm^3 dos quais três foram fixadas em Bouin (controle) e destinados imediatamente para processamento histológico e os cinco fragmentos restantes foram cultivados *in vivo* sob cápsula renal esquerda.

Transcorridos 15 (grupo 1) ou 30 dias (grupo 2) após a realização dos transplantes, os animais foram submetidos a anestesia por tribromoetanol e em seguida a eutanásia por deslocamento cervical. Durante a recuperação dos transplantes foi feita a análise macroscópica de algumas características apresentadas pelo tecido transplantado no momento da exposição do rim: fácil localização, ocorrência de migração dos transplantes, presença de neovascularização, pontos hemorrágicos e corpo lúteo e se ocorreu união dos tecidos.

O resgate destes tecidos se deu em bloco junto ao tecido renal subjacente e imediatamente imersos em solução Bouin por 18 horas. Logo após, o material foi imerso em álcool 70% por 72 horas e remetidos para posterior processamento histológico de rotina.

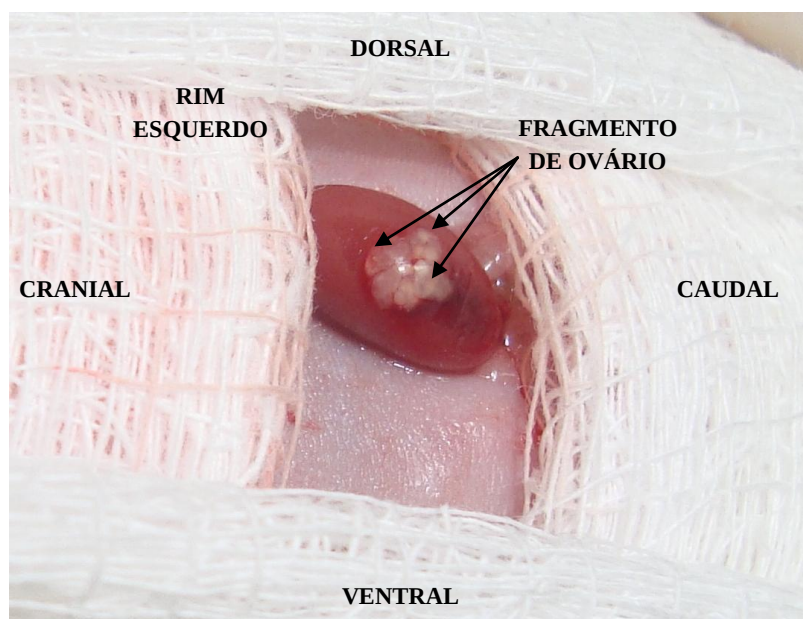


Figura 1: Disposição dos córtices ovarianos logo após o autotransplante para região subcapsular renal

2.3.4 Processamento histológico e contagem de folículos normais e atresícos

Os tecidos transplantados recuperados foram desidratados através de banhos em uma série crescente de etanol (70, 95 e 100%), diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina histológica líquida (56°C). Os blocos foram cortados em um micrótomo (5µm de espessura), distendidos e montados em lâminas de vidro (histologia clássica/HC e poli-l-lisina imunoistoquímica). Para HC as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

Na avaliação da população folicular, utilizou-se microscópio ótico (Olympus BH – 2 CCD Scion) em aumento de 40X para a análise morfológica folicular onde foram contabilizados o número total de folículos em cada amostra de transplante por indivíduo. A classificação se deu em normais e atresícos de acordo com cada categoria (primordial, transição, primário, secundário, antral inicial, antral e pré-ovulatório).

Além disso, nesse estudo avaliou-se a ativação folicular considerando folículos não ativados os que apresentavam uma camada de células ao redor do oócito de formato pavimentoso bem como os que apresentavam algumas células cúbicas ao redor, porém não completando uma camada inteira destas células. Já os folículos ativados ou em

desenvolvimento considerou-se aqueles que possuem a partir de uma camada inteira de células cúbicas ao redor do oócito.

