

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA- UFU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA- FAMEV

ELSO DONIZETE DA SILVA JÚNIOR

VIABILIDADE MORFOLÓGICA DE FOLÍCULOS PRÉ ANTRAIS INCLUSOS EM
TECIDO OVARIANO BOVINO APÓS XENOTRANSPLANTE EM CAMUNDONGOS

Uberlândia, MG

2018

ELSO DONIZETE DA SILVA JÚNIOR

VIABILIDADE MORFOLÓGICA DE FOLICULOS PRÉ ANTRAIS INCLUSOS EM
TECIDO OVARIANO BOVINO APÓS XENOTRANSPLANTE EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 e como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel no curso de Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador (a): Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos

Co-Orientador (a): Dra. Kele Amaral Alves

Uberlândia, MG

2018

ELSO DONIZETE DA SILVA JÚNIOR

VIABILIDADE MORFOLÓGICA DE FOLICULOS PRÉ ANTRAIS INCLUSOS EM
TECIDO OVARIANO BOVINO APÓS XENOTRANSPLANTE EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovada como requisito para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2 e obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Área de concentração: Reprodução Animal

Uberlândia, 04 de julho de 2018.

Prof.^a Dr.^a Ricarda Maria dos Santos, UFU/ MG.

Prof. Msc. Juliano Bergamo Ronda, UNIUBE/ MG

Prof.^a Msc.^a Giovanna Faria de Moraes, UFU/ MG

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	pág. 4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	pág. 5
2.1 Folículos pré-antrais e MOIFOPA	pág. 5
2.2 Técnicas de transplante de tecido ovariano	pág. 6
2.3 Avaliação do tecido transplantado	pág. 7
3 METODOLOGIA	pág. 8
3.1 Comitê de ética em experimentação animal	pág. 8
3.2 Desenho experimental	pág. 8
3.3 Coleta de ovários	pág. 8
3.4 Preparo dos materiais	pág. 8
3.5 Xenotransplante	pág. 8
3.6 Análise histológica	pág. 9
3.7 Análise estatística	pág. 10
4 RESULTADOS	pág. 11
5 DISCUSSÃO	pág. 13
6 CONCLUSÃO	pág. 15
REFERÊNCIAS	pág. 16

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o número de pacientes que sobrevivem após o tratamento para o câncer tem aumentado. No entanto sabe-se que esses pacientes podem apresentar função ovariana limitada, uma vez que os métodos utilizados para buscar a cura do câncer, principalmente os quimioterápicos com o uso de agentes alquilantes, são potencialmente tóxicos para a reserva de folículos ovariano, sendo responsáveis por infertilidade em jovens e mulheres (SUZUKI et al., 2015). O transplante de tecido ovariano é uma promissora técnica para preservar a função endócrina e fertilidade de jovens e mulheres adultas antes dos tratamentos quimioterápicos. Cerca de 60 crianças haviam nascido de pacientes que sobreviveram ao câncer e que tiveram a fertilidade restabelecida com o transplante de tecido ovariano (DONNEZ e DOLMANS, 2015).

As pesquisas realizadas com a espécie humana apresentam alguns obstáculos, principalmente do ponto de vista ético e por carência de tecido ovariano para a execução de pesquisas. Sendo assim, a espécie bovina é proposta como modelo experimental para pesquisas em humanos. Os ovários bovinos e humanos apresentam semelhanças morfológicas e fisiológicas, como a duração da foliculogênese e conteúdo de lipídio ovocitário (LEDDA et al., 2001; LEESE, 2012).

A técnica de xenotransplante consiste em fazer o enxerto de um órgão ou tecido oriundo de uma espécie, em um animal de outra espécie diferente daquela em que o fragmento/ tecido foi retirado (BOLS et al., 2010). No entanto, existem ainda variações desta técnica em alguns aspectos, por exemplo, quanto ao local onde os fragmentos devem ser implantados. Na literatura há relatos de implantes na bursa ovariana, capsula renal, peritônio e no subcutâneo.

