

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL DE TECIDO OVARIANO BOVINO
ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA**

Ana Beatriz Almeida de Moraes

Biotechnologista

Uberlândia – MG

2019

ANA BEATRIZ ALMEIDA DE MORAES

**CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL DE TECIDO OVARIANO BOVINO
ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA
MAGNÉTICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva)

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Decaria de Salles Rossi

Co-Orientadora: Dra. Kele Amaral Alves

Uberlândia – MG

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/017/2019				
Data:	30 de agosto de 2019	Hora de início:	10:00	Hora de encerramento:	11:50
Matrícula do Discente:	11712MEV003				
Nome do Discente:	ANA BEATRIZ ALMEIDA DE MORAES				
Título do Trabalho:	CULTIVO <i>IN VITRO</i> TRIDIMENSIONAL DE TECIDO OVARIANO BOVINO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	TÉCNICAS LABORATORIAIS E MOLECULARES NA REPRODUÇÃO ANIMAL				

Reuniu-se na sala 54, bloco 2D, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Ricarda Maria dos Santos - UFU; Benner Geraldo Alves - UFG; e Kele Amaral Alves coordenador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Kele Amaral Alves, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/09/2019, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **BENNER GERALDO ALVES, Usuário Externo**, em 03/09/2019, às 14:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kele Amaral Alves, Usuário Externo**, em 04/09/2019, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1517970** e o código CRC **8ABF7A7E**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M827 Moraes, Ana Beatriz Almeida de, 1991-
2019 CULTIVO IN VITRO DE FRAGMENTOS OVARIANOS BOVINOS
ASSOCIANDO NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA
[recurso eletrônico] / Ana Beatriz Almeida de Moraes. - 2019.

Orientador: Rodrigo Otávio Decaria de Salles Rossi.

Coorientadora: Kele Amaral Alves.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2331>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Decaria de Salles Rossi, Rodrigo Otávio, 1983-,
(Orient.). II. Amaral Alves, Kele, 1975-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste”.

Sigmund Freud

Dedico esta dissertação aos meus pais e familiares pelo apoio incondicional, e aos professores e amigos que me acompanharam nessa jornada de aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por tudo em minha vida.

Aos meus pais, José Reinaldo e Maria, pelo apoio incondicional em todos os momentos, sempre tentando aumentar a minha fé com muito carinho e amor, principalmente nos momentos difíceis.

Minha irmã Natália, pela companhia nessa jornada, amizade e compreensão. Minha madrinha Marcia, meu padrinho Marcelo, meu primo Pedro Henrique e Tia Helena, pelo amor e carinho que me apoiam em todos os momentos.

Aos Amigos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, sempre com palavras doces e de incentivo, especialmente Carolina e Dayane.

As amigas Barbara Rodrigues e Gabriela Dalmaso, pelos inúmeros momentos de sorrisos, apoio e incentivo nestes últimos meses.

Aos estudantes, estagiários, técnicos, mestrandos e doutorandos que passaram por mim neste caminho. Um agradecimento especial a Deize Antonino, que com toda sua experiência participou deste projeto com muita responsabilidade e sabedoria, sempre disposta a ensinar.

Graci e Mayara, pela amizade, risadas, e compartilhar seus conhecimentos sobre PIVE comigo neste período. Paula e Amanda, sempre prontas para ajudar em tudo o que precisar.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Rossi pelos ensinamentos e conversas, disponibilidade e conselhos. Minha co-orientadora Dra. Kele, por transmitir seus conhecimentos sempre de forma tranquila e com ideias inovadoras.

Aos professores da Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Dra. Teresinha Assumpção, Dr. José Octávio Jacomini, Dr. Gustavo Guerino e um agradecimento especial a professora Dra. Ricarda Maria dos Santos, que me recebeu de portas abertas em seu laboratório e depois me permitiu a oportunidade de estagiar na universidade Texas A&M, juntamente com prof. PhD Ky Pholer.

A prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa, a técnica Cidinha, e tantos outros pela disponibilidade e incentivo em realizar parte da pesquisa no Laboratório de Reprodução da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

A Coordenação do Programas de Pós graduação em Ciências Veterinárias, a Célia Regina por ser sempre tão solícita.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e apoio financeiro ao projeto (PROAP).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para custear a execução do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Representação esquemática da Foliculogênese e Ovogênese na espécie bovina.....	20
Figura 2:	Ilustração da estrutura e organização do ovário mamífero.....	21
Figura 3:	Diagrama esquemático da cultura tradicional de células monocamadas bidimensionais (2D) (A) sistemas de cultura de células tridimensionais (3D) típicos: esferoides / agregados de células matriz (B), células inseridas dentro da matriz (C), esferoides de células sem estrutura em suspensas (D).....	24
Figura 4:	Representação esquemática do desenvolvimento de modelo de tumor de mama 3D <i>in vitro</i> a partir de uma mistura dispersa de fibroblastos e células de câncer de mama associando nanopartículas e levitação magnética.....	27
Figura 5:	Experimento – Cultivo <i>in vitro</i> de fragmento ovariano bovino associando nanopartículas e levitação magnética.....	34
Figura 6:	Cultivo bidimensional e tridimensional dos fragmentos ovarianos bovinos. (A) Placa Magnética (B) Nanopartículas e diluições (C) Cultivo 2D (D) Cultivo 3D 300 $\mu\text{L/mL}$ (E) Cultivo 3D 400 $\mu\text{L/mL}$	36
Figura 7:	(A) Representação da viabilidade celular em relação ao aumento da concentração de nanopartículas. (B) Representação da ativação folicular em relação ao aumento da concentração de nanopartículas.....	40
Figura 8:	(A) Intensidade de fluorescência (média $\pm$ epm) emitida em tecido ovariano bovino corado pelo iodeto de propídeo em relação a diferentes	

	a concentração de nanopartículas (B) Controle fresco (C) 3D 400 $\mu\text{L}/\text{ml}$ (D) 2D (E) 300 $\mu\text{L}/\text{ml}$, avaliados ao final do cultivo.....	42
Figura 9:	(A) Representação gráfica da emissão de fluorescência média detectada pelo YO-PRO no período de cultivo (B) Controle fresco (C) 2D (D) 3D 400 $\mu\text{L}/\text{ml}$ (E) 300 $\mu\text{L}/\text{ml}$ avaliados ao final do cultivo.....	43
Figura 10:	(A) Representação gráfica da emissão de fluorescência média detectada pelo DCF no período de cultivo D1 com exceção do (B) Controle fresco. (C) 3D 300 $\mu\text{L}/\text{ml}$ (D) 3D 400 $\mu\text{L}/\text{ml}$ (E) 2D.....	44
Figura 11:	Representação gráfica da correlação entre a média de fluorescência detectadas por meio de ROS, DCF e YO-PRO nos fragmentos bovinos.....	45

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Proporção (Média $\pm$ EPM) de folículos viáveis em fragmentos de tecido ovariano bovino submetidos aos diferentes tratamentos.....	38
Tabela 2: Proporção (Média $\pm$ EPM) de folículos ativados em fragmentos de tecido ovariano bovino submetidos aos diferentes métodos de cultivos.....	39
Tabela 3: Análise de correlação para a viabilidade de ativação de folículos ovarianos cultivados em diferentes concentrações de nanopartículas no sistema tridimensional proposto.....	40
Tabela 4: Taxa de degeneração celular medida pelo iodeto de propídeo (P.I) nos fragmentos de tecido ovariano nos diferentes tratamentos.....	41
Tabela 5: Taxa de apoptose celular medida pelo YO-PRO nos fragmentos de tecido ovariano para os diferentes tratamentos.....	42
Tabela 6: Taxa de emissão de ROS medida pelo DCF nos fragmentos de tecido ovariano para os diferentes tratamentos.....	44
Tabela 7: Correlação entre os tratamentos aplicados nos fragmentos de tecido ovariano.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MOIFOPA- Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

α -MEM- Meio de cultivo celular

TCM- 199- Meio de cultivo tecidual

McCoy- Meio de cultivo celular

FSH- Hormônio folículo estimulante

GH- Somatotropina

IGFs- Fatores de crescimento semelhantes à insulina

VGFs- Fator de crescimento vascular endotelial

CO₂- Gás carbônico

O₂- Gás oxigênio

ECM- Matriz extracelular

PEG- Polietilenglicol

PVA- Acetato de Polivinilo

FDA- Food and Drug Administration

3T3-L1- Diferenciação de Adipócito

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

ROS- Espécie reativa de oxigênio

DCF- Diclorofluoresceína

P.I- Iodeto de propídeo

C°- graus Celsius

μ g- Microlitros

mL- Mililitros

TCM 199 HEPES- Meio de Cultivo Tecidual

BSA- Albumina Sérica Bovina

ITS- Insulina, transferrina e selênio

D0- Avaliação Imediata

D1- Avaliação com 24 horas de cultivo

D7- Avaliação com 07 dias de cultivo

CF- Controle Fresco

PAS- Ácido Periódico de Schiff

KL- Receptor kit ligand

sNP- Nanopartículas de Sílica

IGF-1- Fator de Crescimento semelhante a insulina 1

ATP- Adenosina trifosfato

Na⁺- Cloreto de sódio

K⁺- Potássio

ATPase- Enzima catalisadora de adenosina trifosfato

DNA- ácido desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	19
2.2 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO TECIDUAL OVARIANA.....	20
2.3 CULTIVO BIDIMENSIONAL DE TECIDOS E CÉLULAS.....	22
2.4 TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO 3D DE TECIDOS E CÉLULAS ...	23
2.4.1 Matriz de alginato e suas composições.....	24
2.4.2 Matrigel.....	24
2.4.3 PEG.....	25
2.4.4 Nanopartículas	25
2.5 CULTIVO IN VITRO TRIDIMENSIONAL ASSOCIANDO NANOPARTÍCULASE LEVITAÇÃO MAGNÉTICA	26
2.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CULTIVO DE TECIDO	27
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5 HIPÓTESES.....	32
6 MATERIAIS E MÉTODOS	33
6.1 REAGENTES	33
6.2 COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS.....	33

6.3 COLETA DO MATERIAL	33
6.4 DESENHO EXPERIMENTAL	33
6.5 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	34
6.6 CULTIVO IN VITRO BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL	35
6.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
6.8 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	36
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
7 RESULTADOS	38
7.1 AVALIAÇÃO HISTÓLOGICA.....	38
7.2 MICROSCOPIA CONFOCAL.....	41
7.2.1 IODETO DE PROPÍDEO (P.I)	41
7.2.2 YO-PRO	42
7.2.3 DCF.....	43
7.2.4 CORELAÇÃO	44
8 DISCUSSÃO	46
9 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50

CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO BOVINO ASSOCIANDO NANOPARTICULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

RESUMO

O sistema bidimensional (2D) ainda muito utilizado para cultivo de folículos pré antrais e tecido ovariano não pode ser considerado ótimo, pois impede a preservação dos arranjos espaciais das células *in vivo* prejudicando a integridade celular. O uso do sistema de cultivo *in vitro* tridimensional (3D) é uma tentativa de representação do sistema *in vivo*, para recriar o ambiente similar a matriz extracelular do ovário. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos fragmentos de tecidos ovarianos bovinos no cultivo *in vitro* em sistema 3D utilizando nanopartículas (compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina), associadas à levitação magnética em diferentes concentrações. Para isto, foi avaliada a viabilidade celular dos fragmentos, verificando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose, degeneração celular e avaliada a viabilidade celular e ativação folicular. Os ovários foram coletados de frigorífico. Foram realizadas três réplicas, em cada réplica os fragmentos de tamanho 3x3x0,5 mm foram distribuídos nas placas de 24 poços com os seguintes tratamentos: cultivo convencional (2D) , tridimensional (3D) 300µL/mL e tridimensional (3D) 400µL/mL. As análises de confocal e histológicas foram realizadas imediatamente após a coleta (D0), 24 horas após o cultivo (D1) e após o período de sete dias de cultivo (D7). Ao término do cultivo, o grupo 2D apresentou uma viabilidade folicular menor ($P<0,05$) que o controle fresco e que os grupos de cultivo 3D. Além disso, o grupo 3D 400 µL/ml apresentou índices de viabilidade folicular superior ($P<0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo 3D 300 µL/ml. De uma maneira geral, independente do dia de cultivo o grupo 3D 400 µL/ml apresentou a maior ($P<0,05$) proporção de folículos viáveis. A ativação folicular foi maior em todos os grupos de cultivo em relação ao controle e o grupo 3D 400 µL/ml apresentou maior taxa de ativação comparado aos outros grupos. De modo geral, o tratamento de cultivo tridimensional com 400 µL/ml de nanopartículas apresentou a menor ($P<0,05$) taxa de degeneração celular. Ao final do período de cultivo todos os tratamentos apresentaram taxas de apoptose semelhantes entre si ($P>0,05$) e menores que o controle fresco ($P<0,05$). No primeiro dia de cultivo *in vitro* a emissão de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi menor ($P<0,05$) nos grupos de cultivo tridimensional comparado ao controle fresco e ao cultivo bidimensional. No geral, o cultivo tridimensional (3D) apresentou melhores resultados para os parâmetros avaliados neste trabalho quando comparado a metodologia convencional.