2.3.5 Imunoistoquímica para microscopia de luz

Os cortes foram desparafinizados, hidratados e posteriormente lavados com tampão fosfato salino 0,1M pH 7,4 (PBS). Submetidos então a um processo de recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 0,01 M pH 6,0 a 97°C por 40min. Uma nova lavagem foi realizada com PBS e estes foram incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10% por 30 min com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena. Em seguida, submetidos a três banhos em PBS contendo 0,3% de triton 100 X, e então incubados por 18 h a 4°C na presença do IgG de coelho anti-caspase, na diluição de 1:50 (Caspase-3) em PBS contendo 0,3% de Triton 100 X. Os cortes foram lavados (três banhos de 5 minutos) com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado, anti-IgG de coelho (Sigma Co., St. Louis, MO) na diluição de 1:200 em PBS triton 0,3% por duas horas. E novamente lavados em PBS sendo incubados por uma hora com o complexo estreptoavidina-biotina peroxidase (kit ABC, Vector laboratoties, Burlingame, CA). Em seguida, a peroxidase foi revelada utilizando-se uma solução contendo 0,05% de 3'-3' diaminobenzidina (DAB), 0,009% de H₂O₂ em PBS. As lâminas foram posteriormente montadas cobertas com lamínulas, utilizando-se E-Z-Mount. A análise e documentação do material foram realizadas em um microscópio de luz com aumento de 40 vezes (Olympus BH – 2 CCD Scion) acoplado a uma câmera fotográfica. Os folículos e demais estruturas ovarianas foram classificados em Caspase-3 imunorreativo ou imunonegativo.

2.3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos em valores gerais e porcentagem de folículos normais e atresícos. As comparações entre grupos experimentais de total dos folículos normais, folículos pré-antrais normais, folículos antrais normais e ativação folicular foram feitas pelo teste de qui-quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

2.4 RESULTADOS

Nos procedimentos realizados no decorrer deste experimento não ocorreram alterações nas técnicas empregadas que pudessem comprometer os resultados.

2.4.1 Procedimento cirúrgico

Quanto ao tempo das intervenções cirúrgicas, observou-se uma média de $22,5 \pm 6,02$ minutos. Este período compreendeu a realização das ovariosalpingectomias, fragmentação e seleção dos tecidos a serem transplantados, inserção dos córtices sob a cápsula renal, diérese e sutura dos planos cirúrgicos. Devido à repetibilidade da técnica ocorreu uma diminuição na duração das cirurgias à medida que se aproximava o final do procedimento.

2.4.2 Análise macroscópica

Em todos os indivíduos submetidos ao transplante nos Grupos 1 e 2 os tecidos transplantados foram localizados e removidos com parte do tecido renal adjacente. Não ocorreram alterações nos órgãos adjacentes assim como aderências ou processos inflamatórios. Na figura 3 observa-se um exemplo da disposição dos córtices ovarianos no momento de sua localização.

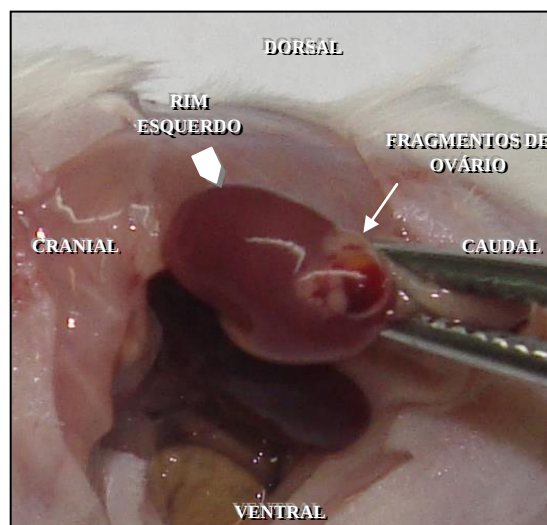


Figura – 2 Disposição dos córtices ovarianos durante a recuperação dos tecidos em um indivíduo pertencente ao grupo 1 (15 dias).

Foram observadas as características macroscópicas relacionadas tanto ao tecido ovariano quanto ao renal de acordo com a figura seguinte: Foram avaliados macroscopicamente os seguintes critérios: fácil localização, migração dos transplantes, presença de neovascularização, presença de pontos hemorrágicos, corpo lúteo e união dos tecidos. Os dados obtidos foram descritos na seguinte tabela:

Tabela 1: Valores proporcionais e porcentagem de achados macroscópicos de acordo com os critérios estabelecidos

Critério	Grupo 1	Grupo 2
Fácil localização	4/5(80%)	2/5(40%)
Migração dos tecidos	1/5 (20%)	3/5(60%)
Presença de neovascularização	2/5(40%)	3/5(60%)
Presença de pontos hemorrágicos	4/5(80%)	2/5(40%)
Presença de corpo lúteo	0/5 (0%)	0/5 (0%)
União dos tecidos	4/5(80%)	3/5(60%)

2.4.3 Análise morfológica folicular

Foram contabilizados 1.100 folículos contidos nos fragmentos dos grupos 1, 2 e controle. A figura 2 mostra um folículo primário normal e um degenerado e a tabela 1 mostra os valores totais e a porcentagem de folículos normais de cada grupo.