Após o enxerto, o tecido ovariano passa por desafios para que consiga se manter viável. Os fragmentos ovarianos levam alguns dias para formar novos vasos sanguíneos e receber aporte adequado de oxigênio, causando ao tecido injúrias relacionadas a hipóxia, isquemia tecidual e reperfusão sanguínea, segundo Liu et. al (2002). Essas injúrias levam a perda massiva de folículos e por isso devem ser estudadas formas de minimiza-las e acelerar o processo de neovascularização no tecido transplantado.

Desta forma, o objetivo com este estudo foi avaliar a viabilidade morfológica e o desenvolvimento folicular do tecido ovariano bovino após procedimento de xenotransplante, por sete dias no espaço intraperitoneal de camundongos da linhagem NUDE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Folículos Pré Antrais e Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Pré Antrais (MOIFOPA)

Os folículos ovarianos são formados por células epiteliais que revestem um ovócito e são a unidade básica morfofuncional dos ovários dos mamíferos. Dentro dos folículos o ovócito encontra o ambiente ideal para o seu crescimento e sua maturação, e ainda é o folículo que produz alguns hormônios e peptídeos que controlam funções reprodutivas das fêmeas mamíferas (McGEE HSUEH, 2000; PENG et al., 2010).

Os folículos são classificados de acordo com sua morfologia em pré-antrais e antrais, os primeiros são aqueles que não apresentam antro ou cavidade e os antrais apresentam cavidade. Segundo Hulshof e colaboradores (1994), os folículos pré-antrais são classificados ainda em primordiais, primários e secundários. Os folículos primordiais são caracterizados por uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso e são os que possuem menor diâmetro. Os primários são formados por apenas uma camada de células da granulosa de formato cúbico. Os secundários possuem acima de uma camada de células da granulosa com formato cúbico (HULSHOF et al., 1994). Os folículos antrais são os folículos terciários e folículos pré ovulatórios ou de Graaf.

Nos ovários encontram milhares de folículos pré antrais que são considerados o *pool* de reserva folicular das fêmeas, contudo apenas cerca de 0,1% destes conseguem chegar a ovulação, os demais 99,9% são perdidos através do processo de atresia folicular. Sendo assim o potencial reprodutivo destas fêmeas se tornam muito subutilizados e com os avanços das biotécnicas reprodutivas tornou-se necessário desenvolver técnicas para o melhor aproveitamento deste material (NUTTINK et al., 1993; MARKSTRÖM et al., 2002).

Devem levar em consideração a técnica de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Pré Antrais (MOIFOPA), que propõe técnicas para disponibilizar um grande número de ovócitos oriundos de folículos pré antrais, para diversas biotécnicas reprodutivas, como cultivo e posterior maturação (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV), favorecendo a produção *in vitro* de embriões (PIVE), criopreservação e transplante de tecido ovariano. Segundo Figueiredo e colaboradores, (2008) a MOIFOPA é a conservação, isolamento e/ou cultivo dos folículos pré antrais, com a finalidade de estocar, ativar e promover crescimento e maturação dos folículos do estágio primordial até o pré-ovulatório. Na prática, a MOIFOPA visa na Medicina Veterinária, aumentar a produção de animais de alto valor genético, preservar e

auxiliar na reprodução de espécies ameaçadas de extinção e ainda pode auxiliar bastante no avanço das pesquisas relacionadas à indústria farmacêutica.

2.2 Técnicas de transplante de tecido ovariano

São várias as categorias de transplante disponíveis para órgãos e tecidos inclusive para tecido ovariano. O enxerto ortotópico é aquele transplantado em sua localização anatômica normal, no mesmo indivíduo de onde foi retirado. O enxerto heterotópico consiste do transplante em uma localização diferente daquela onde o tecido seria fisiologicamente encontrado. Alotransplante refere-se ao tecido ou órgão de um animal transplantado em outro da mesma espécie. Xenotransplante é definido como enxerto feito de animais de uma espécie para outra espécie diferente (BOLS et al. 2010).