Palavras-chave: Cultivo tridimensional, nanopartículas, levitação magnética.

CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO BOVINO ASSOCIANDO NANOPARTICULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

ABSTRACT

The two-dimensional (2D) system still widely used for cultivation of preantral follicles and ovarian tissue cannot be considered optimal because it prevents the preservation of spatial arrangements of cells *in vivo*, impairing cellular integrity. The use of the three-dimensional *in vitro* culture system (3D) is an attempt to represent the *in vivo* system to recreate the environment similar to the extracellular matrix of the ovary. The objective of this work was to evaluate the viability of bovine ovarian tissue fragments in *in vitro* culture in 3D system using nanoparticles composed of gold, iron oxide and poly-L-lysine, associated with magnetic levitation at different concentrations. For this, the cell viability of the fragments was evaluated by checking the production of reactive oxygen species (ROS), apoptosis, cell degeneration and the cell viability and follicular activation. The ovaries were collected from a refrigerator. Three replicates were made, in each replica the 3x3x0.5 mm size fragments were distributed in 24-well plates with the following treatments: conventional (2D), three-dimensional (3D) 300µL / mL and three-dimensional (3D) 400µL/mL. Confocal and histological analyzes were performed immediately after collection (D0), 24 hours after cultivation (D1) and after seven days of cultivation (D7). At the end of cultivation, the 2D group had a lower follicular viability ($P < 0.05$) than the fresh control and the 3D cultivation groups. In addition, the 3D 400 µL / ml group had superior follicular viability indices ($P < 0.05$) compared to the control group and the 300 µL / ml 3D group. In general, regardless of the culture day, the 3D 400 µL / ml group presented the highest ($P < 0.05$) proportion of viable follicles. Follicular activation was higher in all cultivation groups compared to control and the 3D 400 µL / ml group had a higher activation rate compared to the other groups. Overall, the three-dimensional culture treatment with 400 µL / ml nanoparticles showed the lowest ($P < 0.05$) rate of cell degeneration. At the end of the cultivation period all treatments presented similar apoptosis rates ($P > 0.05$) and lower than the fresh control ($P < 0.05$). On the first day of *in vitro* culture, the emission of reactive oxygen species (ROS) was lower ($P < 0.05$) in the three-dimensional culture groups compared to fresh control and two-dimensional culture. In general, three-dimensional (3D) cultivation presented better results for the coverings evaluated in this work when compared to the conventional methodology.

Keywords: Three-dimensional cultivation, nanoparticles, magnetic levitation.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de ativação e crescimento folicular ovariano ainda apresentam mecanismos desconhecidos pela ciência (LIMA et al., 2016). Devido às dificuldades existentes para o uso de tecido ovariano humano (barreiras éticas, baixa disponibilidade), pesquisas recentes têm investigado a estrutura e função do ovário, principalmente a dinâmica folicular, usando o ovário animal como modelo. Espera-se que pesquisas sobre a estrutura do tecido ovariano ajude a esclarecer mecanismos ainda desconhecidos nos processos de interação celular e ativação dos folículos. Neste contexto, ovários bovinos podem ser ótimos modelos para estudo da dinâmica foliculorovariana, pois tem semelhanças importantes com a das mulheres além de impulsionar estudos da reprodução da própria espécie (ARAÚJO et al., 2014).

A biotécnica de reprodução MOIFOPA, que permite a manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais busca resgatar e conservar os folículos pré antrais, é umas das mais importantes formas de estudo da foliculogênese inicial (APOLLONI et al., 2016).

No cultivo de folículos pré antrais, e para a maioria dos trabalhos descritos que utilizam cultivo de tecidos, a metodologia de cultivo convencional bidimensional (2D) ainda é a mais utilizada (BRITO et al., 2014). Este sistema, normalmente utiliza placas e meio de cultivo onde o tecido se deposita no fundo do poço, e por este motivo, não pode ser considerado um sistema ótimo, pois impede a preservação dos arranjos espaciais tridimensionais das células *in vivo*, prejudicando a integridade das células (CHOI et al., 2014).

O uso do sistema de cultivo *in vitro* tridimensional (3D) é uma tentativa de manutenção mais próxima possível do sistema *in vivo*, para recriar o ambiente similar a matriz extracelular do ovário, que pode permitir a modulação do comportamento celular, crescimento, avaliações a resposta e estímulos e a comunicação com células adjacentes (DESAI et al., 2010).

Diferentes metodologias e matrizes estão sendo usadas para o cultivo de células e tecidos no sistema tridimensional a fim de obter melhores resultados. As nanopartículas magnéticas compostas de ouro, óxido de ferro (Fe₃O₂, magnetita) e sequências peptídicas de células adesivas (poli-L-Lisina) foram utilizadas em outros trabalhos de cultivo celular (HAISLER et al., 2013). Estas permitem por meio de uma placa magnética, que propicia a levitação das células, a criação de um modelo de cultivo tridimensional (SOUZA et al., 2010).

Neste contexto, objetivou-se avaliar os benefícios do cultivo tridimensional nos fragmentos de tecido ovariano associando nanopartículas e levitação magnética, comparando ao sistema tradicional quanto ao desenvolvimento e manutenção da viabilidade celular dos folículos contidos em fragmentos de ovário bovino.

Considerando tal importância, a revisão de literatura a seguir pode ajudar no entendimento da execução do projeto e a relevância do estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

O processo de origem e crescimento dos ovócitos nos mamíferos é denominado de ovogênese. Esse desenvolvimento tem três etapas principais: multiplicação, crescimento e maturação. A ovogênese é iniciada junto ao amadurecimento do embrião, nesse período as células germinativas primordiais desenvolverão as ovogônias, que mais tarde darão origem aos ovócitos primários, sendo esse desenvolvimento descontinuado até a fase de púbere do mamífero. O final do processo da ovogênese se dá com quando o ovócito maduro é fertilizado e o corpúsculo polar (segundo) é liberado. Em parâmetros de normalidade, concomitantemente a ovogênese, a foliculogênese é iniciada (FIGUEIREDO et al., 1998).

As etapas de origem, desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos é denominada de foliculogênese. Os folículos ovarianos têm como principal função ofertar um ambiente propício para o desenvolvimento adequado do ovócito. Sua organização advém de um ovócito envolto em uma ou mais camadas de células denominada de células da granulosa. Ainda não estão esclarecidos os mecanismos da ativação dos folículos, e as condições que podem influenciar os processos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação dos mesmos (ARAÚJO et al., 2014b).

Os folículos pré antrais podem ser classificados em folículos primordiais, em transição, primários e secundários. Os folículos antrais são classificados como terciários e pré-ovulatórios, usualmente, distinguidos pelo número de camadas de células da granulosa. O processo de foliculogênese se finaliza com a ovulação de um ovócito maduro (Figura 1). Os folículos ovarianos podem ser classificados morfológicamente como normais ou degenerados, são considerados normais quando apresentam o ovócito e o núcleo preservados e células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas e folículos degenerados quando exibem citoplasma retraído ou desorganizado, com células da granulosa separadas da membrana basal e ovócito com núcleo picnótico (FIGUEIREDO; SILVA; RODRIGUES, 1999).

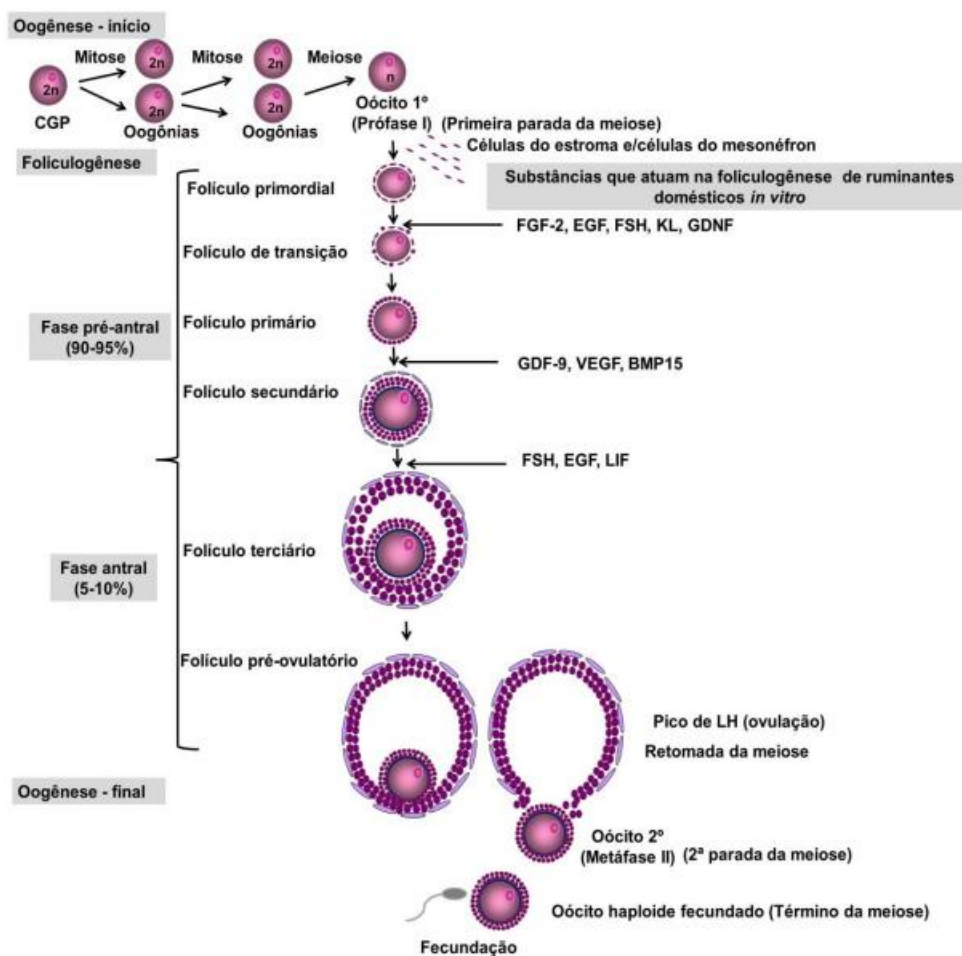


Figura 1: Representação esquemática da Foliculogênese e Ovogênese na espécie bovina (Adaptado de Figueredo et al., 2008).

2.2 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO TECIDUAL OVARIANA

Os ovários são órgãos do aparelho reprodutivo feminino que exercem importantes funções, como produção e liberação dos ovócitos e produção dos hormônios esteroides estrógeno e progesterona (Figura 2). Estas funções são interdependentes e complementares para a reprodução (THIBODEAU; PATTON, 2002).

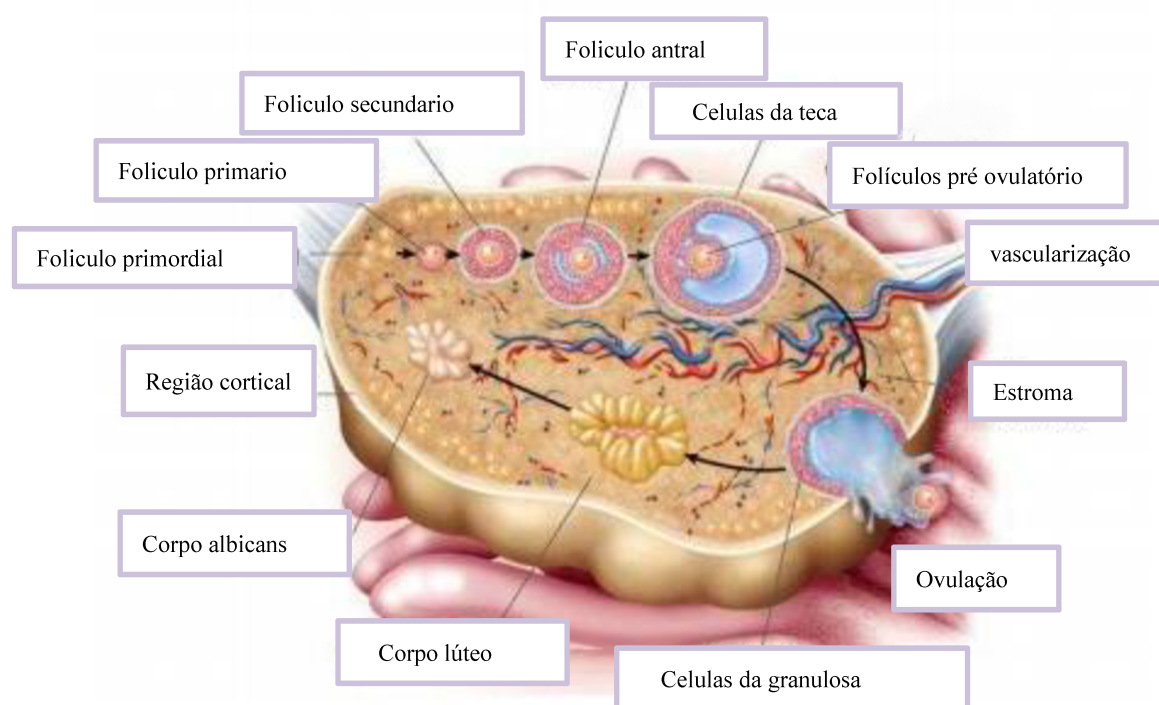


Figura 2: Ilustração da estrutura e organização do ovário mamífero (Adaptado de LIMA, 2012).