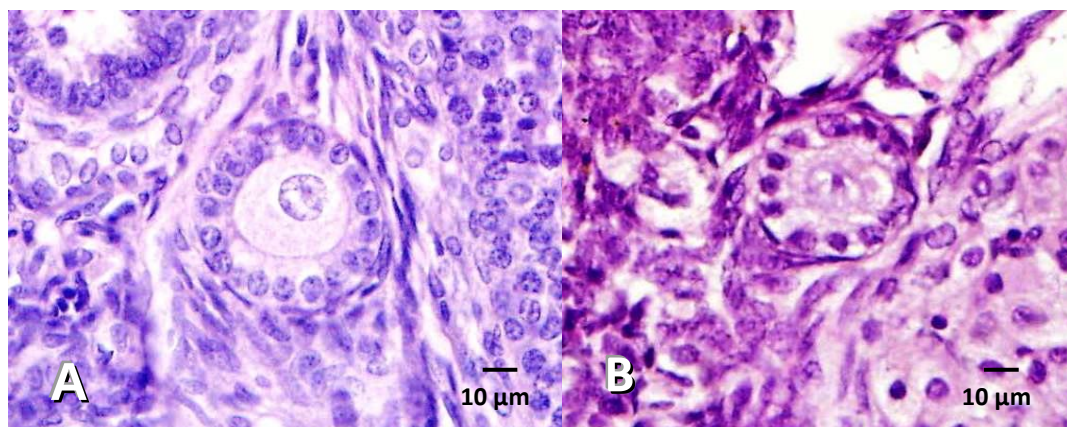


Figura 3: Em A: folículo primário normal; B: Folículo primário atrésico.

Tabela 2: Valores totais e porcentagens de folículos normais de cada grupo

Grupos	Folículos totais (n)	Folículos normais n (%)
Grupo controle	600	510 (85,0) ^A
Grupo 1 (15d)	227	177 (78,0) ^B
Grupo 2 (30d)	273	181 (66,3) ^C

A,B,C: Letras diferentes entre tratamentos (na mesma coluna) indicam valores significativamente diferentes, Qui-quadrado ($p < 0,05$)

De acordo com a tabela 1, observou-se que o grupo controle apresentou uma porcentagem de folículos normais de 85%, havendo uma redução progressiva no número de folículos morfológicamente normais com a progressão do tempo de duração dos transplantes de 15 para 30 dias.

Já a tabela 2 mostra as porcentagens apenas da categoria de folículos pré-antrais normais na qual foi observado que com 15 dias após o transplante (grupo 1) os folículos pré-antrais não diferiram estatisticamente do controle. No entanto, com o prolongamento do tempo de transplante para 30 dias este diferiu estatisticamente tanto do controle quanto do grupo 1.

Tabela 3: Valores totais e porcentagens de folículos pré-antrais normais de cada grupo

Grupos	Total de folículos pré-antrais (n)	Folículos pré-antrais normais n (%)
Grupo controle	563	482 (85,6) ^A
Grupo 1 (15d)	210	170 (81,0) ^A
Grupo 2 (30d)	242	170 (70,2) ^B

A, B: Letras diferentes entre tratamentos (na mesma coluna) indicam valores significativamente diferentes, Qui-quadrado ($p < 0,05$)

A tabela 3 mostra os valores percentuais de folículos antrais normais na qual se observa que ambos os grupos tratados apresentaram-se estatisticamente inferiores ao controle.

Tabela 4: Valores totais e porcentagens de folículos antrais normais de cada grupo

Grupos	Total de folículos antrais (n)	Folículos antrais normais n (%)
Grupo controle	37	28 (75,7) ^A
Grupo 1 (15d)	17	7 (41,2) ^B
Grupo 2 (30d)	31	11 (35,5) ^B

A,B: Letras diferentes entre tratamentos (na mesma coluna) indicam valores significativamente diferentes, Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Quanto à ativação folicular (Tabela 4), apenas os folículos pré-antrais normais foram subdivididos em folículos não ativados e folículos ativados. Nesta, foi observado que após 15 dias houve uma menor ativação folicular quando comparada ao controle, no entanto, os grupos tratados não diferiram entre si.

Tabela 5: Valores totais de folículos pré-antrais normais e porcentagens de folículos ativados e não ativados.

Grupos	Total de folículos pré-antrais normais	Folículos não ativados	Folículos ativados
	(n)	n (%)	n (%)
Grupo controle	482	308 (63,9) ^A	174 (36,1) ^A
Grupo 1 (15d)	170	126 (74,1) ^B	44 (25,9) ^B
Grupo 2 (30d)	170	120 (70,6) ^{AB}	50 (29,4) ^{AB}

A,B: Letras diferentes entre tratamentos (na mesma coluna) indicam valores significativamente diferentes; AB: Apresenta valor significativamente igual ao apresentado por A e por B. Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Com relação à ativação folicular, o maior número de folículos ativados, como já esperado, foi demonstrado pelo grupo controle. Quanto aos grupos tratados, o grupo 1 obteve um número de folículos ativados significativamente inferior ao controle. Já o grupo 2 alcançou melhor desempenho que o grupo 1 com percentual de ativação folicular estatisticamente semelhante ao grupo controle. Os transplantes cultivados por 30 dias mostraram melhores resultados de ativação folicular que o grupo de 15 dias.