As técnicas de xenotransplante já relatadas são diferentes entre si quanto a localização onde os enxertos são colocados. Os sítios mais utilizados são o subcutâneo, interior da capsula renal, cavidade da bursa ovariana e no peritônio. Algumas vantagens e desvantagens de cada uma são citadas na literatura. No subcutâneo a facilidade de monitoramento do desenvolvimento folicular e a facilidade cirúrgica para o enxerto se tornam pontos positivos importantes. Já na capsula renal apesar da complexidade cirúrgica ser maior e ocorrer maior dificuldade em monitorar a dinâmica folicular do tecido transplantado, Gosden e seus colaboradores (1994), relataram que neste local a neovascularização é favorecida devido ao maior aporte sanguíneo no local, esta vantagem também é observada na bursa ovariana. O peritônio, apresenta a mesma capacidade de suporte ao tecido enxertado, quando comparado aos outros locais de eleição para esta técnica, ainda dispõe de características como temperatura e pH iguais às que o ovário está fisiologicamente adaptado (DATH et al., 2010). Por estas vantagens, estes locais se tornaram comumente utilizados em pesquisas com transplante de tecido ovariano.

Quando é realizado o enxerto entre espécies diferentes, Bols e colaboradores (2010) alegam que existe possibilidade de rejeição do tecido transplantado e esta técnica só pôde ser colocada em prática com o uso animais geneticamente modificados, que são imunodeficientes. Para isso podem ser usados camundongos pertencem às linhagens NUDE e SCID, os da primeira linhagem são animais que não formam timo e são desprovidos de células T, já os SCID são desprovidos de células T e B (FLANAGAN, 1966; BOSMA et al. 1983).

2.3 Avaliação do tecido transplantado

A avaliação do tecido após o transplante é essencial para obter os resultados da pesquisa, então várias técnicas foram desenvolvidas para diferentes tipos de análises. Histologia clássica, imunohistoquímica e imunofluorescência são muito utilizadas para avaliar tecidos e suas características.

A histologia clássica é essencial para verificar a eficiência do xenotransplante, e deve estar presente em todos estudos, isolada ou acompanhada de outras técnicas. Com a histologia pode-se examinar os folículos pré-antrais de acordo com sua morfologia e classificá-los em normais ou degenerados e ainda quanto ao seu estágio de desenvolvimento, segundo os parâmetros de classificação folicular. Para avaliar a viabilidade morfológica, observa-se ausência ou presença de, coloração e picnose nuclear, organização das células da granulosa e retração citoplasmática do ovócito. Quando pelo menos duas delas estão presentes, pode-se dizer que o folículo está morfológicamente degenerado. Para classificarmos quanto ao estágio de desenvolvimento observa-se tamanho do folículo, morfologia e quantidade de camadas de células da granulosa e presença ou não de cavidade e então classifica-se estes folículos em primordiais, transição, primário, secundário, terciário e pré ovulatório (BEZERRA 2010).

A técnica de imunohistoquímica e imunofluorescência são variações da histologia clássica, no entanto, ao invés de utilizar corantes convencionais utiliza-se anticorpos corados, ou com marcação para anticorpos secundários ligados ao corante. Assim é possível localizar na célula proteínas ou outros antígenos celulares, que são marcadores de diversas atividades celulares, sejam elas a apoptose, multiplicação, regeneração ou funcionalidade do tecido avaliado. A imunohistoquímica e imunofluorescência utilizam o princípio de ligação antígeno anticorpo e o aproveita para utilizar anticorpos como marcadores específicos, que podem identificar de maneira mais segura se aquela célula estava ou não promovendo a atividade que o pesquisador procura e vai além de apenas uma análise da morfologia celular (HERNANDEZ FONSECA et al; 2004; MOUTTHAM et al; 2015).