A estrutura e disposição organizacional do ovário pode variar de acordo com a espécie, idade e período do ciclo reprodutivo (HAFEZ, 2004). A superfície do ovário é revestida por tecido epitelial de células cúbicas e sustentado por uma membrana basal. Podem ocorrer na maioria dos mamíferos, mudanças na conformação celular de células cúbicas para planas na presença de estruturas que podem pressionar o tecido, como corpos lúteos (MATOVA; COOLEY, 2001), abaixo da superfície se encontra uma camada chamada de túnica albugínea e estroma cortical composto de tecido frouxo.

Pode-se observar duas preponderantes extensões, cortical e medular. A região do córtex está localizada na parte externa, na maioria das espécies, revolta pelo epitélio germinativo, é a região onde se localizamos corpos lúteos, folículos ovarianos, fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e terminações nervosas. A região medular é a porção interna do ovário, responsável pela sustentação, vascularização e inervação, dispõe de um elevado número de vasos sanguíneos, nervos e tecido conjuntivo frouxo (HAFEZ, 2004)

O folículo ovariano, unidade funcional básica do ovário mamífero, no ovário adulto tem uma reserva fixa de folículos primordiais para a grande maioria das espécies, e o número de folículos varia bastante de acordo com fatores como espécie (MALHI; ADAMS; SINGH, 2005), idade (SILVA-SANTOS et al., 2011) e alimentação (SCARAMUZZI; RADFORD, 1993). Para os bovinos, temos a variação de cerca de 8.010 a 94.301 para *Bos*

taurus indicus e 50.326 a 1.090.140 para *Bos taurus taurus* (SILVA-SANTOS et al., 2011). Cerca 90% dos folículos não chegara à ovulação, passarão a um processo conhecido como atresia folicular. Ao longo da vida fatores como envelhecimento celular, levam a redução gradual do número de folículos (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.3 CULTIVO CONVENCIONAL DE TECIDOS E CÉLULAS

O clássico cultivo *in vitro* de diferentes tipos de tecidos e células em superfícies de vidro ou plástico, onde células e tecidos têm contato direto com a superfície de cultivo é um método bidimensional, que tem o objetivo de estudar o comportamento celular fora do organismo e em atmosfera controlada (ADONA et al., 2015). Um método convencional em que a metodologia a ser empregada depende da célula ou tecido a ser cultivada. O meio de crescimento celular, juntamente com o suporte sólido devem fornecer os nutrientes necessários para as sobrevivências das células.

O cultivo bidimensional pode ser realizado, além das placas convencionais, em placas de micro poços contendo o meio propício e em pequenas gotas contendo óleo mineral. Devem ocorrer trocas de meio regularmente para favorecer a eficiência do cultivo na tentativa de impossibilitar a adesão da célula a superfície de cultivo (BOLAND et al., 1993 PICTON, et al., 2008).

Os meios bases de cultivo mais empregados são os que contém α -MEM, TCM-199, e McCoy (ARAÚJO et al. 2014b). Os meios bases podem ser beneficiados com suplementação de piruvato, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico, acrescidos de hormônios (FSH, GH, IGFs, VEGFs) e antioxidantes. Normalmente, o ambiente de cultura apresenta 5% de CO₂ ou 20% de O₂, umidade saturada e temperatura controlada em 38°C (CUNHA et al., 2010). Existem diversos protocolos e os resultados diferentes em relação a meios de cultivo, por isso, observa-se uma grande necessidade de mais estudos para estabelecer as melhores condições para o cultivo.

Para o cultivo de tecidos, sabe-se que as células se interligam umas às outras e a matriz extracelular (ECM), que é a estrutura que dá suporte ao tecido e contém proteínas como colágeno, elastina, entre outros. Essa matriz dá ao tecido propriedades biomecânicas complexas que ajudam na organização e comunicação celular durante o período de cultivo. O cultivo bidimensional de tecido pode induzir modificações nas células receptoras contidas nas superfícies dos tecidos, alterando propriedades bioquímicas importantes do tecido (BIRGERSDOTTER et al., 2005)

Na busca por melhoria no sistema 2D, Telfer et al. (2008), cultivaram folículos pré antrais humanos utilizando um tipo de cultivo *in situ* na presença de actina, quando os folículos foram cultivados em placa de micro poços com fundo em formato V, houve melhora no contato entre células e nutrientes permitindo que os folículos se desenvolvessem de forma mais acelerada. Esse mesmo tipo de cultivo para espécie bovina também demonstrou melhoria no processo de crescimento e diferenciação celular (TELFER & MCLAUGHLIN, 2012).

Apesar dos avanços desta técnica e de seu importante uso em modelos experimentais, no cultivo 2D as células se proliferam diferentemente do modelo *in vivo* que é tridimensional. O contato da célula com a superfície de cultivo modifica a configuração da expansão celular e pode fazer com que ela não receba os nutrientes do meio de forma homogênea (PEREIRA et al., 2016).

2.4 TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* 3D DE TECIDOS E CÉLULAS

Na tentativa de encontrar um sistema de cultivo de células e tecidos que pudesse reproduzir melhor as condições do sistema *in vivo*, foi desenvolvido a técnica de sistema de cultivo chamado tridimensional, a qual o objetivo é criar um ambiente onde a célula ou tecido não fique em contato direto com a superfície de contato, e assim permite que a configuração celular se expanda da forma mais representativa possível do sistema *in vivo*. Existem diferentes tipos de matrizes usadas no cultivo tridimensional que podem ser produzidas a partir de materiais naturais ou sintéticos. As matrizes mais utilizadas até o momento atual são alginato, misturas de alginato, hidrogel e nanopartículas (GREEN; SHIKANOV, 2016).

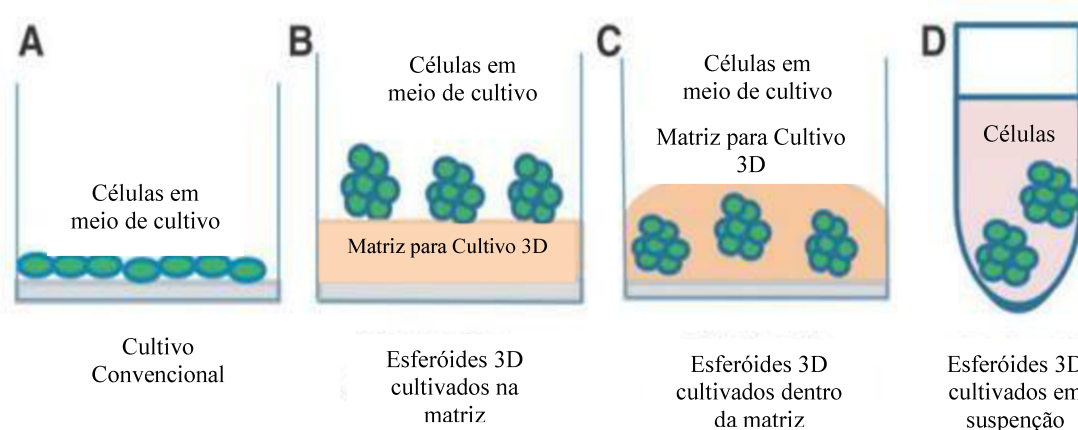


Figura 3: Diagrama esquemático da cultura tradicional de células monocamadas bidimensionais (2D) (A) sistemas de cultura de células tridimensionais (3D) típicos: esferóides / agregados de células matriz (B), células inseridas dentro da matriz (C), esferóides de células sem estrutura em suspensas (D) (Adaptado de Edmondson et al. 2014).

2.4.1 Matriz de alginato e suas composições

O alginato (ácido algínico) é um suporte tridimensional, derivados de algas, comum para a cultura de células. Sua eficácia tem sido comprovada para estudos em roedores, foliculogênese, em primatas e também humanos (GREEN; SHIKANOV, 2016). Os Hidrogéis de alginato são combinações de sais de ácidos com íons de cálcio e magnésio. Estes géis são facilmente manipulados e permitem a adição de suporte como o estroma ovariano. A concentração pode ser alterada com a mudança na quantidade dos compósitos, a fim de melhorar a flexibilidade e rigidez do suporte de acordo com a célula cultivada (ANDERSEN et al., 2015). É usado como biomaterial em produtos biomédicos para uso humano, com aplicações em cicatrização de feridas, enxerto ósseo, terapia celular e aumento da parede do ventrículo esquerdo para pacientes com cardiomiopatia dilatada (ANDERSEN et al., 2012).

A adição de fibrina ao hidrogel de alginato diminui a rigidez da matriz permitindo que ela seja um suporte proteico degradado durante o desenvolvimento folicular, e adequa a concentração final de alginato a níveis mais baixos, o que não seria possível apenas com o hidrogel (WEST et al., 2007, SHIKANOV et al., 2009). Esse sistema melhorou a retomada da meiose e foliculogênese para roedores e primatas (GREEN; SHIKANOV, 2016).

Suportes de estrutura tridimensional de hidrogéis de alginato associados a nanopartículas magnéticas demonstraram ser promissor para melhorar a vascularização e organização endotelial na engenharia óssea (ANDERSEN et al., 2015). Podem ainda ser acoplados a peptídeos e ser adaptados à elasticidade a maioria dos tipos de tecidos, e todos os tipos de tecido mole (ROWLEY; MADLAMBAYAN; MOONEY, 1999).

2.4.2 Matrigel

O Matrigel é composto por diferentes proteínas contidas na matriz celular, extraídas de tumores Englebreth-Holm-Swarm em camundongos, consiste principalmente de laminina, colágeno IV, e enactina. Esse sistema tem importante aplicação em pesquisas com células embrionárias humanas, em que foi demonstrado ser ideal para cultivo de células troncos, já que permite que estas células mantenham a capacidade de manter a auto renovação e a pluripotência (HUGHES; POSTOVIT; LAJOIE, 2010)

Higuchi et al. (2010) demonstrou que folículos cultivados em sistema tridimensional utilizando matrigel favoreceu o desenvolvimento e ativação de folículos. No final do cultivo foi observado a formação da cavidade antral, o que não aconteceu no cultivo convencional.

Ainda, a suplementação do matrigel com actina melhorou a taxa de maturação de folículos e ovócitos no sistema tridimensional.

Apesar da matriz de matrigel permitir a adição de suplementação, Souza et al. (2010) considerou que esse tipo de matriz detém da limitação quanto a composição que é fixa e não permite modificação.

2.4.3 PEG

Os hidrogéis são formados por moléculas não naturais, como polietilenoglicol (PEG). Estudos demonstram que o hidrogel mantém a viabilidade de células encapsuladas e admite que o gel seja degradado durante o desenvolvimento celular. Normalmente inerte, esse tipo de material permite ajuste facilmente as propriedades mecânicas das células, são processados e fabricados com certa facilidade, e amplamente utilizados em estudos de fisiologia celular para diferentes tipos de células em mamíferos (TIBBITT; ANSETH, 2009).

Os hidrogéis feitos de PEG são altamente biocompatíveis e exibem características físicas versáteis baseadas em sua porcentagem de peso e densidade de reticulação (ALMANY; SELIKTAR, 2005). Uma adicional vantagem dos hidrogéis PEG é a sua capacidade de sofrer transição líquido-sólido controlada na presença de uma suspensão celular. Estudos demonstraram que o cultivo de folículos pré antrais utilizando esse gel permitiu o desenvolvimento do folículo até a fase antral com boas taxas de desenvolvimento folicular. Este gel permite uma expansão volumétrica do folículo em até 17 vezes (SHIKANOV et al., 2011).

Outro hidrogel sintético, com características semelhantes, é o PVA, Poli(álcool polivinílico), que também mantém suas propriedades mecânicas e viabilidade celular por vários dias de cultura, embora ainda não tenha sido testado em folículos ovarianos (BELLI et al., 2013).

2.4.4 Nanopartículas Magnéticas

Diversos compósitos de nanopartículas tem sido utilizado na medicina nos últimos anos. Uma das principais vantagens em usar esse tipo de partícula é principalmente o tamanho, além de ser uma característica controlável, a disposição em nanômetros coloca esse tipo de material comparável ao tamanho de células como vírus, proteínas e genes (PANKHURST et al., 2003).

