

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GIOVANNA FARIA DE MORAES

**XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FETAL BOVINO: VANTAGENS E
DESAFIOS PARA PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DO GAMETA E PARA
INCREMENTO DO GANHO GENÉTICO**

UBERLÂNDIA

2019

GIOVANNA FARIA DE MORAES

XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FETAL BOVINO: VANTAGENS E
DESAFIOS PARA PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DO GAMETA E PARA
INCREMENTO DO GANHO GENÉTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências Veterinárias, da Faculdade de
Medicina Veterinária, Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

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

Coorientador (a): Prof. Dra. Kele Amaral Alves

UBERLÂNDIA

2019

GIOVANNA FARIA DE MORAES

XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FETAL BOVINO: VANTAGENS E
DESAFIOS PARA PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DO GAMETA E PARA
INCREMENTO DO GANHO GENÉTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências Veterinárias, da Faculdade de
Medicina Veterinária, Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Uberlândia, 30 de setembro de 2019.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos
(Orientadora – UFU)

Prof. Dr. Benner Geraldo Alves
(Examinador – UFJ)

Prof. Dr. José Octávio Jacomini
(Examinador – UFU)

Prof. Dra. Rute Magalhães Brito
(Examinadora – UFU)

Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
(Examinadora – UECE)



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:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/009/2019				
Data:	30 de setembro de 2019	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	12:30
Matrícula do Discente:	11713VET002				
Nome do Discente:	GIOVANNA FARIA DE MORAES				
Título do Trabalho:	XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FETAL BOVINO: VANTAGENS E DESAFIOS PARA PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DO GAMETA E PARA INCREMENTO DO GANHO GENÉTICO				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DOS REBANHOS BOVINOS				

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: José Octávio Jacomini - UFU; Rute Magalhães Brito - UFU; Benner Geraldo Alves - UFG; Ana Paula Ribeiro Rodrigues - UECE; Ricarda Maria dos Santos orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ricarda Maria dos Santos, 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):

Aprovada.

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

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 01/10/2019, às 09:02, 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 **José Octavio Jacomini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/10/2019, às 10:30, 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 **Rute Magalhães Brito, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/10/2019, às 14:51, 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 08/10/2019, às 10:07, 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 **ANA PAULA RIBEIRO RODRIGUES, Usuário Externo**, em 11/10/2019, às 11:46, 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 **1580196** e o código CRC **F14560CE**.

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

M827
2019
Moraes, Giovanna Faria de, 1991-
XENOTRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO FETAL BOVINO:
VANTAGENS E DESAFIOS PARA PRESERVAÇÃO DA VIABILIDADE DO
GAMETA E PARA INCREMENTO DO GANHO GENÉTICO [recurso
eletrônico] / Giovanna Faria de Moraes. - 2019.

Orientadora: Ricarda Maria dos Santos.

Coorientadora: Kele Amaral Alves .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2402>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Maria dos Santos , Ricarda , 1972-, (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

DEDICATÓRIA

***Aos animais que participaram desta pesquisa. Com sua
humildade me ensinaram tanto. Suas vidas, essenciais
para ciência, estão aqui para sempre eternizadas.***

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora e amiga, Ricarda Maria dos Santos, que desde o início confiou no meu potencial. Sua força, dedicação e inteligência são fontes de inspiração para mim. Obrigada pela honra de ser sua orientada. A minha super coorientadora e amiga, Kele Alves Amaral, que me passou em 2 anos e meio ensinamentos profissionais e pessoais que levarei para toda a vida. Sua paixão pela pesquisa me ensinou a curtir com responsabilidade cada processo do nosso estudo. A vocês, Ricarda e Kele, minha admiração e agradecimento por toda a confiança depositada, pelas oportunidades concedidas, pela paciência e dedicação ao meu aprendizado.

Aos meus maravilhosos pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram, concedendo-me a oportunidade de estudar e desenvolver esse trabalho. Ao papai, agradeço os finais de semana em que me acompanhou no laboratório, as tardes corrigindo provas e lançando planilhas. A mamãe, agradeço por sempre deixar tudo a minha volta em perfeita ordem, para que eu pudesse me dedicar a pesquisa. Vocês, que foram os principais leitores da minha tese, fizeram esse trabalho comigo e me deram forças para perseverar. A vovó Mariinha e ao vovô João, meus amores e minhas companhias prediletas, que por tantas noites escutaram o passo a passo da minha pesquisa, vendo fotos e artigos com mais interesse do que eu jamais pude imaginar. A vovó Arlette, sempre em orações pela minha conquista, com palavras de conforto.

Ao meu namorado, João Paulo, que por tantas vezes me incentivou quando eu estava desanimada com tantas atividades do doutorado e do trabalho. Mesmo sem acreditar como era possível fazer essa pesquisa, sempre esteve ao meu lado, sendo a tranquilidade e a risada dos momentos difíceis. A tia Katia, que sempre confiou em mim. Seu interesse pelo desenvolvimento do meu trabalho e suas orações para que tudo desse certo, foram essenciais. A minha irmã Florença e ao meu cunhado Gabriel, sempre na torcida, com palavras de incentivo. A todos os meus demais familiares e amigos, em especial tio Rodrigo, tia Kellinha, Bárbara, Jeziel, Anaís, Paula, Fernanda, Filipe, Gustavo e Carol. O apoio e a confiança de vocês foram em muitos momentos minha única certeza, meu combustível.

À Célia, secretária do nosso programa de pós-graduação, terapeuta dos alunos, amiga e confidente, sempre tão prestativa e eficiente. À professora Teresinha, sempre firme e doce em seus propósitos, com palavras de incentivo sempre que precisei.

A toda equipe do laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, professores, doutorandos, mestrandos, IC's, estagiários e principalmente parceiros e amigos que também são responsáveis por esse trabalho. Em especial, agradeço a Graci, a Mayara, a

Paula, a Bia, a Bruna, o Elso e o Juliano, parceiros de experimentos, que tornaram essa jornada mais leve e agradável, mesmo quando começávamos a trabalhar às 5:00 da manhã e almoçávamos um salgado às 16:00, para depois organizarmos o laboratório para réplica do dia seguinte.

A professora Rute, que acreditou no meu trabalho e também apostou nessa ideia nos auxiliando e ensinando com paciência e educação. Eu, que já a admirava tanto, hoje me inspiro nessa profissional incrível. Ao professor Robson e toda equipe do laboratório de Citogenética da UFU. A equipe do Laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem (LAMOVI) da UFU A equipe do LAMOFOPA, da Universidade Estadual do Ceará. Em especial ao Yago, que mesmo de longe se tornou um amigo com palavras de conforto e atitudes sensatas. A Mari, do laboratório de Confocal, sempre gentil e prestativa.

Aos funcionários do frigorífico Luciana, que tão bem me receberam e tornaram essa pesquisa possível. Agradeço imensamente ao Sr. Valmir Tunala, ao Sr Fernando (Birica) e a Claudia. Aos funcionários da Rede de Biotérios – UFU. Ao Kyvio e sua equipe, que nos auxiliaram com a confecção das lâminas histológicas.

Aos meus queridos professores e funcionários da FAMEV, em especial ao Leo, ao Prof. Dr. Adriano, ao Prof. Dr. Cirilo, ao Prof. Dr. Joãozinho, a Prof. Dra. Carina, a Profa. Dra. Mara, a Profa. Dra. Kênia, ao Prof. Dr. Robson, a Profa. Dra. Bia e a minha amiga e Profa. Dra. Natascha. Hoje, tenho a honra de tê-los também como colegas de trabalho, aos quais agradeço os ensinamentos, a confiança, a torcida e a companhia. Aos meus queridos alunos dos cursos de Medicina Veterinária, Agronomia e Zootecnia. Com vocês eu ensino e aprendo diariamente sobre genética, estatística, melhoramento e reprodução animal, mas principalmente, aprendo sobre respeitar a individualidade do ser humano e potencializar a capacidade e o dom de cada um. Vocês foram minha fonte de inspiração nos momentos de desânimo.

À CAPES e a FAPEMIG pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Acima de tudo, agradeço profundamente a Deus, pela oportunidade de realizar este trabalho, e pela honra de ter pessoas tão especiais ao meu lado. Nenhuma palavra poderá expressar minha gratidão e felicidade por essa jornada. Muito obrigada.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade porque ele se tornará assim, uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. ”

(Albert Einstein)

RESUMO

A utilização do xenotransplante de tecido ovariano fetal bovino pode permitir a otimização do aproveitamento do material genético de animais de alto valor zootécnico antes mesmo do seu nascimento, como em casos de morte da vaca prenhe no final da gestação. Ao utilizar esse tecido espera-se bons resultados de viabilidade folicular, pois nessa fase, os ovários possuem maior reserva de folículos primordiais, que são mais tolerantes às biotecnologias de criopreservação, como a vitrificação. Tendo em vista a aplicabilidade da vitrificação e do xenotransplante como métodos de preservação do potencial reprodutivo, nota-se a importância de estudar possíveis alterações genéticas decorrentes dessas técnicas. Objetivou-se, no primeiro artigo, após cultivo *in vitro* e *in vivo* (xenotransplante) de tecido ovariano de fetos bovinos, avaliar a morfologia e a capacidade de desenvolvimento dos folículos pré-antrais, e ainda, o estresse oxidativo e os níveis de degeneração celular e apoptose no tecido, e no segundo artigo, avaliar após vitrificação e/ou xenotransplante de tecido ovariano de fetos bovinos alterações cromossômicas morfológicas nas células teciduais, além da morfologia e a capacidade de desenvolvimento dos folículos pré-antrais. Grupos de cultivo *in vivo* (xenotransplante) foram eficientes na manutenção da viabilidade folicular e estimularam desenvolvimento folicular moderado além de apresentarem redução dos níveis de degeneração celular e de espécies reativas de oxigênio, comparado àqueles do grupo controle fresco. O tecido recuperado após 14 dias apresentou maiores escores de morfologia, aderência e hemorragia do que aqueles submetidos a recuperação após 7 dias. A recuperação de fragmentos após 14 dias xenotransplantados, apresenta bons resultados na manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano fetal bovino, e fornece suporte ao crescimento folicular. Fragmentos submetidos a vitrificação e/ou xenotransplante apresentaram maior quantidade de células com micronúcleos, comparados ao grupo controle fresco. Os escores de morfologia, aderência e hemorragia entre os fragmentos submetidos a xenotransplante a fresco e aqueles submetidos ao vitrificação anterior ao xenotransplante foram semelhantes. Houve manutenção da reserva folicular, entretanto, o xenotransplante e a vitrificação são capazes de gerar danos a estrutura do DNA em células do tecido ovariano de fetos bovinos.