3 METODOLOGIA

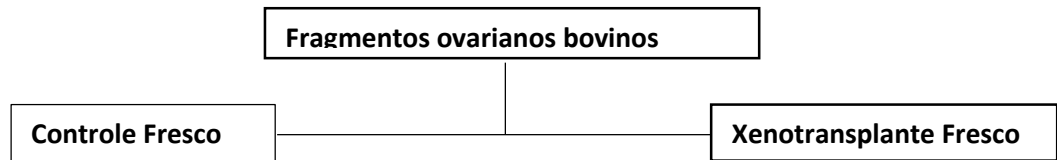
3.1 Comitê de ética em experimentação animal

Este experimento foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, sob protocolo número 006/17.

3.2 Desenho experimental

Os ovários bovinos, após serem coletados foram fragmentados no tamanho de 3 mm x 3 mm x 1 mm e divididos aleatoriamente nos grupos controle fresco e transplante fresco. Cada grupo teve três réplicas e todos foram analisados por histológica clássica.

FIGURA:1 Esquema representativo do desenho experimental do trabalho.



3.3 Coleta de ovários

Os ovários de fêmeas bovinas foram obtidos em frigorífico local. Após a coleta, todos os ovários foram lavados por imersão em álcool 70%, por 10 segundos, em seguida os ovários passaram por lavagem em meio MEM-HEPES, suplementado com 100µg/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina e armazenados posteriormente em tubos contendo meio MEM-HEPES para o transporte, sendo este realizado em caixa isotérmica a temperatura de 4 °C, por até 2 horas. Foram coletados sete pares de ovários, divididos em três réplicas, sendo a primeira com três pares de ovários e as demais com dois pares em cada uma.

3.4 Preparo das amostras

Chegando ao laboratório, os ovários foram divididos ao meio e foi feita a fragmentação do córtex ovariano que originou fragmentos de 3mm x 3mm x 1mm. Os fragmentos do grupo controle foram fixados em paraformaldeído 4% por três horas e logo em seguida fixados em álcool 70% para análise histológica clássica. Os demais fragmentos foram separados em placas de petri contendo meio MEM-HEPES para transporte e imediatamente submetidos ao xenotransplante.

3.5 Xenotransplante

Foram utilizados um total de sete camundongos, fêmeas, NUDE, produzidos no setor de reprodução da Rede de biotérios de roedores da Universidade Federal de Uberlândia, com a idade de seis semanas de vida e peso vivo aproximadamente 20 gramas. Antes do procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados previamente com Xilazina 2% e Quetamina 2% e a dor foi controlada durante o pós-operatório com Tramadol. Em cada animal foi transplantado cinco fragmentos de tecido ovariano, os quais foram fixados junto ao peritônio na cavidade abdominal por fio de sutura Prolene 5/0 não absorvível. Após o transplante dos fragmentos ovarianos, os camundongos ficaram alojados em caixas individuais, em sala com temperatura e iluminação controladas à 22°C e com ciclos de iluminação alternados entre claro e escuro a cada 12 horas respectivamente, os animais ficaram alojados dentro da Rede de biotérios de roedores da Universidade Federal de Uberlândia. A água e o alimento foram ofertados à vontade e previamente esterilizados.

A recuperação dos enxertos foi feita sete dias após o transplante. Os camundongos foram anestesiados com o uso de anestesia geral e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. Os enxertos foram recuperados cirurgicamente e submetidos a fixação em formaldeído 4% por três horas seguido de álcool 70% para posterior análise histológica.

3.6 Análise histológica

Os fragmentos do grupo controle e do grupo xenotransplantado, após recuperação, passaram por processo de fixação em formaldeído 4% por três horas seguido de álcool 70%, para processamento e análise de histologia clássica (HC). Assim que os fragmentos passaram por desidratação em baterias contendo álcool em diferentes concentrações, em seguida foram diafanizados em uma bateria de xilol e seguiu a emblocagem em parafina, logo após serem feitos os blocos com as amostras foram seccionados seriadamente à espessura de sete micrômetros. Todas as secções foram colocadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (HeE).