2.4.4 Distribuição da Caspase-3 nos transplantes

A imunomarcção para Caspase-3 nas amostras do grupo controle mostrou-se concentrada predominantemente em células da camada granulosa e do estroma ovariano. Não houve reação significativa no oócito dos folículos imunomarcados. A reação observada foi considerada dispersa no citoplasma e pouco significativa no núcleo das células da granulosa. Em alguns cortes, as estruturas presentes na borda do tecido encontravam uma reação bastante intensa. Quanto às categorias dos folículos imunomarcados, não ocorreu em folículos primordiais, de transição ou primário. Poucos folículos secundários mostraram uma imunomarcção significativa. Neste grupo observou-se uma reação predominante em folículos antrais com ênfase nas células da granulosa pertencentes aos folículos antrais iniciais. A atuação da Caspase-3 também foi perceptível em corpos lúteos, mas em uma intensidade inferior ao demonstrado pelos folículos antrais.

Nas amostras pertencentes aos animais do grupo 1, poucos indicativos desta enzima foram observados nos folículos, sendo evidenciada basicamente em folículos antrais e em nenhum pré-antral nem nos oócitos. A positividade foi observada essencialmente em células presentes nas margens livres dos tecidos transplantados e de maneira difusa em algumas células do estroma ovariano. Os corpos lúteos, assim como ocorreu no grupo controle, apresentavam reação positiva, mas de menor intensidade.

A imunomarcção encontrada nas amostras do grupo 2 foi observada mais evidentemente em células da granulosa de folículos antrais e pré-ovulatórios. Não foi notificada a ocorrência de folículos pré-antrais imunomarcados. A coloração expressa foi bastante intensa e concentrada no citoplasma das células da granulosa. Assim como ocorrido no grupo controle e grupo 1, neste grupo não se observou positividade a Caspase-3 no oócito. Os corpos lúteos presentes nas amostras deste grupo não apresentaram imunomarcção.