Palavras chave: Citogenética, cultivo, folículo ovariano, vitrificação

ABSTRACT

The use of foetal bovine ovaries tissue xenograft may allow optimization in utilization of genetic material of animals of high genetic merit even before birth, as in the case of cow death before the end of gestation. By using this tissue, good follicular viability results are expected, since at this stage, the ovaries have a greater reserve of primordial follicles, which are even more tolerant to cryopreservation biotechnologies, such as vitrification. Given the applicability of vitrification and xenotransplantation as methods of preserving the reproductive potential, it is important to study possible genetic alterations resulting from these techniques. The objective of the first article was to evaluate, after *in vitro* and *in vivo* (xenograft) culture of foetal bovine ovarie tissue, the morphology and developmental capacity of the preantral follicles, as well as the oxidative stress and the levels of Cell degeneration and tissue apoptosis; and in the second article, to evaluate after vitrification and/or xenograft of foetal bovine ovarie tissue morphological chromosomal changes in tissue cells, in addition to the morphology and developmental capacity of preantral follicles. *In vivo* cultivation groups (xenograft) were effective in maintaining follicular viability, stimulated moderate follicular development and reduced levels of cells degeneration and reactive oxygen species compared to those in the fresh control group. Tissue recovered after 14 days had higher morphology, adherence, and hemorrhage scores than those undergoing recovery after 7 days. The recovery of fragments after 14 days xenotransplanted, has good results in maintaining the viability of preantral follicles included in bovine fetal ovarian tissue, and provides support for follicular growth. Fragments submitted to vitrification and/or xenotransplantation showed an increase in the number of cells with micronuclei, compared to the fresh control group. The morphology, adherence, and hemorrhage scores between fragments submitted to fresh xenograft and those submitted to vitrification prior to xenograft were similar. Follicular reserve was maintained, however, xenotransplantation and vitrification are able to generate structure DNA damages in the ovarian tissue cells of bovine fetuses.

Key words: Cytogenetics, culture, ovarian follicle, vitrification

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1. Introdução	16
2. Objetivos	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. Revisão de Literatura	17
3.1 Ovogênese e foliculogênese	17
3.2 Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)...	20
3.3 Xenotransplante	21
3.3.1 Xenotransplante de tecido ovariano fetal	22
3.4 Criopreservação – Vitrificação.....	23
3.5 Alterações citogenéticas	25
REFERÊNCIAS	27

CAPÍTULO 2 – Avaliação de córtex ovariano de fetos bovinos submetido a xenotransplante.....	33
1. Introdução.....	34
2. Metodologia	35
3. Resultados	39
4. Discussão.....	44
5. Conclusão	46
Agradecimentos.....	46
REFERÊNCIAS	46

**CAPÍTULO 3 - Cytogenetic evaluation of bovine foetal ovarian cortex
xenotransplanted after vitrification..... 49**

1. Introduction	50
2. Methodology	51
3. Results	55
4. Discussion	60
5. Conclusion.....	63
Acknowledgment	64
References	64

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1 - Ovário de mamíferos e suas principais estruturas envolvidas.....	20
Figura 2 - Tecido ovariano humano enxertado em músculo das costas de camundongos SCID ovariectomizados (A), com formação de vasos sanguíneos entre o fragmento de tecido e o sítio enxertado (setas) (B).....	22
Figura 3 - Esquema ilustrativo de palheta francesa preenchida com solução de vitrificação e fragmentos de tecidos ovarianos intercaladas por colunas de ar e extremidade vedadas com massa acrílica.....	24
Figura 4 - Representação esquemática da formação de micronúcleos originários de um cromossomo em células mononucleares.....	26
Figura 5 - Estrutura química do corante Hoechst 3325.....	26

CAPÍTULO 2 – Avaliação de córtex ovariano de fetos bovinos submetido a Xenotransplante

Figura 1- Desenho experimental - Avaliação de tecido ovariano de fetos bovinos submetido a Xenotransplante.....	36
Figura 2 – Fragmentos de tecido ovariano fetal bovino recuperados após 7 e 14 dias de xenotransplante, respectivamente.....	40
Figura 3 – Secção histológica de fragmento do grupo CF com folículos em diversos estágios de desenvolvimento e viabilidade.....	42
Figura 4 – Análise de correlação entre número de vasos sanguíneos no tecido ovariano fetal e o	

número de dias de cultivo; o percentual de folículos ativados; o percentual de folículos primordiais e o percentual de viabilidade folicular 43

CAPÍTULO 3 - Cytogenetic evaluation of bovine foetal ovarian cortex xenotransplanted after vitrification

Figure 1: Detection of micronuclei with the Hoechst 33258 fluorochrome in cells of bovine foetuses ovarian tissue fragments subjected to different treatments.....59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Avaliação de córtex ovariano de fetos bovinos submetido a Xenotransplante

Tabela 1 – Escores de morfologia, aderência e hemorragia, após 7 ou 14 dias para recuperação dos fragmentos de tecido ovariano fetal bovino xenotransplantados.....40

Tabela 2 - Proporção de viabilidade e ativação folicular, e número de vasos sanguíneos por secção histológica em tecido ovariano fetal bovino, de acordo com os tratamentos analisados.....41

Tabela 3 - Médias ($\pm$ EP) das intensidades de fluorescência captadas com as probes IP, DCF e YOPRO no tecido ovariano fetal analisado a fresco ou xenotransplantado por 7 ou 14 dias.....44

CAPÍTULO 3 - Cytogenetic evaluation of bovine foetal ovarian cortex xenotransplanted after vitrification

Table 1 – Morphology, adherence, and haemorrhage scores of foetal bovine ovarian tissue fragments undergoing fresh xenotransplantation or xenografted after vitrification.....55

Table 2 – Correlations among morphology, adherence, and haemorrhage scores of foetal bovine ovarian tissue fragments after xenotransplantation.....56

Table 3 - Percentage viability, follicular activation, and number of blood vessels in histological sections of bovine foetal ovarian tissues subjected to various treatments.....57

Table 4 - Odds Ratio analysis for follicular viability in bovine foetal ovarian tissues assessed among treatments.....58

Table 5 - Odds Ratio analysis for follicular activation of bovine foetal ovarian tissues between the analysed treatments.....58

Table 6 – Number (mean $\pm$ SE) of cells with micronuclei (MN) in bovine foetal ovarian tissue fragments subjected to different treatments.....	60
--	----

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas referentes a dinâmica ovariana pré-antral e desenvolvimento folicular durante a vida fetal em espécies de interesse zootécnico, objetivam o aproveitamento do estoque desses folículos (ALVES, 2014). A conservação do tecido ovariano fetal bovino contribui para a manutenção da intenção evolutiva, mesmo que este feto, posteriormente, não seja compatível com a vida, como em casos em que fêmea prenhe venha a óbito no final da gestação (MORAES et al., 2018). Para tanto, biotecnologias reprodutivas são essenciais, pois viabilizam o cultivo *in vitro* ou *in vivo* de folículos, que posteriormente terão condições de produzirem ovócitos para serem submetidos a protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE).

O xenotransplante de tecido ovariano, surge então como promissora biotecnologia reprodutiva, pois consiste na coleta de tecido de uma espécie e inserção desse realizada em um receptor de uma espécie distinta (AUBARD, 2003). Quando realizado com tecido ovariano fetal de fêmeas bovinas, o xenotransplante permite a otimização no aproveitamento do material genético de animais de alto valor zootécnico antes mesmo do seu nascimento, ou que as mães gestantes vieram a óbito antes do final da gestação (MORAES et al., 2018). O xenotransplante de tecido ovariano fetal pode então, viabilizar o cultivo *in vivo* de folículos ovarianos em outra espécie receptora (FIGUEIREDO et al., 2008). Dessa forma, o feto poderá ser utilizado como reprodutora e, conseqüentemente, pode-se diminuir o intervalo de gerações e, assim, aumentar estimativas de ganho genético de características de interesse para a evolução genética dos rebanhos.

Ao passar por xenotransplante, o tecido ovariano é submetido a desafios para que consiga se manter viável. Os enxertos, segundo Liu et al. (2002), levam alguns dias para receberem neovascularização, e assim adequado aporte de oxigênio e nutrientes, o que pode causar perda massiva de folículos. Entretanto, espera-se que ao utilizar tecido fetal obtenha-se melhores resultados de viabilidade folicular, pois nessa fase, os ovários possuem maior reserva de folículos primordiais (FORTUNE, 2003). Tais folículos são ainda, mais tolerantes às biotecnologias de criopreservação, como a vitrificação, dado o seu pequeno tamanho e morfologia relativamente inespecífica, permitindo que haja satisfatória preservação tecidual. Essas características definem um baixo metabolismo, em

comparação ao que é observado nas fêmeas adultas, com menor consumo de oxigênio (PARIS et al., 2004).

Bioteχνologias como a vitrificação e o xenotransplante, que objetivam a preservação da fertilidade, devem ser pautadas em estudos citogenéticos, como testes genotóxicos, que avaliam a capacidade que algumas circunstâncias têm de induzir alterações no material genético (KOLLING et al., 2006). Espera-se que tais estudos possam fornecer parâmetros de viabilidade da biotecnologia com segurança genética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a viabilidade tecidual, alterações cromossômicas e a morfologia e capacidade de desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos submetidos a xenotransplante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, após cultivo *in vitro* e após xenotransplante por 7 ou 14 dias de tecido ovariano de fetos bovinos, a morfologia e a capacidade de desenvolvimento dos folículos pré-antrais, e ainda o estresse oxidativo e os níveis de degeneração celular e apoptose no tecido (Capítulo 2).

Avaliar após vitrificação e/ou xenotransplante de tecido ovariano de fetos bovinos alterações cromossômicas morfológicas nas células teciduais, além da morfologia e a capacidade de desenvolvimento dos folículos pré-antrais (Capítulo 3).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ovogênese e foliculogênese

Com funções gametogênicas (produção e liberação de células germinativas, os ovócitos) (FIGUEIREDO et al., 1993) e endócrinas (produção de hormônios como o estrógeno e a progesterona) (FORTUNE, 2003), os ovários são os principais órgãos

reprodutivos das fêmeas, e possuem duas regiões principais, a córtex e a medular. Nos bovinos, a córtex, localizada na parte externa, é circundada pelo epitélio germinativo, onde estão os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2014), corpos lúteos e albicans (FIGUEIREDO et al., 1999). A medular, responsável pela sustentação, vascularização e inervação do órgão, está localizada na parte interna do ovário (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

Os processos que envolvem o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea até a formação do ovócito apto a ser fecundado, constituem a ovogênese (GONÇALVES et al., 2001). Na ovogênese, ainda na fase embrionária, as células germinativas primordiais migram para as gônadas em desenvolvimento e diferenciam-se em ovogônias, com proliferação celular, redistribuição das organelas citoplasmáticas e perda de características de motilidade (SADEU et al., 2006). Quando formadas, as ovogônias iniciam processo de meiose e diferenciam-se em ovócitos. Coincidentemente ao início da primeira divisão meiótica, os folículos primordiais emergem do final do cordão distal e consistem em um ovócito circundado por uma camada de células somáticas escamosas, denominadas então, de células da granulosa (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Ainda durante a fase fetal, na maioria dos mamíferos, há início da meiose ovocitária, após intensas mitoses. Fatores inibitórios presentes no fluido folicular e sintetizados pelas células da granulosa interrompem as divisões meióticas na sub-fase diplóteno da prófase I, em vesícula germinativa (MOTLIK et al, 1998; HURD et al, 2005). Nesse estágio, permanecem até a puberdade, sendo então, gradualmente mobilizados a partir da retomada da meiose, sob estímulo gonadotrófico, próximo à ovulação (HURD et al, 2005).