Depois de prontas, a leitura destas lâminas foi realizada em microscópio óptico ao aumento de 40x, em que, apenas os folículos que apresentaram ovócito com o núcleo evidente na secção observada foram analisados, afim de evitar dupla contagem e análise de folículos

repetidos. Os folículos pré antrais observados, foram classificados em primordiais, transição, primários e secundários de acordo com suas estruturas celulares e de acordo com o tamanho folicular e do ovócito. Esses folículos foram também classificados de forma qualitativa, podendo ser normais ou morfológicamente degenerados, segundo a presença ou ausência de corpos picnóticos, retração citoplasmática e organização das células da granulosa.

O crescimento folicular e sua ativação foram avaliados através da quantificação dos folículos nas diferentes fases de desenvolvimento (primordial, transição, primário e secundário).

3.7 Análise estatística

Todos os dados coletados foram analisados com utilização do programa de análise estatística SigmaPlot (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Os resultados encontrados foram expressos em percentual e os testes utilizados para a análise estatística foram, qui-quadrado e Odds Ratio. Os dados apresentaram comportamento não paramétrico e não apresentaram distribuição normal. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

A porcentagem de folículos ovarianos morfolologicamente normais encontrados no grupo de fragmentos ovarianos submetidos ao xenotransplante foi superior ($P < 0,05$) ao do grupo controle fresco (Tabela 1).

TABELA 1: Porcentagem de folículos morfolologicamente normais nos tratamentos controle fresco e xenotransplante fresco.

Grupo	Folículos normais (%)
Controle fresco	63,8 (424/664) ^A
Xenotransplante fresco	69,9 (519/742) ^B

^{A,B} Na coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre os valores encontrados.

A ativação folicular observada nos folículos dos fragmentos de tecido ovariano de ambos os grupos está demonstrada (Tabela 2). O índice de ativação folicular foi maior ($P < 0,05$) no grupo de xenotransplante fresco, que em consequência apresentou um percentual menor ($P < 0,05$) de folículos primordiais normais.

TABELA 2: Porcentagem de folículos primordiais e ativados morfolologicamente normais nos tratamentos controle fresco e xenotransplante fresco.

Grupo	Ativação Folicular (%)	
	Primordial	Ativado
Controle Fresco	58,7 (249/424) ^A	41,3 (175/424) ^A
Xenotransplante Fresco	45,1 (234/519) ^B	54,9 (285/519) ^B

^{A,B} Na coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre os valores encontrados.

Em relação à distribuição de folículos quanto ao estágio de desenvolvimento, o grupo de fragmentos de tecido ovariano submetidos ao xenotransplante fresco, apresentou porcentagem reduzida ($P < 0,05$) de folículos primordiais normais comparado ao grupo controle fresco. Em contrapartida, a proporção de folículos de transição normais foi superior ($P < 0,05$) no grupo de xenotransplante. Além disso, o percentual de folículos primários normais foi semelhante ($P > 0,05$) entre os grupos analisados. Surpreendentemente, a proporção de folículos

secundários normais do grupo xenotransplante fresco foi superior ($P < 0,05$) a do grupo controle fresco (Tabela 3).

TABELA 3: Distribuição de folículos morfolologicamente normais distribuídos por classe nos tratamentos controle fresco e xenotransplante fresco.

Grupo	Distribuição de folículos normais por classe (%)			
	Primordial	Transição	Primário	Secundário
Controle fresco	58,7 (249/424) ^A	30,6 (130/424) ^A	7,8 (33/424) ^A	2,8 (12/424) ^A
Xenotransplante fresco	45,1 (234/519) ^B	41,2 (214/519) ^B	6,9 (36/519) ^A	6,7 (35/519) ^B

^{A,B} Na coluna indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre os valores encontrados.