As nanopartículas magnéticas podem ser revestidas de outras moléculas biológicas, adquirindo assim importantes propriedades como sinalização celular e carreadoras de drogas. Suas propriedades físicas, as permitem ser manipuladas por um gradiente externo de campo magnético (BÁRCENA; SRA; GAO, 2009).

Nanopartículas podem ser acumulados em tumores sólidos, fazendo com carreguem medicamentos até as células, usadas na radiomarcção de imagens para diagnóstico, como modelos em radioterapia, modelo de culturas celulares e modelos de biossensores (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014; LING; LEE; HYEON, 2015). As nanopartículas permitem aliar o cultivo 3D a levitação por meio de uma placa magnética. Lin et al. (2013) obtiveram resultados positivos associando nanopartículas ao sistema 3D para tratar disfunção erétil em modelos animais a partir de cultivo de células tronco.

Neuberger et al. (2005), provou que as nanopartículas de óxido de ferro são bem toleradas pelas células. As crescentes aplicações têm dado origem a muitas preocupações entre autoridades reguladoras científicas em relação à sua toxicologia. Os comportamentos *in vivo* e *in vitro* da toxicologias das nanopartículas do óxido de ferro foram intensamente estudadas para garantir a segurança nas últimas décadas, em geral estas apresentam boa biocompatibilidade, e a toxicidade depende de fatores como tipo celular, tamanho e concentração das nanopartículas. Nanopartículas a base de ouro já tem eficácia comprovada devido a biocompatibilidade celular e toxicidade, já são autorizadas em diferentes aplicações pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (LANGER; TIRRELL, 2004).

2.5 CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL ASSOCIANDO NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

O interesse das nanopartículas em estudos se iniciou com a função de investigar processos celulares e vias de sinalização das moléculas (DOBSON, 2001). Diferentes tipos de nanopartículas magnéticas como ouro e óxido de ferro vêm sendo utilizadas para cultivo de células e tecidos.

Lee et al. (2009), demonstrou que o uso de nanopartículas combinadas ao cultivo tridimensional reduziu o potencial de toxicidade das nanopartículas comparado ao sistema 2D. Souza et al. (2010), observou que nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro (Fe_3O_2 , magnetita) e poli-L-Lisina dispostas em um hidrogel podem ser uma alternativa aos suportes porosos biodegradáveis e às matrizes proteicas quando associadas a um sistema de levitação magnética. Daquingua et al. (2013), utilizou nanopartículas para criar um ambiente tridimensional para cultivo de pré adipócitos tipo 3T3-L1, e concluiu que a estrutura formada fez com que as células apresentassem maior viabilidade celular por um longo período de cultivo, na cultura 2D as células perderam rapidamente a adesão e acabaram se degenerando.

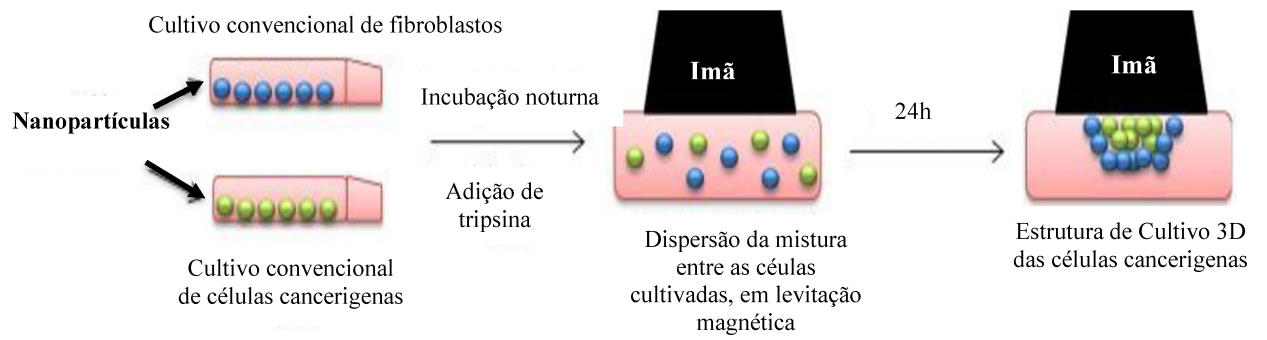


Figura 4. Representação esquemática do desenvolvimento e modelo de tumor de mama 3D *in vitro* a partir d

uma mistura dispersa de fibroblastos e células de câncer de mama associando nanopartículas e levitação magnética (Adaptado de Jaganathan et al. 2014).

2.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CULTIVO DE TECIDO OVARIANO

Após o cultivo do tecido do fragmento do ovário bovino, é necessário verificar se a técnica é eficiente quando comparada as outras metodologias empregadas. Para isso, podem ser evidenciadas as técnicas de avaliação morfológica, histologia clássica, dosagem hormonal, expressão gênica através dos níveis de RNAm e microscopia por fluorescência (ROSSETTO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2010; CELESTINO et al., 2011).

A histologia clássica é um método convencionalmente utilizado em que permite a análise do tecido ovariano, e qualidade dos folículos pré antrais e antrais quanto a características como integridade e preservação das células ao fim de período de cultivo *in vitro*, fragmento fresco ou descongelado (MATOS et al., 2007). Considerada uma metodologia simples, de baixo custo, a histologia clássica permite avaliar alterações como desorganização das células da granulosa e seu destacamento da membrana basal, retração e a picnose. Uma grande vantagem da técnica é a de possibilitar análises quantitativas e qualitativas de um grande número de folículos. Esta técnica se mostra sensível, podendo obter resultados similares aos de viabilidade folicular utilizando marcadores fluorescentes como a calceína e o corante azul de tripan (AMORIM et al., 2003)

A microscopia confocal ou de fluorescência é uma técnica que se baseia na varredura a laser ponto a ponto de um fragmento de tecido ou célula que é previamente marcado por compostos fluorescentes. Microscópios confocais permitem a aquisição de imagens digitalizadas de diferentes planos focais de uma amostra biológica, permitindo reconstruir tridimensionalmente a estrutura observada (AMOS et al., 2003). Essa técnica permite avaliar fatores intrínsecos ao metabolismo celular, como a produção de espécies reativas de oxigênio, a apoptose e a necrose (LI et al., 2006).

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), relacionados a processos de proliferação celular e hipóxia, e manutenção da homeostase podem ser monitoradas e quantificados em amostras biológicas pelo uso do corante 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) que apresenta fluorescência sob excitação com um comprimento de onda de 485-500 nanômetros e comprimento de onda de emissão de 515-530 nanômetros. A fluorescência é produzida após a entrada do corante na membrana celular, que por meio de reações químicas produz o composto fluorescente DCF (CHEN et al., 2010).

O Iodeto de proprideo é amplamente utilizado para mensurar parâmetros de degeneração celular, ele marca de forma brilhante o núcleo da maioria das células, cora o DNA e RNA do

citoplasma. Com comprimento de onda de 536 nanômetros e emissão é de 620 nanômetros, atravessa a membrana de células necróticas e não consegue atravessar aquelas em apoptose e células viáveis (ZAMPOLLA; ZHANG; RAWSON, 2008).

O YO-PRO é ideal para marcação de apoptose, o processo natural de morte celular programada, torna a membrana plasmática permeável e susceptível a entrada do corante que com comprimento de onda excitatório de 491 nanômetros e pico de emissão de 509 nanômetros consegue entrar livremente na célula e se ligar aos seus ácidos nucleicos produzindo fluorescência (IDZIOREK et al.,1995).

Estas técnicas objetivam avaliar a viabilidade celular, avaliação da ativação dos folículos, mudanças na morfologia do tecido e nas células somáticas durante processo de cultivo in vitro, entre outros.

3 JUSTIFICATIVA

Existem diversos estudos sobre a foliculogênese em modelos animais com o foco em folículos pré-antrais (ARAUJO et al., 2010). Os avanços nos estudos sobre foliculogênese permitiram o desenvolvimento da biotécnica de manipulação de ovócitos incluídos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) com o objetivo de resgate e manipulação *in vitro* dos ovócitos advindos destes folículos (LIMA; DOS SANTOS, 2010). A MOIFOPA permite a criopreservação do tecido ovariano, mantendo a viabilidade do tecido, uma etapa importante para realização de outros processos como cultivo, maturação, transplante entre outros (LIMA; DOS SANTOS, 2010).

O estudo dos fragmentos de tecido ovariano podem ajudar a elucidar mecanismos ainda desconhecidos nos processos de interação celular de ativação e crescimento dos folículos (LIMA; DOS SANTOS, 2010).

No cultivo de folículos pré-antrais, a maioria dos trabalhos descritos utiliza a metodologia de cultivo convencional (bidimensional - 2D) (NATION; SELWOOD, 2009). Este sistema não pode ser considerado ideal pois impede a preservação dos arranjos espaciais das células *in vivo* (BRITO et al., 2014). Na busca por um sistema que permita a observação com maior precisão, o cultivo tridimensional (3D) tem atraído atenção dos pesquisadores. O sistema 3D pode ser considerado uma mimetização do sistema *in vivo*, já que pode permitir a modulação do comportamento celular, crescimento, avaliações a resposta e estímulos e a comunicação com células circundantes (DESAI et al., 2010).

As nanopartículas magnéticas compostas de ouro, óxido de ferro (Fe_3O_2 , magnetita) e sequências peptídicas de células-adesivas (poli-L-Lisina) são nanomateriais biocompatíveis que vêm sendo amplamente utilizadas em modelos para fins biomédicos devido suas propriedades (SOUZA et al., 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade dos folículos contidos nos fragmentos de tecidos ovarianos bovinos durante o cultivo *in vitro* em sistema 3D utilizando nanopartículas (ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina) associadas à levitação magnética em diferentes concentrações.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Quantificar e classificar os folículos pré antrais (primordial, transição, primário e secundário) *in vitro* no tecido cultivado.
- b) Avaliar a viabilidade celular dos folículos contidos nos fragmentos, verificando a produção de ROS, apoptose e degeneração celular por microscopia confocal.

5 HIPÓTESES

- a) O cultivo em sistema 3D associado à nanopartículas e levitação magnética leva a um melhor desenvolvimento dos folículos contidos nos fragmentos de tecido ovariano bovino se comparado ao cultivo convencional (2D).
- b) O cultivo 3D dos fragmentos resultará em menor proporção de folículos degeneradas ou em apoptose por impedir que as células fiquem aderidas a placa e permitirá que as mesmas se desenvolvam de forma mais efetiva. Além disso, o sistema 3D irá mimetizar a estrutura do tecido ovariano *in vivo*.
- c) A maior concentração de nanopartículas resulta em maior viabilidade tecidual.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 REAGENTES

Os reagentes e sondas utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis MO, USA), a menos que indicado de outra forma.

6.2 COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

O presente estudo foi submetido e isento de autorização de protocolo de Comitê de Ética sob número de registro A001/18, uma vez que o material utilizado não foi coletado a partir de manipulação direta de animais.

6.3 COLETA DO MATERIAL

Os ovários foram coletados de vacas mestiças em abatedouro-frigorífico no município de Ribeirão Preto (SP). O transporte do frigorífico ao Laboratório de Reprodução da Universidade Federal de São Paulo (Ribeirão Preto) ocorreu em garrafa térmica com temperatura entre 35°C a 38°C, em um período máximo de quatro horas.