Já a foliculogênese é o processo de formação, crescimento e desenvolvimento folicular, que em bovinos, inicia durante a vida fetal, por volta dos 95 dias de gestação com a formação do folículo primordial (DINIZ et al., 2005). As fêmeas bovinas nascem com uma reserva de folículos primordiais (COSTA et al., 2001) que estará disponível por toda a vida reprodutiva (FIGUEIREDO et al, 2008).

Proporcionar um ambiente adequado para a manutenção da viabilidade, ativação, crescimento e maturação do ovócito é a função do folículo ovariano (GONÇALVES et al., 2001). Morfologicamente, são classificados como normais ou degenerados, sendo que os folículos normais apresentam o ovócito e o núcleo preservados e circundados por células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas. Os folículos degenerados apresentam

citoplasma retraído ou desorganizado, com células da granulosa separadas da membrana basal e ovócito com núcleo picnótico (FIGUEIREDO et al., 1999).

Já em relação ao seu desenvolvimento, os folículos ovarianos são classificados de acordo com o grau de evolução resultante do crescimento do ovócito e proliferação das células da granulosa, em um processo contínuo, porém não linear (GRIFFIN et al., 2006). Os folículos primordiais são estruturas não ativadas (quiescentes) nas quais os ovócitos são circundados por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso (Figura 1). A quantidade desses folículos diminui ao longo da vida reprodutiva, seja por ativação, apoptose, por necrose ou por atresia folicular. No processo de ativação desses folículos, as células da granulosa, antes pavimentosas, tornam-se cubóides e nesta fase os folículos são denominados de folículos de transição. Já os folículos primários possuem ao redor do ovócito, uma camada de células da granulosa, todas em formato cubóide (Figura 1). A formação de várias camadas de células em formato cubóide ao redor do ovócito ocorre por proliferação das células da granulosa, formando o folículo secundário (Figura 1) (RODGERS & IRVING-RODGERS, 2010). Nesses folículos, a zona pelúcida pode ser identificada, pois as fibras de tecido conjuntivo organizam-se paralelamente (GONÇALVES et al., 2001). Em sucessão, há os folículos antrais, que contêm área preenchida por fluido folicular, o antro, e compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré- ovulatórios.

O ovócito cresce e se desenvolve através de uma relação íntima e dependente das células somáticas adjacentes (GILCHRIST et al., 2004). Com o crescimento folicular e formação do antro, as células da granulosa se dividem em células do *cumulus oophorus* e células murais. As células do *cumulus* circundam e estão em contato direto com o ovócito, fornecendo nutrientes e sinais regulatórios que facilitam a progressão da maturação. Enquanto que as células murais formam a parede do folículo em um epitélio estratificado assentado em uma membrana basal (GILCHRIST et al., 2004).

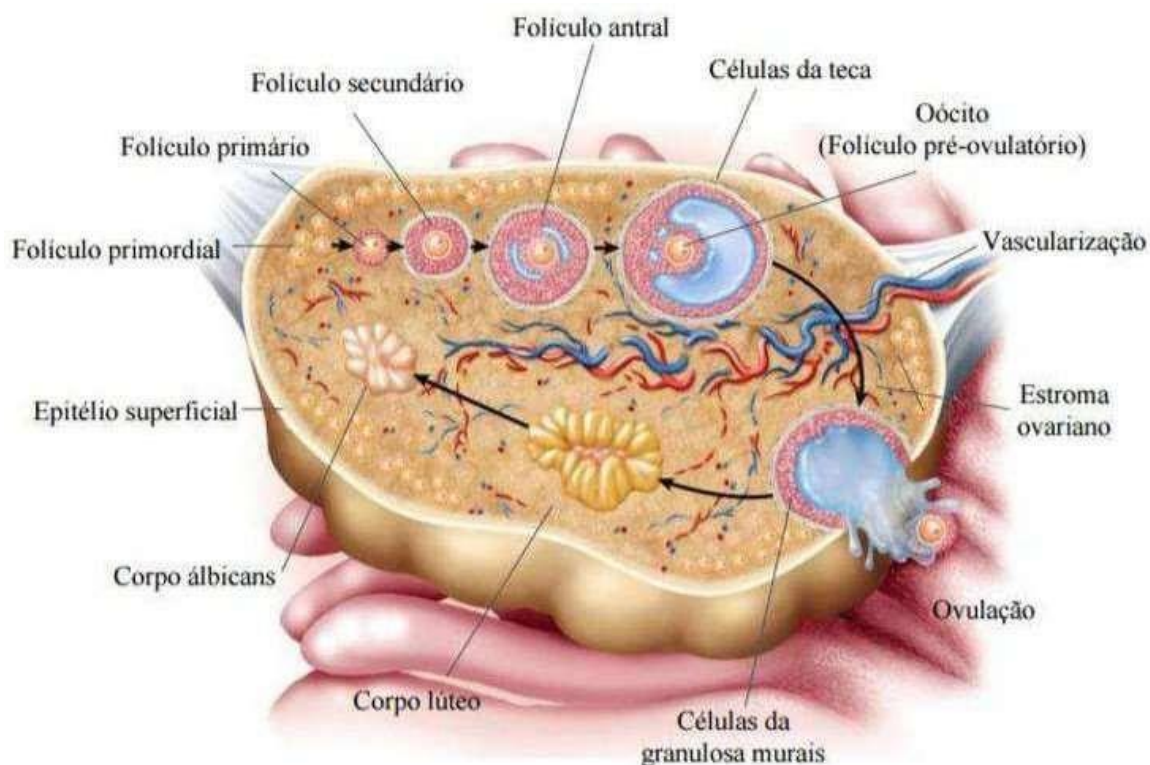


Figura 1 - Ovário de mamíferos e suas principais estruturas envolvidas. Fonte: CARVALHO et al. (2013)

O fluido folicular tem sua produção intensificada durante o desenvolvimento folicular, devido ao aumento da vascularização e permeabilidade dos vasos sanguíneos, consecutivamente ao aumento do diâmetro folicular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas e lipoproteínas são, então, substâncias regulatórias que chegam ao folículo por via hematogêna ou por secreções das células foliculares (ALVES et al., 2013).

3.2 Manipulação de ovócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)

Milhares de folículos pré antrais que são considerados o *pool* de reserva folicular das fêmeas, são encontrados nos ovários, todavia, apenas cerca de 0,1% desses conseguirão chegar à ovulação. O restante, 99,9%, serão perdidos por atresia folicular, o que torna subutilizado o potencial reprodutivo das fêmeas (ALVES, 2014). As biotecnologias intencionam então, o desenvolvimento de formas para o melhor aproveitamento deste material. Técnicas eficientes para o isolamento, conservação, manipulação e cultivo *in*

vitro de folículos e ovócitos após sua obtenção, são fundamentais para o sucesso reprodutivo de uma espécie. Alguns autores reportaram a produção de embriões com o cultivo de folículos pré-antrais em diversas espécies (suínos: WU et al., 2001; caprinos: MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012; camundongos: WANG et al., 2011).

A MOIFOPA propõe técnicas para disponibilização de um grande número de ovócitos oriundos de folículos pré antrais, para biotécnicas reprodutivas, como cultivo e posterior maturação (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV), para a produção *in vitro* de embriões (PIVE), (FIGUEIREDO et al., 2008). Com o objetivo de estocar, ativar e promover crescimento e maturação dos folículos do estágio primordial até o pré-ovulatório, a MOIFOPA pode ser associada a biotecnologias como a criopreservação e o transplante ovariano, e assim, viabilizar a reprodução de genótipos desejáveis em uma população de interesse zootécnico, por incentivar maior uso de fêmeas de alto mérito genético, além de preservar e auxiliar na reprodução de espécies ameaçadas de extinção.

3.3 Xenotransplante

A utilização do autotransplante é justificável em casos de infertilidade adquirida e como suporte a pesquisas, enquanto que o alotransplante (transplante entre animais da mesma espécie) necessitaria de compatibilidade entre doadoras e receptoras ou que estas sejam submetidas a tratamentos imunossupressivos (BEZERRA et al., 2011). Em seres humanos, mais de 130 nascidos vivos foram notificados em todo o mundo após o autotransplante de córtex ovariano submetido a criopreservação (ANDERSON et al., 2017).

Já o xenotransplante é uma importante possibilidade de aproveitamento e manutenção do ovário dos mamíferos, pois consiste na realização de enxerto de tecido de um doador de uma determinada espécie em um receptor de outra (BARROS et al., 2014). Portanto, nessa técnica é viável a utilização de animais reproduzidos e criados em laboratório, como camundongos imunossuprimidos, como receptores (BEZERRA et al., 2011), que possuem menor incidência de rejeição do tecido transplantado, devido ao controle genético e ambiental desses animais. Com o advento das linhagens de camundongas geneticamente modificadas e imunodeficientes, tornou-se possível a obtenção de ovócitos apropriados para maturação *in vitro* por meio da técnica de xenotransplante de tecido ovariano (BARROS et al., 2014). Linhagens de camundongos SCID (Severe combined Immunodeficiency) ou ratos NUDE (SENBON et al., 2003) são utilizadas como receptoras para estudos realizados não apenas em ruminantes, mas

também em humanos, como sugerem Bols et al. (2010).

A biotecnologia xenotransplante, quando realizada com tecidos reprodutivos, como ovário, contribui para a manutenção e incremento da capacidade da fêmea doadora em transmitir aos descendentes seu potencial genético, assim como auxilia a preservação de espécies ameaçadas de extinção (KIKUCHI et al., 2011). Portanto, o xenotransplante ovariano bovino foi desenvolvido diante da necessidade de minimizar a perda de folículos ovarianos de fêmeas de alto valor zootécnico de maneira a aproveitar ovócitos existentes em ovários que estariam condenados ao baixo aproveitamento do tecido reprodutivo, ou ao descarte, devido a morte da doadora (BEZERRA et al., 2011).