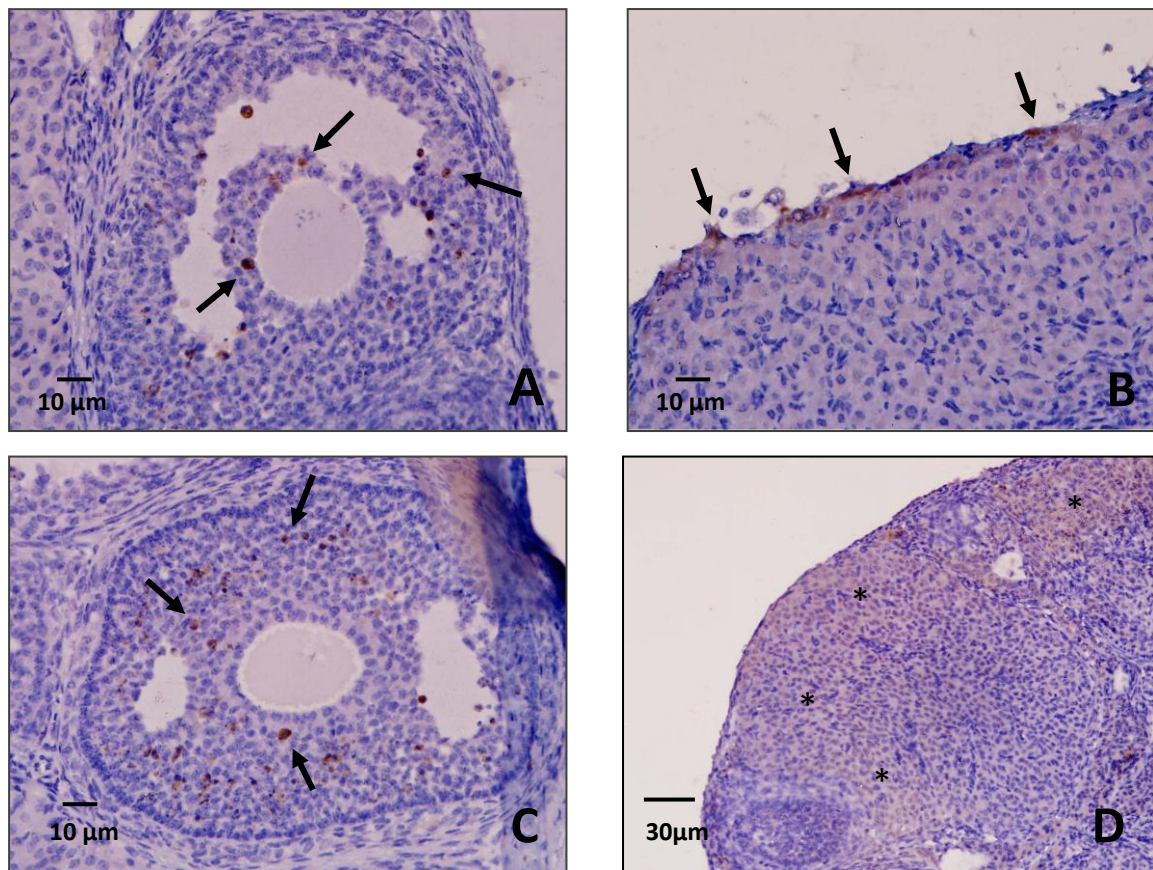


Figura 4: Fotomicrografia de estruturas ovarianas imunorreativas à Caspase-3. Em A e C setas apontam algumas células da granulosa imunopositivas. B ocorre imunorreacção em células do estroma ovariano na borda livre do tecido. D apresenta corpos lúteos reativos a Caspase-3.

Como foi citado anteriormente, os folículos pré-antrais não reagiram imuno positivamente a caspase-3 em nenhum dos grupos, mesmo observando-se outras características que indicam a morte do folículo, como a picnose e a descontinuidade da membrana plasmática oocitária.

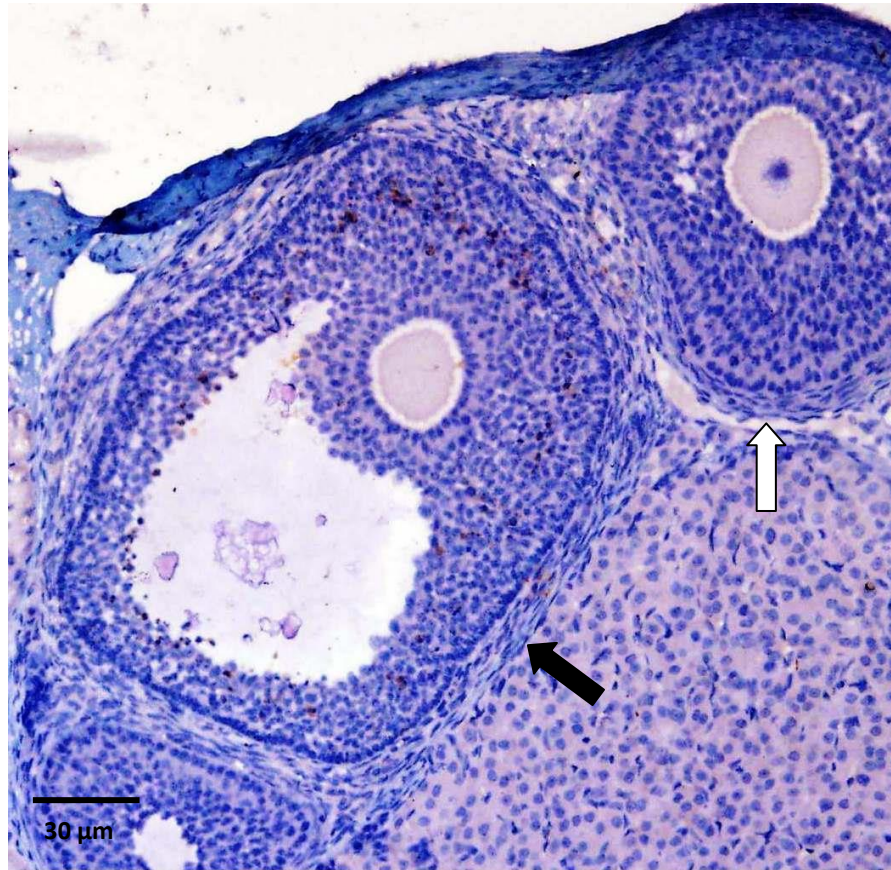


Figura 5: Fotomicrografia de estruturas ovarianas imunorreativas à caspase. A seta branca indica um folículo secundário não imunomarcado para Caspase-3 e com indícios de morte celular (picnose e descontinuidade da membrana oocitária). Na seta preta observa-se um folículo antral com células da granulosa imunomarcadas.

2.5 DISCUSSÃO

Devido a características de pequeno porte, período curto de gestação (19 a 21 dias), fácil manipulação e manutenção o camundongo (*Mus musculus*) foi considerado o ideal para o desenvolvimento deste trabalho (SANTOS, 2002). A técnica de autotransplante ovariano como forma de cultivo *in vivo* de folículos foi eleita para esta pesquisa por sua relevância no que se refere a estudos de ativação folicular e desenvolvimento de técnicas de recuperação de fertilidade e devido aos resultados satisfatórios obtidos em camundongos (GUNASENA et al., 1997; CANDY et al., 2000; LIU et al., 2001; LEE et al., 2005; AERTS et al., 2008).