6.4 DESENHO EXPERIMENTAL

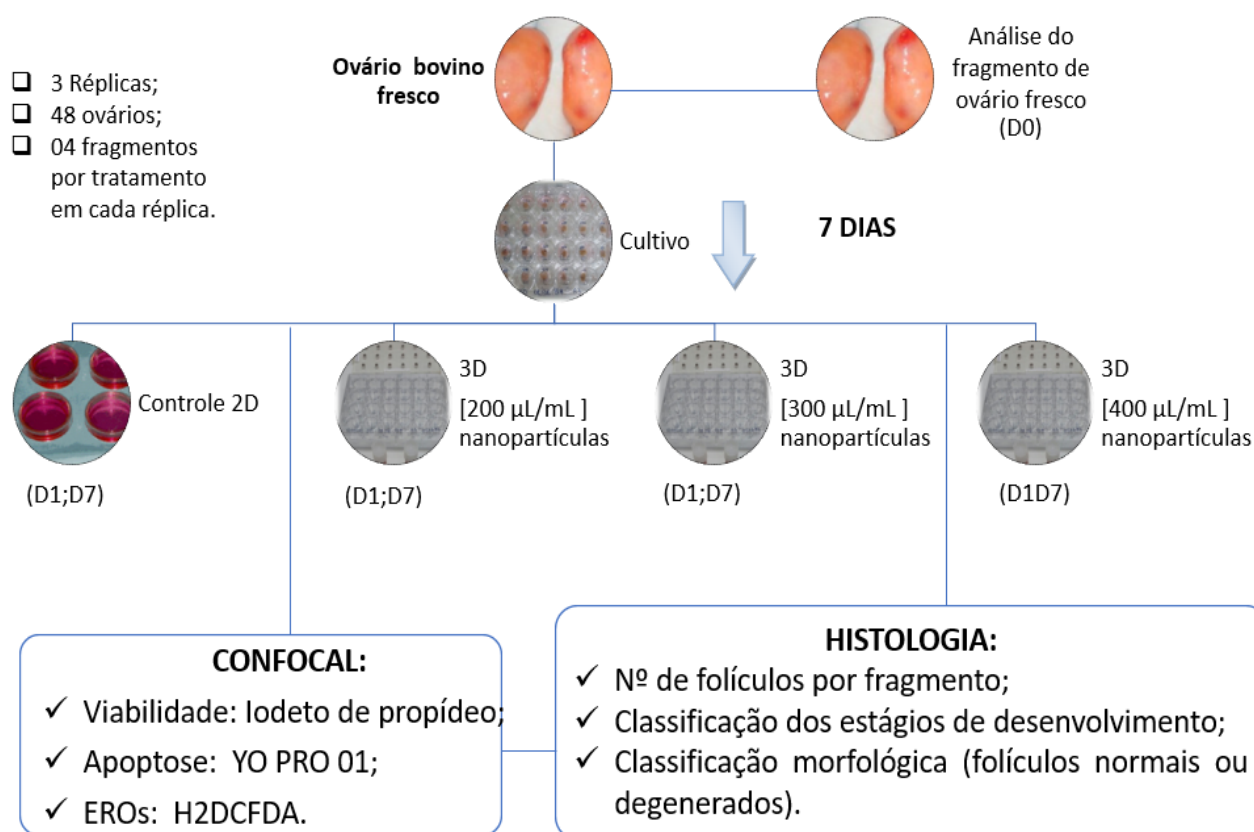


Figura 5: Desenho experimental – Cultivo *in vitro* de fragmento ovariano bovino associando nanopartículas e levitação magnética.

6.5 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS

No laboratório, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70% e lavados com soro fisiológico 0,9% previamente aquecido (37°C), suplementado com 100 µg/mL de amicacina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, os ovários foram lavados com meio HEPES (TCM-199 HEPES) suplementado com 100 µg/mL de amicacina e 100 µg/mL de estreptomicina. Com o auxílio do equipamento Tissue slicer, os ovários foram fragmentados com espessura aproximada de 3x3x0,5 mm e logo depois os fragmentos do córtex ovariano foram transferidos para o meio TCM-199 HEPES até o momento da seleção.

Os fragmentos foram distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos, Controle fresco, Controle convencional, e cultivo tridimensional nas concentrações de 300 µL/mL e Concentração de 400 µL/mL nanopartículas. Cada tratamento recebeu 2 fragmentos para análise histológica e 2 fragmentos para análise confocal (total de 4 fragmentos por tratamento em cada réplica). Os Fragmentos selecionados para o

controle fresco (n=4) foram imediatamente fixados para avaliação histológica e corados de acordo com protocolo para avaliação confocal.

6.6 CULTIVO *IN VITRO* CONVENCIONAL E TRIDIMENSIONAL

Finalizada a seleção, cada fragmento foi distribuído para os respectivos tratamentos em placas de cultivo de 24 poços que continham 700 µL meio de cultivo, composto de TCM-199 suplementado com 3 mg/mL de BSA, ITS (10 µg/mL insulina, 5,5 µg/mL transferrina, 4,0 ng/mL selênio, LifeTechnologies Inc., Grand Island, NY, USA), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 100 µg/mL de amicacina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Para os tratamentos de cultivo 3D por levitação magnética foram acrescentado ao meio de cultivo nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L lisina (NanoShuttle™-PL, n3D, Bioscience, Inc., Houston, TX, USA) nas concentrações de 300 µL/mL e 400 µL/mL.

Com o intuito de propiciar a aderência entre o tecido e as nanopartículas, os fragmentos de tecido permaneceram 4 horas incubados em estufa com 5% de CO₂, em uma temperatura de 38,5°C. Ao término desse período, um drive magnético foi adicionado substituindo a tampada placa nos tratamentos de cultivo 3D. Após 1 hora foi possível visualizar o tecido em levitação. Os fragmentos de tecido controle 2D foram cultivados em mesmas condições em placas de 24 poços, porém sem o drive magnético. Os fragmentos foram cultivados em estufa com 5% de CO₂ no ar, à 38,5°C por 7 dias, com troca parcial do meio a cada 2 dias. Todas as análises foram realizadas no dia da coleta (D0), D1(24h) e após o período de cultivo 7 dias (D7).

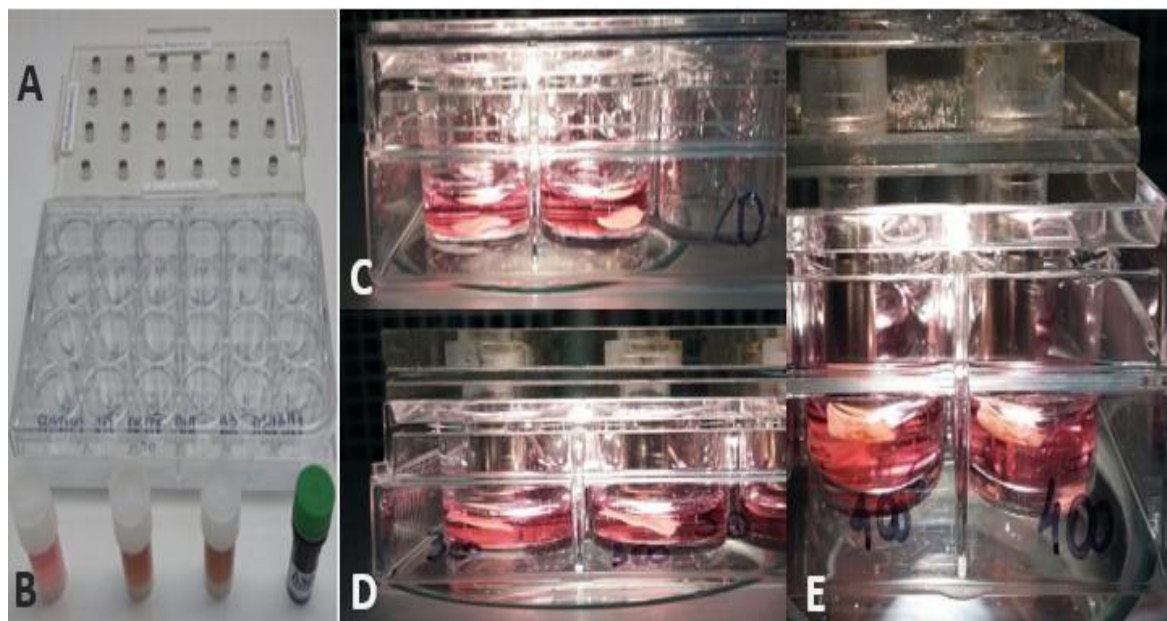


Figura 6: Cultivo bidimensional e tridimensional dos fragmentos ovarianos bovinos. (A) Placa Magnética (B) Nanopartículas e diluições (C) Cultivo 2D (D) Cultivo 3D 300 µL/mL (E) Cultivo 3D 400 µL/mL.

6.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a preparação histológica padrão (desidratação e emblocagem em parafina), as amostras foram seccionadas a 7 µm de espessura, colocadas em lâminas de vidro, e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina (ALVES et al.,2015). As leituras das lâminas histológicas foram realizadas no microscópio óptico com um aumento de 400x. Foi avaliada o número de folículos por fragmento; classificação quanto ao estágio de desenvolvimento (primordial, primário, secundário, em transição) e classificação morfológica (normal ou degenerado) conforme padrão descrito por Alves et al. (2015).

6.8 MICROSCOPIA CONFOCAL

Na análise confocal avaliou-se a viabilidade, apoptose e oxidação do tecido ovariano após os diferentes tipos de tratamentos. O corante H₂DCFDA ($\lambda = 485-530$ nm) emite fluorescência que indica a intensidade de emissão de espécies reativas de oxigênio e detecção de processo oxidativo em células fagocíticas. A YO PRO 01 ($\lambda = 491-509$ nm) indica através da emissão da fluorescência a quantidade de células em processo de apoptose. O corante iodeto de propídio ($\lambda = 536-620$ nm) emite a fluorescência adquirida por células degeneradas. O comprimento de onda para cada corante foi previamente programado e as secções realizadas em intervalos de 8 micrômetros com média de 8 a 12 secções em Z-Stack (FABBRI et al.,2014). As imagens foram

salvas no programa Zen 2008 instalado ao microscópio e os dados numéricos da intensidade de fluorescência utilizados nas análises estatísticas.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos a transformação logarítmica. A intensidade de fluorescência das probes utilizadas (diclorofluoresceína, YO-PRO-1 e iodeto de propídeo) foi comparada entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. A proporção de folículos normais e a ativação folicular foram analisadas entre os tratamentos e dias de cultivo pelo teste de qui-quadrado. Os dados foram apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média) e porcentagem e os resultados considerados significativos quando $P < 0.05$.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO HISTÓLOGICA

Um total de 11.521 folículos foram avaliados em 21 amostras de fragmento ovarianos em 699 secções histológicas

Na tabela 1 está descrito a proporção de folículos viáveis dos tratamentos propostos após 24 horas e ao término do cultivo *in vitro*. Após 24 horas decultivo foi observada uma redução ($P<0,05$) na proporção de folículos viáveis do grupo 2D em relação ao controle fresco. Em contrapartida, os grupos de cultivo tridimensional apresentaram taxas de viabilidade folicular semelhantes ($P>0,05$) ao controle fresco. Adicionalmente, o grupo 3D com concentração de 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou maior proporção de folículos viáveis comparado ao grupo 3D 300 $\mu\text{L/ml}$. Após 7 dias de cultivo, o grupo 2D apresentou uma viabilidade folicular menor ($P<0,05$) que o controle fresco e que os grupos de cultivo 3D. Além disso, o grupo 3D 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou índices de viabilidade folicular superior ($P<0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo 3D 300 $\mu\text{L/ml}$. De uma maneira geral, o grupo 3D 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou maior ($P<0,05$) proporção de folículos viáveis. A viabilidade folicular reduziu ($P<0,05$) entre os dias D1 e D7 de cultivo 2D, de maneira oposta a proporção de folículos viáveis, que foi superior ($P<0,05$) no final ao cultivo do grupo 3D 400 $\mu\text{L/ml}$. Na comparação entre os métodos de cultivo *in vitro*, uma maior ($P<0,05$) viabilidade de folículos foi observada no método tridimensional comparado ao controle fresco e ao bidimensional.

Tabela 1. Proporção (Média $\pm$ EPM) de folículos viáveis em fragmentos de tecido ovariano bovino submetidos aos cultivo convencional e ao tridimensional nas diferentes concentrações de nanopartículas.

Viabilidade % (Média ± EPM)			
		Viabilidade %	
2D	49,4 ± 1,32 * ^A		
3D	77,84 ± 1,05 * ^B		
*Difere do controle (P<0,05)		^{A , B} Difere na coluna (P<0,05)	
Controle = 70,4 ±			
0,95	D1	D7	Geral
2D	46,36 ± 1,50 * ^{Aa}	56,60 ± 2,16 * ^{Ab}	49,4 ± 1,32 * ^A

3D 300 µL/ml	71,26 ± 2,54 ^{Ba}	68,78 ± 2,03 ^{Ba}	69,93 ± 1,60 ^B
3D 400 µL/ml	79,3 ± 1,80 ^{Ca}	90,78 ± 1,20 ^{*Cb}	85,48 ± 1,13 ^{*C}
*Difere do controle (P<0,05)		^{A, B, C} Difere na coluna (P<0,05)	
		^{a, b} Difere na linha (P<0,05)	

Na avaliação de 24h de cultivo, todos os grupos apresentaram uma maior ($P<0,05$) proporção de folículos ativados em comparação ao controle fresco (Tabela 2). A ativação folicular foi maior ($P<0,05$) nos grupos de cultivo tridimensional comparado ao bidimensional. O grupo 3D 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou ativação folicular superior ($P<0,05$) ao grupo 3D 300 $\mu\text{L/ml}$. Após 7 dias de cultivo todos os grupos apresentaram maior ($P<0,05$) proporção de folículos ativados em relação ao controle fresco. Neste período a proporção de ativação folicular foi semelhante ($P>0,05$) ao entre os grupos de cultivo. Adicionalmente, os folículos em desenvolvimento do grupo 2D tiveram proporção maior ($P<0,05$) em D7, enquanto a ativação folicular nos grupos de cultivo tridimensional foi semelhante ($P>0,05$) entre os dias D1 e D7. De modo geral, a ativação folicular foi maior em todos os grupos de cultivo em relação ao controle fresco e o grupo 3D 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou maior taxa de ativação comparado aos outros grupos.