O tecido ovariano submetido ao xenotransplante é desafiado por vários fatores para que consiga se manter viável, como a falta de nutrientes e oxigênio nos primeiros momentos após a cirurgia. Os fragmentos, realocados em novo ambiente, necessitam receber neovascularização (Figura 2) e, assim adequado aporte de oxigênio passados alguns dias do transplante. Caso isso não ocorra adequadamente, segundo Liu et al. (2002), pode haver perda massiva de folículos devido a injúrias relacionadas a hipóxia, isquemia tecidual e reperfusão sanguínea.

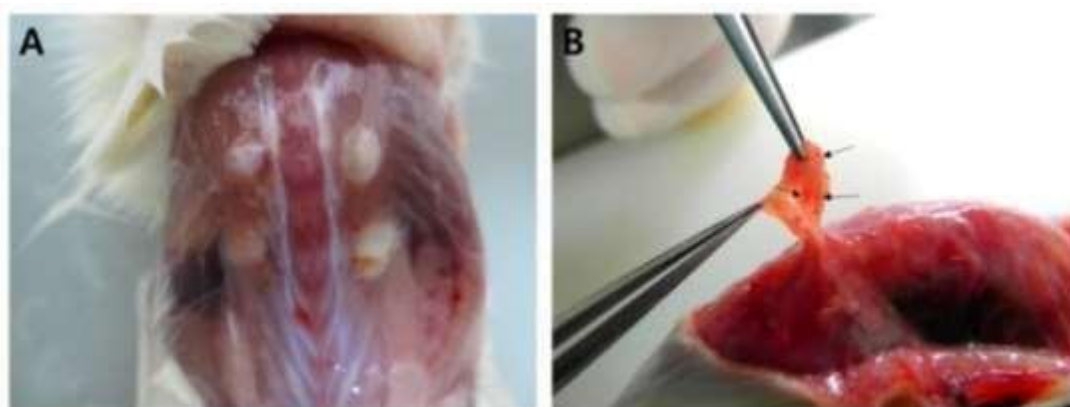


Figura 2: Tecido ovariano humano enxertado em músculo das costas de camundongos SCID ovariectomizados (A), com formação de vasos sanguíneos entre o fragmento de tecido e o sítio enxertado (setas) (B). Fonte: Lee et al. (2019).

3.3.1 Xenotrasplante de tecido ovariano fetal

Ao submeter o tecido ovariano fetal ao xenotransplante é possível ainda, ao

associa-la com a PIVE, aproveitar o material genético de fêmeas de alto mérito genético antes mesmo do seu nascimento, ou que as mães gestantes vierem a óbito antes do final da gestação, o que reduziria o intervalo de gerações, proporcionando aumento das estimativas de ganho genético em características de interesse (MORAES et al., 2018).

Espera-se que as biotecnologias reprodutivas que utilizam folículos ovarianos pré antrais (FOPA) a partir de tecidos fetais possam apresentar melhor rendimento, pois seus ovários possuem maior reserva de folículos primordiais (FORTUNE, 2003). Tais folículos são ainda, mais tolerantes à criopreservação, devido ao seu pequeno tamanho e morfologia relativamente inespecífica, além do baixo metabolismo, em comparação ao que é observado nas fêmeas adultas (PARIS et al., 2004). A conservação do tecido ovariano fetal bovino tem potencial para contribuir para a manutenção da intenção evolutiva, visto que o tecido de fetos bovinos sofreu menor interferência ambiental, podendo apresentar satisfatórios resultados em biotecnologias. O tecido fetal possui alta capacidade de crescimento e proliferação, além de capacidade de diferenciação celular e capacidade de produzir fatores de crescimento, estimulando células do receptor, com menor antigenicidade do que os tecidos adultos (PARIS et al., 2004) e, então, possibilidade menor de rejeição.

Estudos realizados com xenotransplante de tecido ovariano fetal demonstraram ativação massiva de folículos primordiais isolados cerca de 14 dias após o enxerto sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes (AERTS et al., 2010). Paralelamente, pesquisa também com ovários fetais bovinos demonstrou crescimento espontâneo de FOPA e surgimento de folículos antrais a partir de 30 dias de transplante com ovócitos de tamanho apropriado à MIV (BEZERRA, 2010). Tais fatos demonstram que a técnica de xenotransplante de tecido ovariano fetal é uma alternativa para a utilização do material genético de fêmeas com alto mérito genético, ainda em fase gestacional.

3.4 Criopreservação - Vitrificação

A criopreservação do tecido ovariano é um método utilizado para preservar a fertilidade de fêmeas (FAUSTINO et al., 2011), auxiliando a MOIFOPA, por manter a funcionalidade de folículos ovarianos pré antrais, preservando-os até o momento de sua utilização *in vitro* (FABRI et al., 2010). De acordo com Oktay et al. (1998) ovócitos imaturos e menos diferenciados, inclusos em folículos pré antrais, são mais resistentes a criopreservação que ovócitos maduros, devido ao seu menor tamanho, taxa metabólica

mais baixa, pequeno número de células da granulosa e ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais (KAGAWA et al., 2009).

A criopreservação consiste em redução da temperatura para diminuir o metabolismo celular, permitindo a conservação de células ou tecidos em nitrogênio líquido a -196°C (SANTOS et al., 2008). O tecido ovariano pode ser criopreservado por protocolo de congelamento lento (CASTRO et al., 2011) ou por vitrificação (LUNARDI et al., 2012).

A vitrificação propicia solidificação sem que haja formação de cristais de gelo intracelular (KEROS et al., 2009), e se destaca como método para a criopreservação de tecido ovariano graças a sua praticidade e ao seu baixo custo de execução (CARVALHO et al., 2011). Para vitrificação de tecido ovariano deve-se considerar o tamanho dos fragmentos, o tempo de exposição aos crioprotetores, o volume de solução de vitrificação e a velocidade do processo de vitrificação (BORDES et al., 2005; AMORIM et al., 2011; BANDEIRA et al., 2015). Durante o processo de vitrificação há exposição da célula ou do tecido a altas concentrações de crioprotetor por um curto período de tempo à temperatura ambiente (BANDEIRA et al., 2015), o que permite que a água passe do estado líquido para o estado vítreo (KEROS et al., 2009). Na técnica de vitrificação convencional são utilizadas palhetas francesas (utilizadas para congelamento de sêmen), preenchidas com a solução de vitrificação e o tecido a ser vitrificado, de forma que as extremidades são vedadas (Figura 3) e então as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (BORDES et al., 2005).

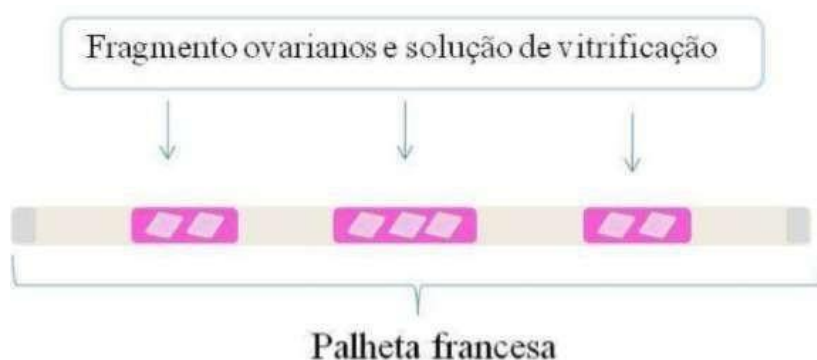


Figura 3 – Esquema ilustrativo de palheta francesa preenchida com solução de vitrificação e fragmentos de tecidos ovarianos intercaladas por colunas de ar e extremidade vedadas com massa acrílica. Fonte: ROCHA C. D. (2017)

3.5 Alterações citogenéticas

O termo citogenética refere-se a estudos no que concerne a cromossomos, sejam esses isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos, a respeito da sua morfologia, organização, função e replicação, além de sua variação e evolução (GUERRA, 1988). A análise cromossômica, é um procedimento diagnóstico de suma importância em várias áreas da medicina clínica (THOMPSON; THOMPSON, 2002), fundamental para correlacionar determinadas patologias ou a adoção de técnicas de transplante, com alterações do cariótipo normal (GUERRA, 1988).

Testes genotóxicos, utilizados em estudos de citogenética, que avaliam a capacidade que algumas circunstâncias têm de induzir alterações no material genético (KOLLING et al., 2006), detectam mutações gênicas e cromossômicas. Dentre eles, o teste do micronúcleo fornece informações primárias sobre injúrias no ácido desoxirribonucleico (DNA), com resultados rápidos na detecção de danos cromossômicos induzidos. Micronúcleos são então, fragmentos de DNA que foram separados do núcleo principal e se caracterizam por serem corpúsculos pequenos, arredondados ou ovais, encontrados no citoplasma, normalmente ao lado do núcleo principal, sendo que sua semelhança com esse, em forma, textura e coloração, é o que facilita sua detecção (AGOSTINI, 1993).

A formação do micronúcleo (Figura 4), se dá pela perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos. Ainda pode ocorrer pela perda de cromossomos que não foram incluídos nos núcleos filhos, na conclusão da telófase durante a mitose, porque não se ligaram ao fuso durante a segregação na anáfase (DOHERTY et al., 2016).

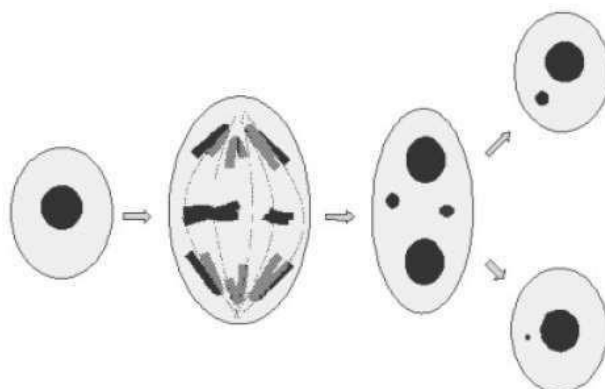


Figura 4: Representação esquemática da formação de micronúcleos originários de um cromossomo em células mononucleares. Fonte: DOHERTY et al. (2016).

Para evidenciar os micronúcleos é necessário a utilização de corantes do material genético, e uma das principais técnicas utilizadas é a microscopia de fluorescência, devido a vantagem de ser específica em suas ligações. O corante Hoechst 33258, é um composto sintético que contém dois anéis benzimidazole consecutivos com um grupo fenólico e um grupo N- metilpiperazina em cada extremidade da molécula alongada (Figura 5), que se liga à molécula de DNA. O Hoechst 33258 se liga preferencialmente à região rica em adenina e timina do DNA com um tamanho de ligação mínimo de quatro pares de bases consecutivas de adenina e timina (WU; SANTI, 1988).