No presente trabalho, o tempo de intervenção cirúrgica na realização dos transplantes teve uma variação de $22,5 \pm 6,02$ minutos. À medida que ocorria a repetição dos procedimentos, observava-se uma diminuição no tempo de duração das cirurgias. Com isso mais rapidamente ocorreu o reestabelecimento dos animais transplantados contribuindo assim para o sucesso dos transplantes. O resultado de tempo médio assemelha-se aos obtidos por MACEDO (2007).

Na análise macroscópica, foram avaliados alguns aspectos no momento da recuperação dos tecidos. Características como união dos tecidos e presença de vascularização foram observadas nos dois grupos tratados (1 e 2) as quais comprovam a eficácia do crescimento e revascularização nos dois períodos de permanência dos transplantes. Entretanto a ocorrência de migração dos tecidos assim como a dificuldade em localizar os mesmos foi mais evidente nos indivíduos pertencentes ao grupo 2. Este fato diferiu dos dados obtidos por Macedo (2007) que através dos transplantes realizados em ratas após quatro semanas observou-se baixa migração dos tecidos.

Para a avaliação da eficácia dos transplantes no que diz respeito à manutenção da viabilidade dos folículos, a contagem da população folicular total presente nos fragmentos autotransplantados apresentou uma evidente diminuição no número total de folículos normais nos grupos 1 e 2 quando comparado ao controle. Estudos sobre função ovariana após autotransplante comprovam que, embora a ciclicidade seja mantida, ocorre uma redução no número total de folículos e oócitos presentes nos ovários transplantados (WALLACE et al., 1989).

Segundo Baird et al., (1999), a maior perda de oócitos em transplantes ocorre durante o processo de isquemia anterior a revascularização. Em sua pesquisa observou-se uma

sobrevivência de apenas 35% dos folículos dos tecidos transplantados sob a cápsula renal. Neste experimento foram obtidas porcentagens acima de 60% de sobrevivência folicular nos tecidos transplantados dos dois grupos com o melhor resultado alcançado pelos tecidos mantidos por 15 dias (78,0%). Estes percentuais confirmam que o rim é um sítio receptor adequado, pois proporciona suprimento sanguíneo necessário para manutenção do tecido ovariano e folículos nele contidos, sem o comprometimento das suas funções.

No presente trabalho foram obtidos bons resultados de sobrevivência de folículos pré-antrais, observando-se um percentual acima de 70% nos dois grupos de tratamentos. O grupo 1 não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle, o que sugere que após 15 dias há uma manutenção de folículos normais de forma semelhante à fisiologia ovariana. Com base nisso, o grupo 1 apresentou o melhor tempo de manutenção dos tecidos em cultivo *in vivo* considerando a conservação da população folicular pré-antral.

No entanto, a porcentagem de folículos antrais normais dos grupos tratados não apresentou diferença estatística entre si e foram significativamente inferiores ao grupo controle. Apesar de não ter sido administrada nenhuma substância estimuladora aos animais portadores dos transplantes, estes resultados confirmaram diversos estudos onde o desenvolvimento folicular e oócitário (mesmo após a estimulação de gonadotrofina exógena) não foi satisfatório em sítios heterotópicos. Devido a isso ocorreu o baixo índice de sobrevivência de folículos antrais decorrente do seu alto metabolismo e dependência hormonal. Portanto esta é uma técnica inadequada para a recuperação de folículos antrais (CARROLL et al., 1990; SNOW et al., 2002; WATERHOUSE, et al., 2004).

A atresia folicular é mediada por apoptose e é uma parte essencial do mecanismo de seleção folicular tanto quanto o estabelecimento de taxas de ovulação espécie-específica. Embora a ocorrência de atresia tenha sido relatada independentemente da fase de desenvolvimento folicular, diferenças na incidência de atresia foram descritas entre espécies (GLAMOCLJA et al., 2005)

Sabe-se que em animais de grande porte a incidência de atresia folicular é maior durante a fase antral do que em outros estádios de desenvolvimento e este fato está relacionado ao estabelecimento da dominância folicular (FORTUNE, 1994). Em camundongos, porém, a seleção de folículos potencialmente ovulatórios ocorre mais cedo. Como eventos fundamentais no processo de atresia, várias vias apoptóticas são descritas tanto em células da granulosa quanto em oócitos (HUSSEIN, 2005; JOHNSON, 2003). Campos-

Junior et al., (2012) avaliaram a incidência de apoptose através da ativação da Caspase-3 em algumas linhagens de camundongos e obtiveram a incidência de imunopositividade predominantemente em folículos secundários e consideravelmente pouca imunomarcção em folículos antrais.