A análise de Odds Ratio demonstrou que o grupo de fragmentos de tecido ovariano xenotransplantado apresenta maior probabilidade ($P < 0,05$) de apresentar ativação folicular e folículos morfolologicamente viáveis em comparação ao grupo controle fresco (Tabela 4).

TABELA 4: Análise de Odds Ratio para viabilidade e ativação folicular comparado entre os tratamentos controle fresco e xenotransplante fresco.

Comparação entre tratamentos	Folículos morfolologicamente normais (%)	Folículos ativados (%)	Odds Ratio (I.C 95%)	P-Valor
Xenotransplante fresco	69,9 (519/742)	-----	1,3 (1,0-1,6)	0,0178
Controle fresco	63,8 (424/664)	-----		
Xenotransplante fresco	-----	54,9 (285/519)	1,7 (1,3-2,2)	0,0001
Controle fresco	-----	41,3 (175/424)		

IC: 95% intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

O xenotransplante é uma alternativa promissora como biotecnologia da reprodução, tanto animal como humana. Esta técnica visa preservar a função endócrina e a fertilidade de fêmeas diante de situações que podem limitar estas funções. Neste estudo a viabilidade de folículos inclusos em tecido ovariano xenotransplantado foi preservada com percentual superior ao grupo controle. Esse resultado pode ser explicado devido a alta variabilidade e heterogeneidade existente entre fragmentos ovarianos de um mesmo animal. Esta heterogeneidade foi previamente reportada (ALVES. et al, 2015) em fragmentos de tecido ovariano equino. Adicionalmente o xenotransplante por 7 dias beneficiou a viabilidade folicular e corroboram com os resultados de um estudo reportado por Senbon e seus colaboradores (2003), com xenotransplante de tecido ovariano sob a capsula renal de camundongos SCID.

O procedimento de xenotransplante de tecido ovariano durante sete dias estimulou uma ativação folicular moderada. Provavelmente, a retirada do ambiente ovariano leva a ausência de fatores inibidores do processo de ativação folicular e pode estimular os mecanismos de ativação folicular. No entanto, o fato de ter ocorrido uma ativação controlada sugere que o xenotransplante propiciou um ambiente viável para manutenção da reserva de folículos primordiais. A ativação folicular e “burn out” intenso de folículos observada no trabalho de Gavish e colaboradores (2014), com diferentes espessuras de enxertos transplantados no subcutâneo de camundongos, foi atribuída por eles ao fato de que a manipulação mecânica e a isquemia pós transplante resultam na queda dos níveis de fatores inibidores da ativação folicular, como por exemplo o hormônio anti-mulleriano. Fisiologicamente, a ativação folicular se dá através da estimulação da via PI3K/AKT e a manutenção dos folículos em seu estágio primordial se dá através da inibição da ativação pelo hormônio anti-mulleriano (VISSEL, J. A. 2006), dentre vários outros fatores.

A distribuição folicular observada após o xenotransplante demonstrou a eficiência da preservação de folículos em todos os estágios de desenvolvimento. O ambiente no qual os fragmentos ovarianos foram implantados disponibilizou condições suficientes para a manutenção da viabilidade folicular inclusive daqueles em estágios mais avançados. Folículos em estágio avançado de desenvolvimento como os secundários apresentam consumo de oxigênio maior que folículos primordiais e primários, sendo que há um incremento na taxa de consumo de oxigênio à medida que o folículo se desenvolve (ISHIKAWA et al. 2014). Esse fato indica que a medida que o desenvolvimento folicular ocorre, há um aumento na sua taxa

metabólica tornando-o mais sensível às injúrias causadas pela hipóxia e pela isquemia e reperfusão associadas ao xenotransplante.

Os fragmentos submetidos ao xenotransplante demonstraram chances 1,3 e 1,7 vezes maiores de apresentar manutenção da viabilidade e ativação folicular respectivamente. Essa análise confirma que os resultados deste estudo poderiam ser observados mesmo utilizando diferentes tamanhos amostrais. Essa análise demonstra a força da associação entre a técnica aplicada e o resultado obtido e foi previamente utilizada e reportada como eficaz para esta finalidade (ROCHA et al. 2018).