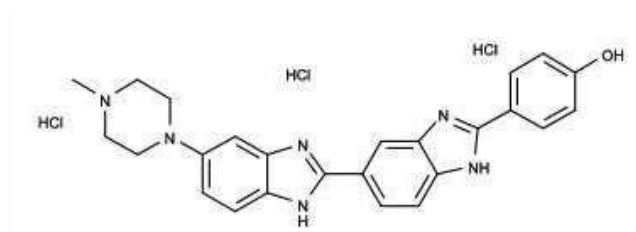


Figura 5. Estrutura química do corante Hoechst 3325. Fonte: WU; SANTI, 1988

Com a análise citogenética, auxiliada pela a utilização da microscopia de fluorescência, com o corante Hoechst 3325, é possível determinar a frequência de células com micronúcleos em determinado tecido. Isso reflete o nível de dano induzido por agentes clastogênicos (aqueles que causam quebras cromossômicas) ou aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) (AGOSTINI, 1993), sendo que o aumento dessa frequência, revela uma ação genotóxica.

Ainda, não há definição exata das possíveis influências nas gerações futuras dessa ação genotóxica devido a presença de MN. Suspeita-se que com a quebra cromossômica do núcleo principal, possa haver deleção de genes importantes para o desenvolvimento animal e para a sobrevivência da espécie. Trkova et al. (2000) reportaram que há maior frequência de MN em linfócitos de amostras sanguíneas de casais humanos com infertilidade ou com dois ou mais abortos espontâneos, e em concordância, Milosevic-Djordjevic et al. (2012) mostraram que em pacientes com problemas de fertilidade, as frequências de MN em linfócitos foram maiores em comparação com pacientes saudáveis. Portanto, ao se tratar de biotecnologias que objetivam a preservação da fertilidade, o estudo citogenético é fundamental para fornecer parâmetros de viabilidade da técnica e posterior segurança genética.

REFERÊNCIAS

- AERTS JMJ, MARTINEZ-MADRID B, LEROY JLMR, AELST SV, BOLS PEJ. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. **Fertil Steril**, v.94, p.708-714, 2010.
- AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1– 19, 1993.
- ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; MARTINS, M.C.; BRAGA, L.S.; SILVA, T.H.; VIU, M.A.O.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O.; GAMBARINI, M.L. Metabolic profile of serum and follicular fluid from postpartum dairy cows during summer and winter. **Reproduction Fertility and Development**, v.26, n.6, p.866-874, 2013.
- ALVES, Kele Amaral. Avaliação da densidade folicular e de estratégias para otimizar a obtenção de folículos pré-antrais equinos. **Tese**. 2014.
- AMORIM, C.A.; CURABA, M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Vitriification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproduction Biomedic Online**. v. 23, n. 2, p. 160-186, 2011.
- ANDERSON RA, HAMISH W, WALLACE B, TELFER EE. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. **Human Reproduction Open**, v. 2017, n. 1, p. hox001, 2017.
- 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**, v.12, p.78, 2014.

AUBARD Y. Ovarian tissue xenografting. **Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol**, v.108, p.14- 18, 2003

BANDEIRA, F. T.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; LIMA, L. F.; VIANA, D. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; PEREIRA, M. L. S.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, AP. R. Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction Domestic Animal**, v. 50, p.177–185, 2015.

BARROS, F. F. P. C. et al. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 38, p. 121-126, 2014

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

BEZERRA, M. B., PACHECO, M. R., MINGOTI, G. Z., MACEDO, M. F., & VICENTE, W. R. R. (2011). Potencial do cultivo in vitro e do xenotransplante na sobrevida e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, n. 4, 2011.

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.

BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; COURBIERE, B.; GUERIN, J. F.; SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrifiedwarmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 20, n.10, p. 2745-278, 2005.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P. R. Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236248, 2011

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C M.; CASTRO, S V.; LOPES, C. A.; SANTOS, R. R.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Novel widecapacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**. v.138, n. (3-4), p. 220-7, 2013.

CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, 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.117, 2011.

COSTA, L. F. S.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; CARÁMBULA, S. F.; NEVES, J. P.; MONTAGNER, M. M. Desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos in vitro em monocamada de células ovarianas in vitro development of bovine preantral follicles in monolayer of ovarian cells. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.323-327, 2001.

DINIZ, E. G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C.; Morphological Development of the ovaries in embryos and fetuses of Nelore breed. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.70-76, 2005.

DOHERTY, ANN; BRYCE, STEVEN M.; BEMIS, JEFFREY C. The in vitro micronucleus assay. In: Genetic Toxicology Testing. Academic Press, 2016. p. 161-205.

FABRI, R.; PASQUINELLI, G.; KEANE, D.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Optimizarion of protocols for human ovarian tissue cryoprservation with sucrose 1,2- propanediol and human serum. **Reproductive BioMedicine Online**, v.21, p. 819- 828, 2010.

FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.3-15, 2011

Figueiredo, J. R. de; Rodrigues, A. P. R.; Amorim, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R. de; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Livraria Roca; 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oocitos 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 Tropicós**. v.1, n. 1, p. 116-118., 2008.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v. 78, p.135-63, 2003.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Editora Varela, 2001, 340p.

GRIFFIN, J. EMERY, B.R.; HUAG, I.; PETERSON, M.; CARRELL, D.T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v.3, p.2, 2006.

GUERRA, M. S., Introdução à Citogenética Geral. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1988.

HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L.

Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v.79, n.4, p.599-609, 2013

HURK VDR, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Research BioMedicine Online**, v.18, n.4, p.568-577, 2009.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.4, n.7, p. 1670-1683, 2009

KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; KANEKI, H. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. **Anim Sci J**, v.82, p.495-503, 2011.

KOLLING, D. J.; KRATZ, J. M.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Padronização in vitro da técnica do micronúcleo em células vero para detecção de genotoxicidade. Anais da 58ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 2006.

LEE, S., RYU, K., KIM, B., KANG, D., KIM, Y. Y., & KIM, T. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3346, 2019.

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

LUNARDI, F. O.; ARAÚJO, V. R.; FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BÃO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v.107, p.121130, 2012.

MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; HAAG, K.T.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; JONES, K.L.; GEISLER-LEE, J.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. Long- term in vitro culture of ovarian cortical tissue in goats: effects of FSH and IGF-I on preantral follicular development and FSH and IGF-I receptor mRNA expression. **Cell Tissue Research**, v.350, n.3, p.503-511, 2012.

MILOŠEVIĆ-DJORDJEVIĆ, O., STOŠIĆ, I., GRUJIČIĆ, D., ZELEN, I., & SAZDANOVIĆ, P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 63, n. 3, p. 367-375, 2012.

Moraes, G. F.; Ronda, J. B.; Alves, K. A.; Alves, B. G.; Santos, R. M.; Reis, J. P. J.; Freitas, R. A. A.; Campos, B. S.; Silva Junior, E. D.; Marques, J. C. S.; Gontijo, D. A.;

- Moraes, A. B. A. 2018. Visual evaluation of fetal bovine ovarian tissue fragments submitted to xenotransplantation. In: Anais da VII ISABR, Aracajú
- MOTLIK J, PAVLOK A, KUBELKA M, KALOUS J, KALAB P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 461-469, 1998.
- OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 1-7, 1998.
- PARIS, M. C., SNOW, M., COX, S. L., & SHAW, J. M. 2004. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 277-291, 2004.
- RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v.139, p.10, 2010.
- SADEU, J.C.; ADIAENSSENS, T.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility Sterility**, v.85, Suppl1, p.1130- 1141, 2006
- SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15. 2008.
- SENBON, S., OTA, A., TACHIBANA, M., & MIYANO, T. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v. 11, n. 2, p. 139-149, 2003.
- Thompson, J S.; Thompson, M W.** Genética médica – Thompson & Thompson. 6ª edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ. 2002. 388p
- TRKOVÁ, M., KAPRAS, J., BOBKOVÁ, K., STAŇKOVÁ, J., & MEJSNAROVÁ, B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. **Reproductive toxicology**, v. 14, n. 4, p. 331-335, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.
- WANG, X.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v.141, n.2, p.183-191, 2011.
- WU, J.; EMERY, B.R.; CARRELL, D.T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of reproduction**, v.64, n.1, p.375-381, 2001.
- WU, J. C.; SANTI, D. V. The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the

DNA dodecamer (CGCGAATTCGCG). **Nucleic acids research**, v. 16, n. 2, p. 703–717, 1988.

CAPÍTULO 2 – Avaliação de córtex ovariano de fetos bovinos submetido a xenotransplante

G.F. Moraes¹, J.B. Ronda¹, B.S. Campos¹, E.D. Silva Junior¹, J.C.S. Marques¹, D.A. Gontijo¹, J.P.J. Reis¹, R.A.A. Freitas¹, A.B.A. Moraes¹, G.F. Cardoso¹, P.B. Alvarenga², Y. Pinto³, A.P.R. Rodrigues³, B.G. Alves⁴, K.A. Alves⁵, R.M. Santos¹

1 – Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. 2 – Laboratório de Saúde em Grandes Animais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. 3 - Laboratório de Diagnóstico por Imagem Aplicada à Reprodução Animal, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. 4 - Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal de Goiás- regional de Jataí, GO, Brasil. 5- Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Resumo

O xenotransplante de tecido ovariano fetal bovino associado a produção *in vitro* de embriões possibilita que fêmeas de alto valor zootécnico possam gerar descendentes durante a fase fetal, além de fomentar a criação de bancos de germoplasma. Objetivou-se, após cultivo *in vitro* e xenotransplante de tecido ovariano de fetos bovinos, avaliar a morfologia e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, e ainda os níveis de estresse oxidativo, degeneração celular e apoptose. Foram utilizados 20 ovários de fetos bovinos fragmentados e distribuídos aleatoriamente nos grupos Controle fresco (CF), Xenotransplantado por 7 dias (X7), Xenotransplantado por 14 dias (X14), Cultivado *in vitro* por 1 dia (D1) e Cultivado *in vitro* por 7 dias (D7). Os fragmentos do grupo CF foram imediatamente destinados à análise por histologia clássica e confocal. Imediatamente após a fragmentação, amostras dos grupos X7 e X14 foram submetidas ao xenotransplante (cultivo *in vivo*) com recuperação após 7 ou 14 dias, respectivamente, e avaliados em escores visuais de morfologia, hemorragia e aderência, com posterior preservação para análise por histologia clássica e confocal. Os grupos de cultivo *in vivo* foram eficientes na manutenção da viabilidade folicular e estimularam desenvolvimento folicular moderado. Adicionalmente, o número de vasos sanguíneos por secção apresentou resultado semelhante entre grupos submetidos a cultivo *in*

vitro e cultivo *in vivo*. Houve correlação negativa entre o número de vasos sanguíneos no tecido e o número de dias de cultivo, e o percentual de ativação folicular. Enquanto que, o número de vasos sanguíneos por secção histológica foi correlacionado positivamente com o percentual de folículos primordiais e com a viabilidade folicular. Os fragmentos submetidos a xenotransplante apresentaram redução dos níveis de degeneração celular e de espécies reativas de oxigênio, comparado àqueles do grupo CF, independentemente de terem sido recuperados após 7 ou 14 dias, porém, aqueles recuperados após 7 dias tiveram a menor taxa de apoptose celular. O tecido ovariano fetal xenotransplantado, recuperado após 14 dias apresentou maiores escores de morfologia, aderência e hemorragia do que aqueles submetidos a recuperação após 7 dias, sendo que, houve correlação forte e positiva entre os escores de adesão e a hemorragia tecidual. A utilização da biotecnologia xenotransplante, com recuperação de fragmentos após 14 dias, apresenta bons resultados na manutenção da viabilidade de folículos pré antrais inclusos em tecido ovariano fetal bovino e, ainda fornece suporte ao crescimento de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento. Os níveis de degeneração celular e de espécies reativas de oxigênio foram reduzidos após o processo de xenotransplante.