Tabela 2. Proporção (Média $\pm$ EPM) de folículos ativados em fragmentos de tecido ovariano bovino submetidos aos cultivo convencional e ao tridimensional nas diferentes concentrações de nanopartículas.

Ativação folicular (Média $\pm$ EPM)			
Controle Fresco = 42,31 $\pm$ 1,2			
	D1	D7	Geral
2D	74,15 $\pm$ 2,20 * ^{Aa}	92,24 $\pm$ 1,37 * ^{Ab}	82,97 $\pm$ 1,47 * ^A
3D 300 $\mu\text{L/ml}$	88,5 $\pm$ 2,45 * ^{Ba}	92,06 $\pm$ 1,44 * ^{Aa}	90,45 $\pm$ 1,37 * ^B
3D 400 $\mu\text{L/ml}$	96,2 $\pm$ 0,88 * ^{Ca}	96,40 $\pm$ 0,70 * ^{Aa}	96,33 $\pm$ 0,55 * ^C
Ativação %			
2D	82,87 $\pm$ 1,47 * ^A		

3D	$93,49 \pm 0,73$ * ^B
----	---------------------------------

*Difere do controle (P<0,05)

A análise de correlação demonstrou uma associação positiva ($p<0,001$) entre a concentração de nanopartículas utilizadas no cultivo tridimensional e a proporção de folículos viáveis, bem como de folículos ativados (Figura 7).

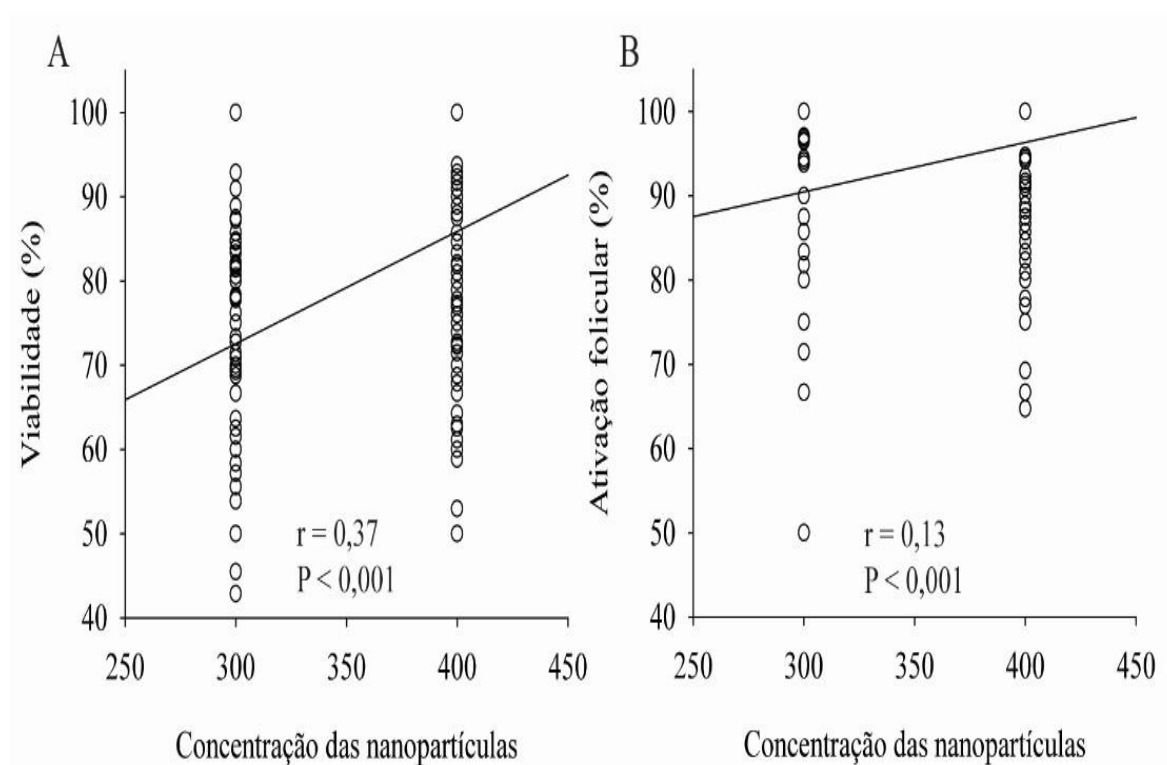


Figura 7. Representação da associação entre (A) viabilidade (B) ativação folicular em relação ao aumento da concentração de nanopartículas

7.2 MICROSCOPIA CONFOCAL

7.2.1 IODETO DE PROPÍDEO (I.P)

De modo geral, o tratamento de cultivo tridimensional com 400 $\mu\text{L/ml}$ de nanopartículas apresentou a menor ($P<0,05$) taxa de degeneração celular (tabela 4). Após 24h horas de cultivo todos os tratamentos apresentaram índices de degeneração celular menores ($P<0,05$) que o controle fresco. Na avaliação de 7 dias de cultivo (D7) o tratamento de 400 $\mu\text{L/ml}$ apresentou menor taxas de degeneração celular ($P<0,05$) aos demais tratamentos (Figura 8).

Tabela 4. Taxa de degeneração celular (Média $\pm$ EPM) dos fragmentos de tecido ovariano submetidos aos cultivo convencional e ao tridimensional nas diferentes concentrações de nanopartículas.

	P.I		
	D1	D7	GERAL
Controle = $17,1 \pm 1,7$			
2D	$9,72 \pm 0,80$ ^{AB*}	$13,66 \pm 1,46$ ^{bA}	$11,6 \pm 0,6$ ^A
300	$10,98 \pm 0,68$ ^{aA*}	$13,25 \pm 0,95$ ^{aA}	$12,1 \pm 0,6$ ^A
400	$7,64 \pm 1,04$ ^{aB*}	$2,84 \pm 0,22$ ^{bB*}	$5,2 \pm 0,6$ ^B

^{AB} Difere na coluna ($P<0,05$) ^{a, b} Difere na linha ($P<0,05$)

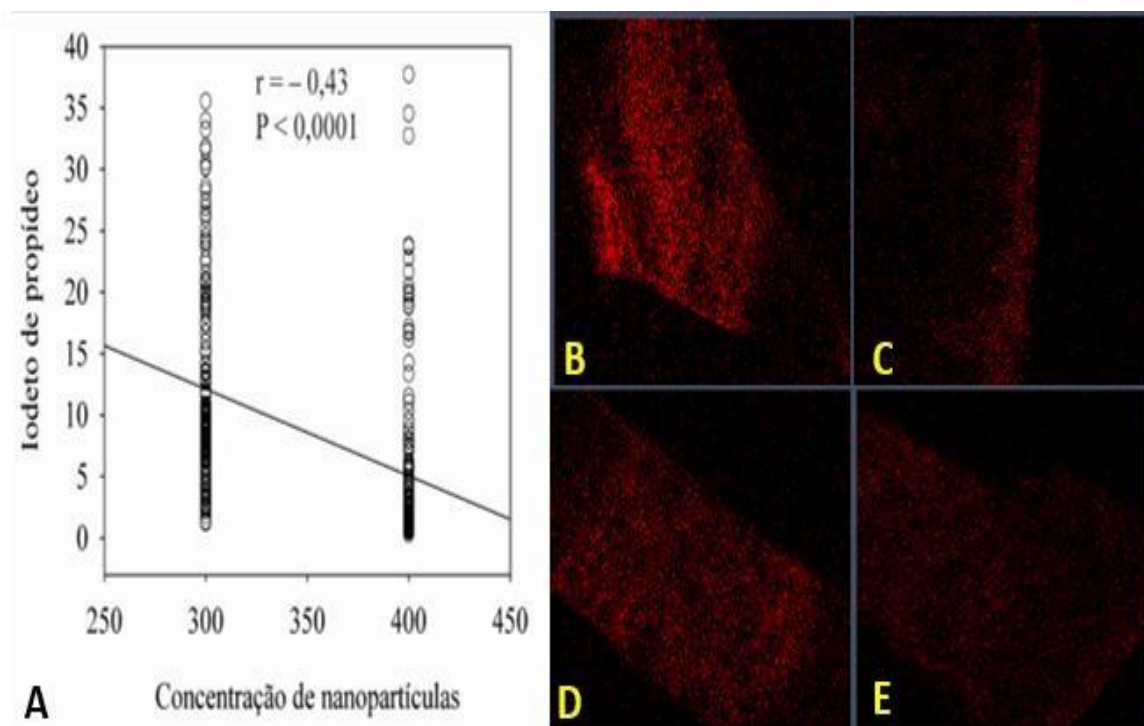


Figura 8 Intensidade de fluorescência (média±epm) emitida em tecido ovariano bovino corado pelo iodeto de propídeo em relação a diferentes a concentração de nanopartículas (A) Controle fresco (B) Cultivo convencional (C) 3D 300 µL/ml (D) 3D 400 µL/ml, avaliados após 7 dias de cultivo.

7.2.2 YO-PRO

O nível de apoptose celular em D1 foi menor ($P < 0,05$) para os tratamentos de 300 µL/ml e 400 µL/ml de nanopartículas quando comparados ao grupo controle fresco. Já o tratamento bidimensional apresentou taxa de apoptose semelhante ao controle fresco ($P > 0,05$) (Tabela 5). Após 7 dias de cultivo todos os tratamentos apresentaram taxas de apoptose semelhantes entre si ($P > 0,05$) e menores que o controle fresco ($P < 0,05$). De um modo geral a taxa de apoptose foi semelhante entre os grupos de cultivo tridimensional e bidimensional ($P > 0,05$).

Tabela 5. Taxa de apoptose celular medida pelo YO-PRO nos fragmentos de tecido ovariano submetidos aos cultivo convencional e ao tridimensional nas diferentes concentrações de nanopartículas.

	YO-PRO		
	D1	D7	Geral
Controle = $13,5 \pm 1,2$			
2D	$12,9 \pm 0,8^{aA}$	$7,2 \pm 0,9^{bA*}$	$10,1 \pm 0,6^A$

300	$10,2 \pm 0,7$ ^{aB*}	$8,9 \pm 0,6$ ^{aA*}	$9,6 \pm 0,4$ ^A
400	$8,1 \pm 0,7$ ^{aB*}	$9,3 \pm 1,2$ ^{aA*}	$8,7 \pm 0,7$ ^A

^{AB} difere na coluna (P<0,05) ^{a, b} difere na linha (P<0,05) * Difere do CF (P<0,05)

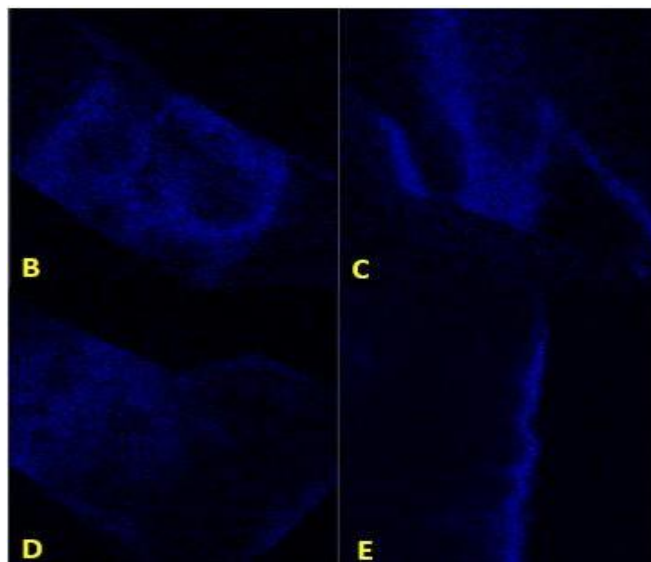


Figura 9 . Fragmentos ovarianos avaliados quanto a emissão de fluorescência média detectada pelo YO-PRO no período decultivo (B) Controle fresco (C) 2D (D) 3D 300 µL/ml (E) 3D 400 µL/ml avaliados ao final do cultivo.

7.2.3 DCF

No primeiro dia de cultivo *in vitro* a emissão de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi menor (P<0,05) nos grupos de cultivo tridimensional comparado ao controle fresco e ao cultivo bidimensional (Tabela 6). O tratamento com 300 µL/ml de nanopartículas apresentou taxas de emissão de ROS superior (P<0,05) ao grupo com 400 µL/ml de nanopartículas.

Após o término do cultivo foi observado redução da emissão de ROS para todos os grupos de cultivo em relação ao controle fresco (P<0,05). Adicionalmente, nos grupos de cultivo tridimensional a emissão de ROS se manteve constante entre o primeiro e o último dia do cultivo *in vitro* (P>0,05).