Neste trabalho as características morfológicas como picnose nuclear das células da granulosa e sinais de degeneração do oócito (como condensação de sua cromatina) foram utilizadas para classificação qualitativa dos folículos em atrésicos conforme estabelecido por Israely et al. (2003). Como resultado qualitativo obteve-se uma maior imunomarcção para Caspase-3 em folículos antrais em relação aos folículos pré-antrais nos três grupos. Isto demonstra que folículos de maior diâmetro e metabolismo são mais susceptíveis a danos apoptóticos.

No grupo controle, embora maior parte dos folículos positivos para Caspase-3 tenham sido antrais, houve folículos secundários positivos. Estes resultados divergem aos mecanismos conhecidos de recrutamento, seleção e dominância folicular que ocorre normalmente em roedores onde a ocorrência de um resgate de folículos secundários e antrais iniciais da atresia por diminuição de gonadotrofinas (GOSDEN, 1989).

O processo de imunoistoquímica realizado no grupo 1 revelou que além de folículos antrais, as células presentes na periferia do fragmento na extremidade oposta ao contato do tecido com o parênquima renal, também são susceptíveis a apoptose. Tal fato pode estar relacionado à deficiência no suprimento vascular do sítio receptor às regiões da margem livre do tecido.

A ocorrência de apoptose no grupo 2 seguiu um padrão semelhante ao grupo 1 com exceção de imunopositividade em corpos lúteos. De acordo com essas informações é possível supor que os grupos de transplantes mostraram padrões de imunomarcção semelhantes atestando que folículos antrais sofrem atresia em maiores proporções em transplantes heterotópicos devido a crescente dependência de gonadotrofinas. Cabe salientar que o maior número de corpos lúteos imunomarcados pode ter ocorrido devido ao tempo cultivo do segundo grupo (30 dias) permitiu um maior número de ciclos. Desta forma, pode-se considerar que o tecido manteve funções fisiológicas de luteólise.

Segundo Johnson; Bridgham (2002), a apoptose em folículos pré-antrais é mediada pela Caspase-2 pois inicia-se no oócito. Já nos antrais, inicia-se a partir da granulosa e é

mediada pela ativação da Caspase-3. Este fato explica a ausência de imunomarcação para Caspase-3 nos folículos primordiais, de transição e primários.

Os folículos de estádios mais avançados de desenvolvimento folicular sofrem maior influência das gonadotrofinas embora existam estudos que atestem que ocorrem alterações consideráveis na população de folículos pré-antrais de camundongas provando que as gonadotrofinas também atuam nos estádios iniciais de desenvolvimento folicular (EDWARDS et al., 1977).

Estudos anteriores a cerca da estimativa de ativação folicular em roedores, devido a padrões de crescimento muito lentos, foi estabelecido que ocorre ativação apenas a partir de folículos primários (HIRSHFIELD, 1989).

Em experimentos de cultivo de córtex ovariano *in vitro* realizados por Fortune et al., (1994), uma quantidade pouco expressiva de folículos fetais bovinos atingiram o estágio secundário de desenvolvimento após 20 dias de cultivo. Estima-se que os folículos requerem maior tempo ou mais provavelmente necessitam de algum fator de crescimento, hormônio específico ou algum aspecto geral do meio não fornecido em cultivo *in vitro*. Portanto, sob esta característica, o cultivo *in vivo* mostra-se mais eficaz.

Com base nos resultados extraídos neste estudo, embora tenha-se obtido sucesso na manutenção de folículos pré-antrais a curto prazo por cultivo *in vivo* abaixo da cápsula renal e uma expressiva ativação folicular, é necessário o desenvolvimento de mais estudos acerca desta técnica com o objetivo de obter uma maior expressão de folículos em estádios finais de desenvolvimento.

2.6 CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos neste trabalho permitiu concluir que:

1. Os tecidos pertencentes ao grupo 1 (15 dias) obtiveram melhor padrão de desenvolvimento macroscópico em relação ao grupo 2 (30 dias).
2. O melhor tempo de cultivo *in vivo* para obtenção de folículos morfolologicamente normais foi de 15 dias.
3. O processo de apoptose se deu principalmente em folículos antrais.
4. A técnica de autotransplante sob a cápsula renal mostrou-se ser uma técnica satisfatória para manutenção e estudo de folículos pré-antrais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J.M.J.; CLERCQ, J.B.P. ; ANDRIES, S.; LEROY, J. L.M.R.; AELST, S. V.; BOLS, P.E.J. Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate. **Freezing Cryobiology** v.57 p.163–169, 2008.

AERTS, J.M. J.; MARTINEZ-MADRID, B.; LEROY, J. 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** v. 94, n. 2, July 2010

AUBARD, Y.; NEWTON, H.; SCHEFFER, G.; GOSDEN, R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** v.79, p. 83 –87, 1998

BAIRD, D. T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; HARKNESS, L. M.; GOSDEN, R. G. Long-Term Ovarian Function in Sheep after Ovariectomy and Transplantation of Autografts Stored at 2196 C **Endocrinology** v. 140, n. 1, 1999.