Palavras chave: Apoptose, cultivo *in vitro*, degeneração celular, fertilidade

1. Introdução

A reserva ovariana de folículos pré-antrais é um indicador da capacidade reprodutiva de uma espécie, e seu estudo contribui para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para manter ou melhorar a fertilidade feminina. Como alternativa para melhor aproveitamento dessa reserva, o xenotransplante, metodologia de cultivo *in vivo*, é uma biotecnologia reprodutiva promissora (BOLS et al., 2010), inclusive em seres humanos, para restauração da capacidade reprodutiva de mulheres que foram submetidas à tratamentos com fármacos quimioterápicos, uma vez que o tratamento é tóxico para os ovários e células germinativas (NOYES et al., 2010). O xenotransplante de tecido ovariano bovino, além de ser utilizado como modelo animal, permite que fêmeas de interesse zootécnico, possam gerar um maior número de descendentes, e ainda fomenta a criação de bancos de gametas animais, que podem ser usados para preservação de espécies ameaçadas de extinção (LUVONI et al., 2006).

Tendo em vista essas vantagens, nota-se nos últimos anos, um número crescente de pesquisas com a utilização de xenotransplante ovariano, que atesta o interesse da comunidade científica sobre o tema. Entretanto, ainda há poucos estudos que objetivem a conservação do material genético fetal, com a utilização do xenotransplante. A conservação do tecido ovariano fetal bovino contribui para a manutenção da intenção evolutiva, mesmo que o feto não seja compatível com a vida, como em casos em que a fêmea prenhe venha a óbito no final da gestação. A utilização do xenotransplante a fim de permitir a preservação de folículos pré-antrais (FOPA) presentes no tecido ovariano de tecido ovariano fetal bovino tem potencial de apresentar menores taxas de rejeição e melhores taxas de recuperação celular do tecido (PARIS et al., 2004).

Espera-se que os descendentes possuam valor genético superior às gerações anteriores, portanto, a conservação dos folículos ovarianos de fetos e subsequente maturação *in vitro* de ovócitos diminui o intervalo de gerações e sucessivamente aumenta o ganho genético em características de interesse (BEZERRA, et al., 2011; MORAES et al., 2018). O tecido fetal, além de ter sofrido menores interferências ambientais, possui maior reserva de folículos primordiais, que devido ao seu pequeno tamanho e baixo metabolismo, são mais tolerantes à criopreservação (PARIS, et al., 2004). Desta forma a aplicação de biotecnologias reprodutivas em tecido ovariano fetal pode ter aplicabilidade futura a campo. Assim, objetivou-se, após cultivo *in vitro* e após cultivo *in vivo* (xenotransplante) de tecido ovariano de fetos bovinos, avaliar a morfologia e a capacidade de desenvolvimento dos folículos pré-antrais e, ainda o estresse oxidativo e os níveis de degeneração celular e apoptose no tecido.

2. Metodologia

2.1 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.

2.2 Coleta de ovários

Vinte ovários de fetos bovinos (10 pares) a partir de 180 dias de gestação foram obtidos em frigorífico local. A idade dos fetos foi determinada pela distância (cm) entre a

articulação atlanto-occipital e a inserção da cauda (REXOARD et al., 1974). Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% por 10 segundos, em seguida lavados duas vezes em PBS e transportados em caixa isotérmica a temperatura de 4°C, por até 2 horas.

2.3 Preparação das amostras e desenho experimental

No laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), os 20 ovários foram cortados ao meio e o córtex ovariano fragmentado em 3 x 3 x 1 mm e distribuídos aleatoriamente nos grupos Controle fresco (CF) (50 fragmentos), xenotransplantado por 7 dias (X7) (50 fragmentos), xenotransplantado por 14 dias (X14) (50 fragmentos), cultivado *in vitro* por 1 dia (D1) (20 fragmentos) e cultivado *in vitro* por 7 dias (D7) (50 fragmentos) (Figura 1). Foram realizadas quatro repetições. Fragmentos de todos os tratamentos foram analisados por histologia clássica, e aqueles dos grupos CF, X7 e X14, foram ainda submetidos a análise por intensidade de fluorescência em microscopia Confocal. Imediatamente após a fragmentação, uma parte dos fragmentos do grupo CF foi fixada em paraformaldeído 4% por 3 horas e em seguida fixada em álcool 70% para análise de histologia clássica e outra parte reservada para análise da intensidade de fluorescência.

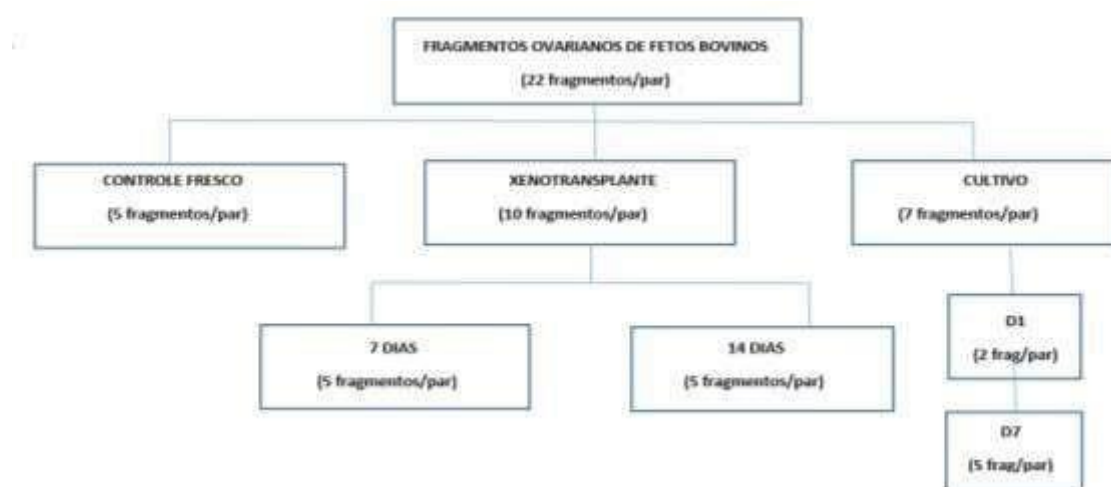


Figura 1 – Desenho experimental - Avaliação de tecido ovariano de fetos bovinos submetido a xenotransplante.

2.4 Cultivo *in vivo* (xenotransplante)

Foram utilizados 20 camundongos com seis semanas de idade, fêmeas, BALB C, isogênicas, produzidas no setor de reprodução da rede de biotérios de roedores da Universidade Federal de Uberlândia, com peso vivo aproximadamente 20 gramas. Antes do procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados previamente com 0,05 ml de Acepran 0,2% (Acepromazina 1% - Vetnil, Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários, Louveira – SP), 0,09 ml de solução geral de Xilazina 2% (Cloridrato de Xilazina 2% – Syntec, Rhobifarma Indústria Farmaceutica, Hortolândia – SP) e Cetamin 2% (Cloridrato de Cetamina 10% - Syntec, Rhobifarma Indústria Farmaceutica, Hortolândia – SP). A solução geral foi composta por 37,5% de soro fisiológico, 37,5% de solução de Cetamin a 2% e 25% de solução de Xilazina a 2%. A dor foi controlada durante o pós-operatório com 0,05 ml de Tramadol (Cloridrato de tramadol 50 mg/ml - Hipolabor Farmacêutica Ltda., Belo Horizonte – MG) e dose única de 0,05 ml de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda., Fort Dodge Saúde Animal, Paulínia - SP). Em cada animal foram transplantados cinco fragmentos de tecido ovariano, os quais foram fixados ao peritônio na cavidade abdominal por fio de sutura Nylon 6/0 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, dentro da rede de biotérios de roedores. A água e o alimento foram ofertados à vontade e previamente esterilizados. Em 10 camundongos, a recuperação dos enxertos foi feita sete dias após o transplante, e nos outros 10, 14 dias após o transplante. Os camundongos foram eutanasiados com o uso de anestesia geral. Os enxertos foram recuperados cirurgicamente para posteriores análises.

2.5 Escores

Após a recuperação dos enxertos, os fragmentos foram classificados macroscopicamente de acordo com os seguintes critérios. (A) morfologia, 1 = necrótica (totalmente escuro); 2 = alguns pontos de necrose; 3 = intacto; 4 = intacto e ligeiramente inchado; e 5 = intacto e inchado com aumento de volume; (B) adesão, 1 = ruim (remoção fácil); 2 = ligeiramente inserido; 3 = moderado (bem inserido); 4 = forte (bem inserido com alguma dificuldade de remoção); e 5 = intenso (muito difícil de remover); e (C) hemorragia, 1 = ausente; 2 = até duas áreas; 3 = metade do fragmento; 4 = dois terços do fragmento; 5 =

todo fragmento. Todas as classificações foram realizadas por um único operador.

2.6 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* foi realizado por 1 e por 7 dias, utilizando como meio de base o *tissue culture medium* 199 (TCM 199) suplementado com 50 µg/mL de ácido ascórbico (AA), 1% de ITS (10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina e 0,5 ng/mL de selênio), 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina. Os fragmentos foram cultivados individualmente em placas de 24 poços, contendo 1mL de meio de cultivo utilizando incubadora a 39°C (5% de CO₂ em ar), sendo a troca total de meio realizada a cada 48 horas.