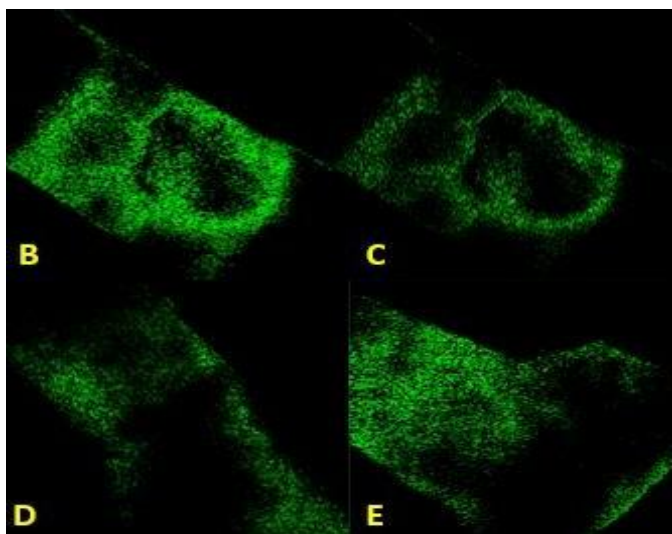


Figura 10. Fragmentos ovarianos avaliados quanto a emissão de fluorescência média detectada pelo DCF no período decultivo (B) Controle fresco (C) 2D (D) 3D 300 µL/ml (E) 3D 400 µL/ml avaliados ao final do cultivo.

Tabela 6. Taxa de emissão de ROS medida pelo DCF nos fragmentos de tecido ovariano submetidos aos cultivo convencional e ao tridimensional nas diferentes concentrações de nanopartículas.

	DCF		
	D1	D7	GERAL
CF =	33,4 ± 3,6		
2D	32,5 ± 2,4 ^{aA}	19,5 ± 3,1 ^{bA*}	26,0 ± 1,8 ^A
300	25,1 ± 2,0 ^{aB*}	22,5 ± 1,9 ^{aA*}	23,8 ± 1,7 ^{AB}
400	18,0 ± 1,9 ^{aC*}	21,8 ± 3,1 ^{aA*}	19,9 ± 1,7 ^B

^{AB} Difere na coluna (P<0,05) ^{a, b} Difere na linha (P<0,05)

7.2.4 CORELAÇÕES

O índice de degeneração celular tem correlação positiva com a produções de espécies reativas de oxigênio (ROS) e taxas de apoptose. Em contrapartida, a emissão de ROS só apresentou correlação com as taxas de apoptose. Enquanto isso, as taxas de apoptose não apresentaram correlação com nenhum dos parâmetros avaliados.

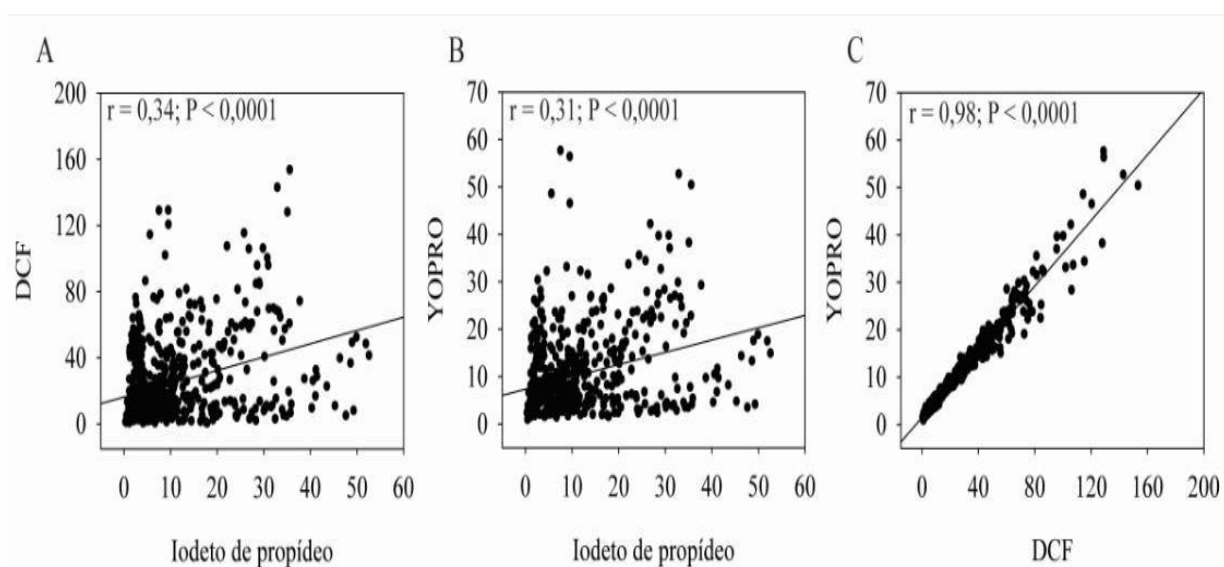


Figura 11. Representação gráfica da correlação entre a média de fluorescência detectadas por meio de ROS, DCF e YO-PRO nos fragmentos bovinos avaliados (n=581).

8 DISCUSSÃO

Dentro do nosso conhecimento, este estudo foi o primeiro a testar o sistema de cultivo tridimensional por levitação magnética com nanopartículas formadas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina no cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.

O cultivo tridimensional associado a maior concentração de nanopartículas favoreceu a viabilidade folicular. Durante o cultivo tridimensional, o tecido não entra em contato com a placa, e isto faz com que o ambiente *in vivo* seja mimetizado, permitindo que desta forma as células se desenvolvam de forma mais adequada (GEEN; SHIKANOV, 2016). Entende-se que o ambiente tridimensional é capaz de melhorar a viabilidade do cultivo *in vitro*. Conforme descrito neste trabalho, outros estudos já demonstraram boa resposta do cultivo celular utilizando o sistema tridimensional de levitação magnética. Antonino et al. (2019), demonstrou que o uso de cultivo tridimensional baseado em levitação magnética melhorou a viabilidade folicular *in vitro* de folículos secundários bovinos proporcionando melhor formação de antro, diminuiu a extrusão e degeneração e manteve taxa de crescimento apropriada, melhorando a viabilidade dos ovócitos. Zhao et al. (2018) observaram que folículos isolados de galinhas domésticas (*Gallus domesticus*), independentemente do método de isolamento, apresentaram taxas de sobrevivência e viabilidade superiores quando cultivados em matriz tridimensional de hidrogéis de alginato por cultivados por 07 dias comparado ao cultivo bidimensional.

A ativação folicular foi beneficiada pelo cultivo tridimensional e pela concentração mais alta de nanopartículas. Entende-se que, assim como houve melhoria nas taxas de viabilidade celular, o cultivo tridimensional pode ter preservado as principais características morfológicas dos folículos ovarianos que por conseguinte melhorou a comunicação entre as células circundantes que são responsáveis pela produção de fatores estimulatórios da ativação folicular. Estudos recentes demonstraram que o processo requer uma combinação de fatores inibitórios, estimulatórios e de manutenção. Adicionalmente, o ambiente físico dos folículos em desenvolvimento parece afetar diretamente a resposta ao estímulo e inibição fatores de ativação e, portanto, influenciar diretamente sua capacidade de crescimento dos folículos (McLAUGHLIN, 2009). Abdi et al. (2016) observaram que folículos pré antrais de camundongos cultivados em matriz tridimensional de alginato de sódio e acrescido de Kit Ligante (KL) apresentaram melhores taxas para ativação folicular e desenvolvimento quando comparado ao cultivo bidimensional também suplementado de KL.

Quanto ao uso de nanopartículas, os parâmetros avaliados de viabilidade e ativação folicular foram superiores nos tratamentos com maior concentração de nanopartículas, o que contribuiu para confirmar a biocompatibilidade deste tipo de material. Diferentes tipos de nanopartículas tem ganhado destaque na tentativa de se desenvolver um sistema de cultivo tridimensional ideal para células e tecidos. Avaliada a biocompatibilidade de um hidrogel composto de ouro, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e bacteriófago e associado a levitação magnética, demonstrou-se que diferentes tipos de células em co-cultura podem ser alcançados (SOUZA et al., 2010). Um estudo *in vitro* demonstrou que nanopartículas de sílica (sNP) acopladas ao fator decrescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) carregadas em um suporte à base de colágeno tridimensional melhorou a resposta de condrócitos articulares humanos para o tratamento direcionado e controlado das lesões da cartilagem articular (PASOLD et al., 2015). Além disso, Silva et al. (2015) demonstrou melhores resultados ao utilizar o cultivo tridimensional para o cultivar folículos pré-antrais caprinos utilizando matriz de alginato, além de apresentar maiores taxas de sobrevivência folicular, e maior percentagem de desenvolvimento *in vitro*, os folículos foram capazes de fertilização e produção embriões viáveis quando se aumentou a concentração da matriz. Xu et al. (2009) também observou correlação positiva ao relacionar a viabilidade folicular com o aumento da concentração da matriz tridimensional de alginato utilizada para cultivar folículos pré-antrais de primatas.

Os resultados demonstraram, que o cultivo tridimensional com nanopartículas parece minimizar a formação de peróxido de hidrogênio no tecido em relação ao cultivo 2D, e quando levamos em consideração a concentração, 400 $\mu\text{L/mL}$ de nanopartículas parece ter colaborado com a diminuição da produção de ROS. A formação de espécies reativas de oxigênio pode ser gerada por meio de diferentes mecanismos, como o aumento metabólico oxidativo, estresse osmótico (CASTRO et al., 2011), ou mesmo alterações nos mecanismos de defesa celular como dos antioxidantes, que protegem as células da peroxidação lipídica (RIBEIRO et al., 2005). A presença de espécies reativas de oxigênio em excesso tende a causar alterações celulares como danos nas membranas celulares. A intensidade de fluorescência está relacionada a quantidade de peróxidos presentes no tecido quanto maior for a intensidade de fluorescência, presença de DCF, mais DCFH foi oxidado por EROs (GLEBSKA; KOPPENOL, 2003).

Através de um mecanismo de ação ainda desconhecido, o cultivo tridimensional na concentração de 400 $\mu\text{L/mL}$ pode ter favorecido a manutenção da integridade da membrana celular. Sabe-se que logo após a remoção dos ovários o aporte de oxigênio e consequentemente fluxo sanguíneo é suprimido, levando a um aumento no processo de degeneração celular

(WONGSRIKEO et al., 2005). A redução da oxigenação celular diminui a produção de ATP celular afetando diretamente a permeabilidade das membranas celulares alterando o fluxo de Na^+ para o citoplasma, ativa a Na^+/K^+ ATPase, que muda a distribuição de Ca^{++} fazendo com que a água intracelular se eleve (ALBERTS et al., 2013), podendo resultar em aumento do volume da célula, formação de vacúolo no citoplasma e degeneração, até chegar a morte celular (BARROS et al., 2001). . Estudo prévio, (Lee et al., 2013) demonstrou que o cultivo 3D com nanopartículas e hidrogéis de sílica diminuiu a degeneração celular e aumentou a viabilidade de células de tecido neural.

O Cultivo tridimensional com as nanopartículas parece ter favorecido mecanismos de controles apoptóticos, fazendo com que esse tratamento apresentasse menor taxa quando comparado aos outros. Diferente da morte celular por degeneração e necrose, a apoptose ou morte celular programada é essencial para a manutenção e desenvolvimento tecidual, este processo pode eliminar células defeituosas e ajudar a manter a viabilidade celular. Durante esse processo a célula passa por mecanismos como a retração, perda da aderência da matriz celular e células circundantes, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Os ovócitos são mais sensíveis aos efeitos do apoptose, o desenvolvimento do folículo aumenta sua resistência, e os processos inerentes a célula podem ocorrer primeiro primeiro nas células da granulosa (MORITA e TILLY, 1999). Células cultivadas em arquitetura tridimensional mostraram diferenças na resistência à apoptose e quimioterápicos quando comparados às culturas convencionais (WEAVER et al., 2002).

9 CONCLUSÃO

Por fim, os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a utilização do sistema de cultivo tridimensional por levitação magnética, aliado à presença de nanopartículas, demonstrou-se eficaz na preservação da morfologia dos folículos ovarianos durante o cultivo *in vitro*. Observou-se que esse modelo possibilita a manutenção da integridade estrutural do tecido ovariano, especialmente no que diz respeito à organização das células da granulosa e à conservação do ovócito central.

Adicionalmente, verificou-se uma correlação positiva entre a concentração de nanopartículas utilizadas e o grau de preservação morfológica dos folículos, sugerindo que o aprimoramento da densidade dessas partículas pode potencializar os efeitos benéficos do sistema tridimensional. Esse achado reforça a hipótese de que a simulação de um microambiente mais próximo das condições *in vivo* — promovida pela levitação celular — é fundamental para o sucesso de culturas prolongadas de tecido ovariano.