CAMPOS-JUNIOR, P.H.A.; ASSUNCAO, C. M.; CARVALHO, B. C.; BATISTA, R. I. T. P.; GARCIA, R. M. G.; VIANA, J. H. M. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice. **Reproductive biology** v. 12, n. 1, 2012

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting o cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford, v.15, p.1300-1304, 2000.

CARROLL, 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, p.321–327, 1990

CORLETA, H. E.; CORLETA, O.; CAPP, E.; EDELWEISS, M. I. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 1, p. 16-19, 1998.

CHRISTIE, B. A.; BJORLING, D. E. Rins. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ª edição, v. 2, São Paulo, p. 1698-1713: Manole, 1998.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation **Human Reproduction Update**, Vol.15, No.6, p. 649–665, 2009

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIRELA, M.P.; GUERINB, J.F.; FRANCKA, M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, New York, v.60, p.999-1010, 2003.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B. VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet** v.364, p. 1405–1410. 2004

EDWARDS, R.G.; FOWLER, R.E.; GORE-LANGTON, R.E.; GOSDEN, R.G.; JONES, E.C.; READHEAD, C.; STEPTOE, P.C. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. **Journal of Reproduction Fertility**, v.51, p.237-263, 1977

LEE, C.; XUE, H.; SUTCLIFFE, M.; GOUT, P. W.; HUNTSMAN, D.G.; MILLER, D. M.; C. GILKS, B.; WANG, Y.Z. Establishment of subrenal capsule xenografts of primary human ovarian tumors in SCID mice: potential models. **Gynecologic Oncology** v. 96, p.48–55, 2005

LIU, J.; ELST, J. V. D.; BROECKE, R.V. D.; DHONT, M. Live Offspring by In Vitro Fertilization of Oocytes from Cryopreserved Primordial Mouse Follicles after Sequential In Vivo Transplantation and In Vitro Maturation1 **Biology of Reproduction** v.64, p.171–178 2001

FORTUNE, J.E. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals **Biology of reproduction** v. 50, p. 225-232, 1994

GLAMOCLIIA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility** v.83, p.426-431, 2005

GOSDEN, R. G.; TELFER, E.; FADDY, M. J.; BROOK, D. J. Ovarian cyclicity and follicular recruitment in unilaterally ovariectomized mice. **Journal of reproduction and fertility**. V.87, P. 257-264, 1989.

GUNASENA, K.T., JONATHAN, R.T., LAKEY, PATRICIA, M., VILLINES, ELIZABETH S., CRITSER, CRITSER, J.K. Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue to Athymic. **Mice Biology of Reproduction**, v 57, p. 226-231, 1997.

HIRSHFIELD, A. N. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion **Biology of Reproduction** v.41, p.309-316, 1989

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update** v.11 p.162-178. 2005

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. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2055-2064, 2003

JOHNSON, A.L.; Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science** v.78 p.185-201, 2003

JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T.; Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary **Reproduction** v. 124, pp. 19–27, 2002

MACEDO, M.F. Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas **Dissertação** (Programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária – UNESP, campus Jaboticabal), São Paulo, 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, p. 267-273, 2000

SANTOS BF. Camundongos mutantes mais utilizados. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz p.139-42. , 2002.

SAUMANDE, J. La Folliculogenèse Chez les Ruminats. **Veterinary Record - BVA journals** , v.167, p.205-218, 1991.

SILBER, S.J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. **Molecular Human Reproduction**, v.18, n.2, p. 59–67, 2012

SNOW, M.; COX, S.L.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.; SHAW, J. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. **Science**, v. 297, p.22-27, 2002

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation Best **Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology** v.24 pp.113–126, 2010

STIFF, P. J.; BAYER, R.; KERGER, C.; POTKUL, R. K.; MALHOTRA, D.; PEACE, D. J.; SMITH, D.; FISHER, S. G. High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent / relapsed ovarian cancer: a multivariate analysis of survival for 100 consecutively treated patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, p. 1309-1317, 1997.

WALLACE, W.H.; SHALET, S.M.; HENDRY, J.H.; MORRIS, J. P.H.; GATTAMANENI, H.R. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood; the radiosensitivity of the human oocyte. **British Journal of Radiology** v.62, p.995–998, 1989

WATERHOUSE, T.; COX, S.; SNOW, M.; JENKIN, G.; SHAW, J. Offspring produced from heterotopic ovarian allografts in male and female recipient mice **Reproduction** v.127 p.689-694, 2004

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, p.1462–1467, 1999.

YANG, H. Y.; COX, S. L.; 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**, v. 131, p. 851-859, 2006.