2.7 Histologia clássica

Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4%, em álcool 70% e encaminhados para análise de histologia clássica e após inclusão em parafina os fragmentos foram seccionados serialmente a 7 µm de espessura (ALVES et al., 2015) e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas utilizando microscopia de luz (Nikon, Japão) em aumento de 400x e imagens capturadas pelo Leica Software Imaging, Wetzlar, Alemanha. Os folículos foram classificados em normais quando o ovócito e o núcleo estavam preservados e circundados por células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas e os folículos degenerados (anormais) aqueles que apresentaram citoplasma do ovócito retraído ou desorganizado, com células da granulosa separada da membrana basal e ovócito com núcleo picnótico (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Os folículos pré-antrais foram quantificados e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento em primordial (ovócito rodeado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), primário (uma camada completa de células da granulosa cuboides e todo o ovócito com aspecto esférico) e secundário (ovócito com zona pelúcida rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides) (HULSHOF et al., 1994). Foi realizada ainda, a contagem da quantidade de vasos sanguíneos por secção histológica. Toda avaliação histológica foi realizada pelo mesmo operador.

2.8 Confocal

A análise foi realizada com fragmentos dos grupos CF, X7 e X14. Os fragmentos

destinados para análise de intensidade de fluorescência foram lavados utilizando solução PBS com soro fetal bovino a 5% e colocados para corar ao abrigo da luz em solução com 1µl/ml de H2DCFDA (DCF) por 30 minutos, em seguida corados com 10µM/ml YO PRO 01 (YOPRO) durante 30 minutos, seguido de solução com 100µg/ml de iodeto de propídio (IP), incubados por mais 15 minutos. Após este período foram fixados em paraformaldeído 4% durante 15 minutos e armazenados em PBS a 4 °C ao abrigo da luz. Após essa etapa as amostras foram levadas para análise da intensidade de fluorescência (pixels) em diferentes profundidades teciduais com a utilização de microscópio LSM 710 ZEISS® em aumento de 20 vezes de acordo com as faixas de excitação/emissão de cada sonda: DCF 495/519 nm; YOPRO- 1 491/509 nm; IP 543/616nm.

As probes fluorescentes utilizadas permitem avaliar as condições de viabilidade, apoptose e oxidação do tecido ovariano após os referidos tratamentos. O corante H2DCFDA emite fluorescência que indica o nível de emissão de espécies reativas de oxigênio e detecção de processo oxidativo em células fagocíticas. Já a probe YO PRO 01, indica através da emissão da fluorescência a quantidade de células em processo de apoptose. Finalmente, o corante iodeto de propídio emite a fluorescência adquirida por células degeneradas. O comprimento de onda para cada corante foi previamente programado e as secções foram realizadas em intervalos de 8 micrômetros com média de 10 secções em Z-Stack. As imagens salvas no programa Zen 2008 instalado ao microscópio apresentaram os dados numéricos da intensidade de fluorescência utilizados nas análises estatísticas.

2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos à transformação logarítmica. As variáveis paramétricas foram comparadas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise de correlação avaliou a associação entre porcentagem de folículos normais e classe folicular. Os dados foram apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média) e porcentagem e os resultados considerados significativos quando $P < 0,05$.

3 Resultados

O tecido ovariano fetal xenotransplantado, recuperado após 14 dias, apresentou maiores escores de morfologia, aderência e hemorragia ($P < 0,05$) do que aqueles

submetidos a recuperação após 7 dias (Tabela 1, Figura 2). Além disso, foi observada correlação positiva de 0,62 entre os escores de adesão e a hemorragia tecidual ($P < 0.01$).

Tabela 1 – Escores de morfologia, aderência e hemorragia, após 7 ou 14 dias para recuperação dos fragmentos de tecido ovariano fetal bovino xenotransplantados.

Dias para recuperação	Morfologia	Aderência	Hemorragia
7	$3,4 \pm 0,2^a$	$3,2 \pm 0,2^a$	$2,7 \pm 0,3^a$
14	$4,2 \pm 0,1^b$	$4,4 \pm 0,1^b$	$4,0 \pm 0,2^b$

Letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$)



Figura 2 – Fragmentos de tecido ovariano fetal bovino recuperados após 7 e 14 dias de xenotransplante, respectivamente.

Um total de 23112 folículos pré antrais e 17 folículos antrais (Figura 3), em 1453 secções histológicas, foram analisados nesse estudo. Os grupos de cultivo *in vivo* foram eficientes na manutenção da viabilidade folicular (Tabela 2), sendo que o grupo X14 apresentou percentual de viabilidade semelhante ao grupo X7 e aos grupos de cultivo ($P > 0,05$). O xenotransplante de tecido ovariano fetal recuperado após 7 e após 14 dias estimulou desenvolvimento folicular moderado, em menor percentual que o grupo D7 ($P < 0,05$). Adicionalmente, o número de vasos sanguíneos por secção apresentou resultado semelhante ($P > 0,05$) entre grupos submetidos a cultivo *in vitro* e cultivo *in vivo* (Tabela. 2).

Tabela 2 – Proporção de viabilidade e ativação folicular, e número de vasos sanguíneos por secção histológica em tecido ovariano fetal bovino, de acordo com os tratamentos analisados.

Tratamento	Viabilidade % (média ± EP)	Ativação folicular % (média ± EP)	Vasos (média ± EP)
CF	88,2 ± 3,2 ^a	44,5 ± 4,9 ^d	16,7 ± 3,1 ^a
D1	82,2 ± 4,5 ^{ab}	53,9 ± 3,0 ^{cd}	7,0 ± 1,1 ^b
D7	76,6 ± 8,3 ^{abc}	84,4 ± 3,1 ^a	4,0 ± 0,4 ^b
X7	62,2 ± 4,0 ^c	63,0 ± 3,7 ^{bc}	6,3 ± 0,8 ^b
X14	67,6 ± 4,3 ^{bc}	65,6 ± 5,8 ^b	7,4 ± 0,6 ^b

Letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). EP- erro padrão CF – Controle Fresco. D1 – Cultivado por 1 dia, D7 – Cultivado por 7 dias, X7 – Xenotransplantado por 7 dias, X14 – Xenotransplantado por 14 dias.

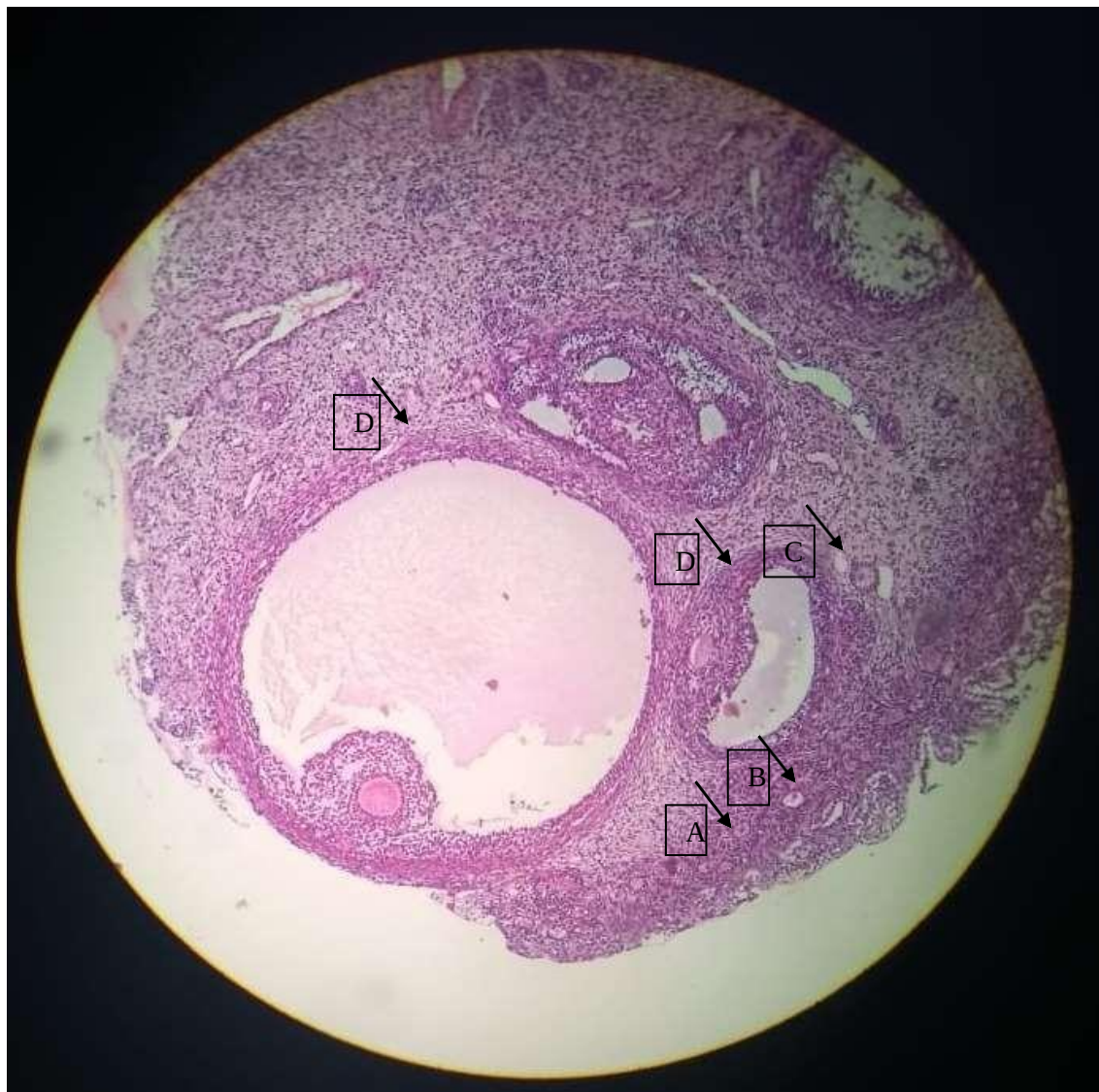


Figura 3– Secção histológica de fragmento do grupo CF com folículos em diversos estágios de desenvolvimento e viabilidade.

A - Folículo ovariano primordial normal. B - Folículo ovariano de transição degenerado (retração citoplasmática e núcleo picnótico). C – Folículo ovariano primário normal. D- Folículos ovarianos antrais normais.

A Figura 4, apresenta as correlações negativas entre o número de vasos sanguíneos no tecido ovariano fetal e o número de dias de cultivo ($r = -0,35$, $P < 0,01$) e o percentual de ativação folicular ($r = -0,39$, $P < 0,01$). Por outro lado, o número de vasos sanguíneos por secção histológica tem correlação positiva com o percentual de folículos primordiais ($r = 0,39$, $P < 0,01$) e com a viabilidade folicular ($r = 0,23$, $P < 0,1$).