CONCLUSÃO

A técnica xenotransplante apresenta bons resultados na manutenção da viabilidade de folículos pré antrais inclusos em tecido ovariano bovino, e ainda fornece suporte ao crescimento de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, K. A. et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

BEZERRA, M. B. Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante. 2010. 63f. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)– Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

BOLS, P. E. J.; AERTS, J. M. J.; LANGBEEN, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; LEROY, J. L. M. R. Xenotransplantation in Immunodeficient Mice to Study Ovarian Follicular Development in Domestic Animals. **Theriogenology**, v. 73, n. 6, p. 740–747, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.002>>.

BOSMA GC, CUSTER RP, BOSMA MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature** 1983; 301:527–30.

DATH, C.; VAN EYCK, A. S.; DOLMANS, M. M.; ROMEU, L.; DELLE VIGNE, L.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Xenotransplantation of Human Ovarian Tissue to Nude Mice: Comparison between Four Grafting Sites. **Human Reproduction**, v. 25, n. 7, p. 1734–1743, 2010.

DONNEZ, J. & DOLMANS, M. M. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **J Assist Reprod Genet** 32, 1167–1170 (2015).

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – MOIFOPA. 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.

FLANAGAN SP. ‘Nude’ a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. **Genet Res** 1966; 8:295–309.

GAVISH, Zohar et al. Follicle activation and ‘burn-out’ contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. **Human reproduction**, v. 29, n. 5, p. 989-996, 2014.

GOSDEN RG, BOULTON MI, GRANT K, WEBB R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of Reproduction and Fertility** 1994; 101:619–23.

HERNANDEZ-FONSECA, H.; BOSCH, P.; SIRISATHIEN, S.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKETT, B. G. Effect of Site of Transplantation on Follicular Development of Human Ovarian Tissue Transplanted into Intact or Castrated Immunodeficient Mice. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. SUPPL. 1, p. 888–892, 2004.

HULSHOF SCJ, FIGUEIREDO JR, BEKERS JF, BEVERS MM, VAN DEN HURK R. Isolation and Characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Vet Quart**, v.2, n.16, p.78-80, 1994.

ISHIKAWA, Takayuki et al. Oxygen consumption rate of early pre-antral follicles from vitrified human ovarian cortical tissue. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 6, p. 460-467, 2014.

LEDDA, S.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1359-1371, 2001.

LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v. 143, n.4, p. 417-427, 2012.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECKE, R.; DHONT, M. Early Massive Follicle Loss and Apoptosis in Heterotopically Grafted Newborn Mouse Ovaries. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 3, p. 605–11, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870111>>.

MARKSTRÖM E, SVENSSON EC, SHAO R, SVANBERG B, BILLIG H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23-30, 2002.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 200-214, 2000.

MOUTTHAM, L.; FORTUNE, J. E.; COMIZZOLI, P. Damage to Fetal Bovine Ovarian Tissue Caused by Cryoprotectant Exposure and Vitrification Is Mitigated during Tissue Culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 8, p. 1239–1250, 2015.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. Characterization of invitro growth of bovine preantral ovarian follicles - a preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993

PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO, Z. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p. 247-257, 2010.

ROCHA, Carina Diniz et al. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, v. 114, p. 244-251, 2018.

SENBON, Shoichiro et al. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v. 11, n. 2, p. 139-149, 2003.

SUZUKI N.; YOSHIOKA N.; TAKAE S.; SUGISHITA Y.; TAMURA M.; HASHIMOTO S.; MORIMOTO Y.; KAWAMURA K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human reproduction**, v. 30, p. 608-615, 2015.

VISSER, Jenny A. et al. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. **Reproduction**, v. 131, n. 1, p. 1-9, 2006.