Dessa forma, conclui-se que a associação entre levitação magnética e nanopartículas representa uma alternativa promissora para protocolos de cultivo de folículos pré-antrais, abrindo novas possibilidades para a preservação da fertilidade, reprodução assistida e avanço nas pesquisas sobre dinâmica folicular em modelos animais e, futuramente, em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABDI, S., SALEHNIA, M., & HOSSEINKHANI, S. Quality of Oocytes Derived from Vitrified Ovarian Follicles Cultured in Two- and Three-Dimensional Culture System in the Presence and Absence of Kit Ligand. **Biopreservation and biobanking**, v.14, n.4, p.279-288, 2016.
- ADONA, P. R., MONZANI, P. S., GUEMRA, S., DOS SANTOS MIRANDA, M., & OHASHI, O. M. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n.3, 2015.
- ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A.D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WALTER, P. **Essential cell biology**. Garland Science, 4th, 2013.
- ALMANY, L.; SELIKTAR, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. **Biomaterials**, v.26, n.15, p. 2467-2477, 2005.
- AMORIM, C. A.; Van LANGENDONCKT, A.; DAVID, A.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and *in vitro* culture in a calcium alginate matrix. **Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 92-99, 2009.
- AMOS, W.B; WHITE, J.G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell*, v.95, p. 335-42, 2003.
- ANDERSEN, T.; STRAND, B.L.; FORMO, K.; ALSBERG, E.; CHRISTENSEN, B.E. Alginates as Biomaterials in Tissue Engineering. In Carbohydrate Chemistry. **The Royal Society of Chemistry**. Cambridge, UK; v.37, n. 9, 2012.
- ANDERSEN, T.; AUK-EMBLEM, P.; DORNISH, M. 3D cell culture in alginate hydrogels. **Microarrays**, v.4 n.2, p.133-161, 2015.
- APOLLONI, L.B., BRUNO, J.B., ALVES, B.G., DE FIGUEIREDO, J.R. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 01-15, 2016.
- ARAÚJO, V.R., SILVA, C.M., MAGALHÃES, D.M., SILVA, G.M.D., BÁO, S.N., SILVA, J.R.V., FIGUEIREDO, J.R.D., RODRIGUES, A.P.R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 305–310, 2010.
- ARAÚJO, V.R., GASTAL, M.O., FIGUEIREDO, J.R., GASTAL, E.L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, p. 78, 2014a.
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. *In vitro* development of bovine secondary follicles in two- and threedimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1246–53, 2014b.
- BÁRCENA, C., SRA, A. K., GAO, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. In **Nanoscale magnetic materials and applications**. Springer, Boston, MA, p. 591-626, 2009.

BARROS, L.F., HERMOSILLA, T. AND CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.130, n.3, p.401-409, 2001.

BELLI, M., VIGONE, G., MERICO, V., REDI, C. A., ZUCCOTTI, M., GARAGNA, S. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. **International Journal of Developmental Biology**, v.56, n.10-11-12, p. 931-937, 2013.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro-a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **In Seminars in cancer biology**, vol. 15, no. 5, pp. 405-412. Academic Press, 2005.

BRITO, I. R., LIMA, I. M., XU, M., SHEA, L. D., WOODRUFF, T. K., FIGUEIREDO, J. R. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 7, p. 915-930, 2014.

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.

CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FOGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.

CELESTINO, J.J.H., BRUNO, J.B., SARAIVA, M.V.A., ROCHA, R.M., BRITO, I.R., DUARTE, A.B.G., ARAÚJO, V.R., SILVA, C.M., MATOS, M.H.T., CAMPELLO, C.C. AND SILVA, J.R.V. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res**, v. 344, p. 539–550, 2011

CHEN, X., ZHONG.Z.; XU, Z; CHEN. L.; WANG, Y.2' ,7'-Dichlorodihydrofl uorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 587–604, 2010.

CHOI, J.K., AGARWAL, P., HUANG, H., ZHAO, S., HE, X. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. **Biomaterials**, v. 35, n. 19, p. 5122–5128, 2014.

CUNHA, M. S. C., MARQUES, M. G., LIMA, A. S., NICACIO, A. C., ASSUMPÇÃO, M. E. O. D., & VISINTIN, J. A. Influência da temperatura de fecundação in vitro e das células do cumulus oophorus sobre a taxa de polispermia e desenvolvimento embrionário. **CiênciaAnimal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 301–306, 2010.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v.19, n.5, p.336-344, 2012.

DE CÁSSIA ANTONINO D., SOARES, M. M., DE MELO JÚNIOR, J., DE ALVARENGA, P. B., MOHALLEM, R. D. F. F., ROCHA, C. D., ... & JACOMINI, J. O. Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive biomedicine online**, v. 38, n. 3, p. 300-311, 2019.

DESAI, N., ALEX, A., ABDELHAFEZ, F., CALABRO, A., GOLDFARB, J., FLEISCHMAN, A., FALCONE, T. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 119, 2010.

DOBSON, J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, v. 3, n. 3, p. 139–143, 2008. EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.

EDMONDSON, R., BROGLIE, J. J., ADCOCK, A. F., & YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v.12, n.4,p.207-218, 2014.

FABRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCA, M.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v.101, n.3, p. 795-804, 2014.

FIGUEIREDO, J. R.; AMORIM, C. A.; LUCCI C. M.; GONÇALVES, P.B.D. Utilização do potencial de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciência Animal**, v. 8, n. 1, p. 23–29, 1998.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotecnia de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v. 9, n. 1, p. 11–25, 1999.

FIGUEIREDO, J. R. Bioética: repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Ciências Veterinária nos Trópicos**. v.1, n. 1, p. 116-118., 2008.

GLEBSKA, J.; KOPPENOL, W. H. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 676-682, 2003.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016.

HAFEZ, E. S. E., Anatomia da reprodução feminina. In Hafez, E. S. E. **Reprodução animal**, 7 ed. p.582, São Paulo, Manole, 2004.

HAISLER, W. L., TIMM, D. M., GAGE, J. A., TSENG, H., KILLIAN, T. C., & SOUZA, G. R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–9, 2013.

HIGUCHI, C. M., MAEDA, Y., HORIUCHI, T., & YAMAZAKI, Y. A simplified method for three-dimensional (3-D) ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. **PloS one**, v.10, n.11, e0143114, 2015.

HUGHES, C. S.; POSTOVIT, L. M.; LAJOIE, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. **Proteomics**, v.10, n.9, p.1886-1890, 2010.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; De BELS, F.; AMEISEN, J.C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunology.Methods**, v. 185, p. 249–258, 1995.

JAGANATHAN, H., GAGE, J., LEONARD, F., SRINIVASAN, S., SOUZA, G. R., DAVE, B., GODIN, B. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific reports**, v.4(6468), 2014.

KUZNETSOV, A.V., KEHRER, I., KOZLOV, A.V., HALLER, M., REDL, H., HERMANN, M., GRIMM, M. AND TROPPEMAIR, J. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v.400, n.8, p.2383-2390, 2011.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487–492, 2004.

LEE, J., LILLY, G. D., DOTY, R. C., PODSIADLO, P., KOTOV, N. A. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. **Small**, v.5, n.10, p.1213-1221, 2009.

LEE, J.H., PARK, J.H., ELTOHAMY, M., PEREZ, R., LEE, E.J. AND KIM, H.W. Collagen gel combined with mesoporous nanoparticles loading nerve growth factor as a feasible therapeutic three-dimensional depot for neural tissue engineering. **RSC Advances**, v.3, n.46, p.202-214, 2013.

LI, Y., FENG, H. L., CAO, Y. J., ZHENG, G. J., YANG, Y., MULLEN, S., CHEN, Z. J. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. **Fertility and Sterility**, v.85, n.4, p.827-832, 2006.

LIMA, I. M. Desenvolvimento in vitro de Folículos Pré-antrais Caprinos na Presença de Kit Ligand (KL) e Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15). Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE, 2012. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-8250>> Acesso em 29 de fev.2020.

LIMA, L. F., BRUNO, J. B., DA SILVA, A. M. S., DUARTE, A. B. G., DE FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P. R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p. 93-104, 2016.

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; SINGH, J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 45–53, 2005.

MATOVA, N.; COOLEY, L. Comparative aspects of animal oogenesis. **Developmental biology**, v. 231, n. 2, p. 291-320, 2001.

MATOS, M.H.T., SILVA, J.R.V., RODRIGUES, A.P.R., FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p. 433–442, 2007.

MORITA, A. Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis, p. Like sand through and hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

NELSON S.M, TELFER E.E, ANDERSON R.A. The ageing ovary and uterus: new biological insights. **Hum Reprod Update**, v.19, p.67–83, 2013.

NEUBERGER, T., SCHÖPF, B., HOFMANN, H., HOFMANN, M., VON RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 293, n. 1, p. 483–496, 2005.

PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K., & DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles. In **Journal of physics D: Applied physics**, v.36, n.13, p.167, 2003.

PASOLD, J., ZANDER, K., HESKAMP, B., GRUETTNER, C., LÜTHEN, F., TISCHER, T., ... & BADER, Positive impact of IGF-1-coupled nanoparticles on the differentiation potential of human chondrocytes cultured on collagen scaffolds. **International journal of**

nanomedicine, v.10, p.1131, 2015.

PAUL, A., MANOHARAN, V., KRAFFT, D., ASSMANN, A., UQUILLAS, J.A., SHIN, S.R., HASAN, A., HUSSAIN, M.A., MEMIC, A., GAHARWAR, A.K. AND KHADEMHOSEINI, A. Nanoengineered biomimetic hydrogels for guiding human stem cell osteogenesis in three dimensional microenvironments. **Journal of Materials Chemistry B**, v.4, n.20, p.44-54, 2016.

PEREIRA, S.H.; COUTINHO, D.S.; MATOS, A.F.; JUNIOR, S.; FABRINO, D.L. Three-dimensional cell culture, opportunities and challenges for bioprocess engineers. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 6, p. 263-277, 2016.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703-715, 2008.

RIBEIRO, S. M. R., DE QUEIROZ, J. H., PELUZIO, M. D. C. G., COSTA, N. M. B., DA MATTA, S. L. P., DE QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience journal**, v. 21, n. 3, 2005.

RODRIGUES, A. P. R., DONFACK, N. J., BRUNO, J. B., RODRIGUES, G. Q., DE SOUSA, F. G. C. Criopreservação do tecido ovariano visando restaurar a fertilidade humana. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.40, n.4, p.188-193, 2016.

ROSSETTO, R., SARAIVA, M.V.A., DOS SANTOS, R.R., DA SILVA, C.M.G., FAUSTINO, L.R., CHAVES, R.N., BRITO, I.R., RODRIGUES, G.Q., LIMA, I.M.T., DONATO, M.A.M. AND PEIXOTO, C.A. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine preantral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, Cambridge, England, v. 21, n. 2, p. 125–8, 2013.

ROWLEY, J.A.; MADLAMBYAN, G.; MOONEY, D.J. Alginate Hydrogels As Synthetic Extracellular Matrix Materials. **Biomaterials**, 20, 45–53, 1999.

SCARAMUZZI, R.J.; RADFORD, H. M. Factors regulating ovulation rate in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.69, p.353-367, 1983.

SILVA, G. M. et al. In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 4, p. 475–84, 2015.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, 76, p. 1051- 1057, 2011.

SHIKANOV, A., XU, M., WOODRUFF, T.K., SHEA, L.D. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. **Biomaterials**, v.30, p.5476–5485, 2009.

SHIKANOV, A., SMITH, R.M., XU, M., WOODRUFF, T.K. AND SHEA, L.D. Hydrogel network design using multifunctional macromers to coordinate tissue maturation in ovarian follicle culture. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2524–2531, 2011.

SOUZA, G.R.; MOLINA, J.R.; RAPHAEL, R.M.; OZAWA, M.G.; STARK, D.J.; LEVIN, C.S.; BRONK, L.F.; ANANTA, J.S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M.M.; BANKSON, J.A. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–6, 2010.

TAGLER, D. et al. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 11–12, p. 1229–38, 2012.

TELFER, E.E., MCLAUGHLIN, M., DING, C., THONG, K.J. A two-step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v.23, p.1151–1158, 2008.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M. Strategies to support human oocyte development in vitro. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 901–907, 2012.

THIBODEAU, G.A. ; PATTON, K.T. **Estrutura e funções do corpo humano**. Editora Manole Ltda. 1 edição, p.408-468, 2002.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and bioengineering**, v.103, n.4, p.655-663, 2009.

WEST, E. R.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. **Biomaterials**, v. 28, p. 4439-4448, 2007.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; AGUNG, B.; NIL, M., NAGAI, T. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 87–97, 2005.

XU, M. et al. Encapsulated Three-Dimensional Culture Supports Development of Nonhuman Primate Secondary Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 587–594, 2009.

ZHAO, D., LEGHARI, I. H., LI, J., MI, Y., & ZHANG, C. Isolation and culture of chicken growing follicles in 2-and 3-dimensional models. **Theriogenology**, v. 111, p. 43-51, 2018.

ZAMPOLLA, T.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicle viability by simultaneous stain-ing with fluorescein diacetate and propidium iodide. **Cryo Letters**, v. 29, p. 463–75, 2008.