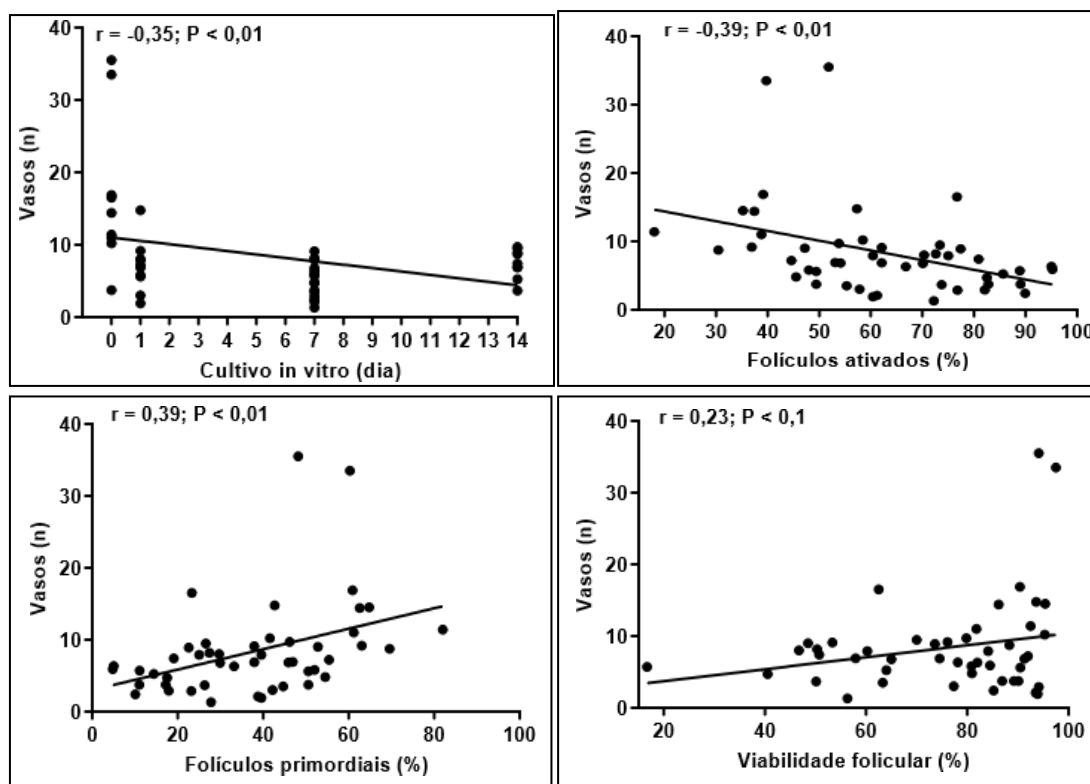


Figura 4 – Análise de correlação entre número de vasos sanguíneos no tecido ovariano fetal e o número de dias de cultivo; o percentual de folículos ativados; o percentual de folículos primordiais e o percentual de viabilidade folicular.

Um total de 30 fragmentos de tecido ovariano fetal, distribuídos entre os tratamentos CF, X7 e X14 foram avaliados por microscopia confocal tridimensional. Ao analisar a média da intensidade de fluorescência captadas com a probes IP e DCF nota-se que os fragmentos submetidos a xenotransplante apresentaram redução ($P < 0,05$) dos níveis de degeneração celular e de espécies reativas de oxigênio (ROS), comparado àqueles do grupo CF, independentemente de terem sido recuperados após 7 ou 14 dias. Os fragmentos submetidos ao xenotransplante apresentaram níveis de apoptose celular menores em relação ao CF e os fragmentos recuperados após 7 dias tiveram a menor taxa de apoptose celular ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias ($\pm$ EP) das intensidades de fluorescência captadas com as probes IP, DCF e YOPRO no tecido ovariano fetal analisado a fresco ou xenotransplantado por 7 ou 14 dias.

Tratamento	IP (média $\pm$ EP)	DCF (média $\pm$ EP)	YOPRO (média $\pm$ EP)
CF	4,5 $\pm$ 0,26 ^a	5,86 $\pm$ 0,36 ^a	3,29 $\pm$ 0,10 ^a
X7	1,25 $\pm$ 0,10 ^b	1,78 $\pm$ 0,13 ^b	1,17 $\pm$ 0,03 ^c
X14	1,02 $\pm$ 0,06 ^b	3,25 $\pm$ 0,49 ^b	2,28 $\pm$ 0,21 ^b

Letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente ($P < 0,05$). EP- Erro padrão. CF – Controle Fresco, X7 – Xenotransplantado por 7 dias, X14 – Xenotransplantado por 14 dias.

4 Discussão

O tempo decorrido após o transplante determina o período necessário para a adaptação do fragmento ao corpo. O maior período analisado, com recuperação após 14 dias, foi eficiente, pois os fragmentos submetidos a esse tratamento apresentaram maiores escores de morfologia, aderência e hemorragia para a ambientação tecidual do que aqueles submetidos a recuperação após 7 dias. A adesão e a hemorragia tecidual mostraram correlação forte e positiva, indicando que a perfusão dos vasos sanguíneos ao fragmento transplantado influencia sua adesão, fator fundamental para a viabilidade tecidual após a cirurgia.

Neste estudo a viabilidade de folículos inclusos em tecido ovariano fetal bovino xenotransplantado por 14 dias foi preservada com percentual semelhante a grupos submetidos a cultivo *in vitro*. Adicionalmente, o percentual de folículos primordiais e a viabilidade folicular foram associados positivamente com o número de vasos sanguíneos. Esse fato demonstra que o ambiente no qual os fragmentos foram implantados forneceu condições suficientes para a manutenção da viabilidade folicular, inclusive daqueles em estágios mais avançados e que o número de vasos sanguíneos por secção histológica influencia o aporte de oxigênio e nutrientes recebidos pelo tecido. Folículos ovarianos em estágio avançado de desenvolvimento têm maior consumo de oxigênio, o que indica maior taxa metabólica folicular (ISHIKAWA et al., 2014). Há de se considerar ainda que a densidade folicular no tecido ovariano é heterogênea, havendo variações entre animais

(FORTUNE, 2003) (CECCONI et al., 2004) e até mesmo entre ovários e regiões da córtex (LUCCI et al., 2002) (ALVES, 2015), o que pode estar associado à migração celular para as cristas gonadais durante a formação embrionária do ovário (LANGBEEN et al., 2014).

Provavelmente, a retirada do tecido ovariano de seu *habitat* leva a ausência de fatores inibidores do processo de desenvolvimento folicular e pode estimular os mecanismos de ativação, justificando a correlação negativa entre o percentual de folículos ativados e o número de vasos sanguíneos no tecido. 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. Gavish et al. (2014), atribuíram ativação folicular e intenso consumo folicular em diferentes espessuras de enxertos transplantados no subcutâneo de camundongos à manipulação mecânica e a isquemia pós transplante. Tais fatos, possivelmente resultam em queda dos níveis de fatores inibidores da ativação folicular, como o hormônio anti-mulleriano (VISSEL, J. A. 2006).

As associações negativas entre o número de vasos sanguíneos no tecido ovariano fetal e o número de dias de cultivo, e o percentual de ativação folicular, demonstram que nos dias iniciais de cultivo, com folículos menores, o aporte sanguíneo mais intenso devido ao maior número de vasos sanguíneos, favorece a ativação folicular. Entretanto, com o decorrer dos dias, há diminuição na quantidade dos vasos, e crescimento dos folículos, sugerindo uma nova configuração espacial do tecido ovariano fetal.

Os níveis de degeneração celular foram reduzidos após o processo de xenotransplante, o que demonstra que essa biotecnologia ofereceu um efeito protetor na viabilidade celular. Em corroboração, ao avaliar os níveis reduzidos de EROs, nota-se também que a utilização do xenotransplante foi benéfica aos fragmentos, pois altos níveis de EROs, superiores à capacidade de tamponamento e atividade enzimática, geram estresse oxidativo, com potencial citotóxico (ANAZETTI; MELO, 2007).

Os fragmentos submetidos a xenotransplante apresentaram menores níveis de apoptose celular. Tal situação é favorável, pois demonstra boa responsividade do tecido transplantado já que para que haja homeostasia tecidual, mecanismos biológicos moduladores como a apoptose, são essenciais para regular a morfogênese e limitar reações imunes (PAROLIN; REASON, 2001). A apoptose ocorre em diferentes situações fisiológicas e patológicas, para a exclusão de células danificadas e consecutiva renovação tecidual, devido à interação celular com o meio (ANAZETTI; MELO, 2007). Sabendo que radicais de alta reatividade podem levar a danos permanentes no DNA (ANAZETTI; MELO, 2007), a relação entre os níveis de EROs e apoptose demonstram que o

funcionamento da maquinaria celular está ocorrendo.

5 Conclusão

A utilização das biotecnologias de cultivo *in vitro* e *in vivo* (xenotransplante), demonstrou bons resultados na manutenção da viabilidade de folículos pré antrais inclusos em tecido ovariano fetal bovino, e ainda fornece suporte ao crescimento de folículos ovarianos em todos os estágios de desenvolvimento, entretanto, o tecido submetido ao xenotransplante apresentou maior preservação da reserva folicular. Adicionalmente, os níveis de degeneração celular, espécies reativas de oxigênio e apoptose foram mais baixos após o processo de xenotransplante do que em tecido não submetido a biotecnologias.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; e com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Agradecemos também o apoio da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e do Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR FLN, GASTAL GDA, ISHAK GM, GASTAL MO, TEIXEIRA DIA, FEUGANG JM. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124-133, 2017.
- ALVES, K.A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.
- BANDEIRA FT, CARVALHO AA, CASTRO SV, LIMA LF, VIANA DA, EVANGELISTA J, et al. Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the

ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 2, p. 177-185, 2015.

BEZERRA, M. B., PACHECO, M. R., MINGOTI, G. Z., MACEDO, M. F., & VICENTE, W. R. R. Potencial do cultivo in vitro e do xenotransplante na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, n. 4, 2011.

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.

CECCONI S, CAPACCHIETTI G, RUSSO V, BERARDINELLI P, MATTIOLI M, BARBONI B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biol Reprod**, v.70, n.1, p. 12-17, 2004.

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

FORTUNE JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**; v.78 n. 3, p.135-163, 2003.

GAVISH, Z., PEER, G., HADASSA, R., YORAM, C., & MEIROW, D. Follicle activation and ‘burn-out’ contribute to posttransplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: the effect of graft thickness. **Human reproduction**, v. 29, n. 5, p. 989-996, 2014.

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

ISHIKAWA, T., KYOYA, T., NAKAMURA, Y., SATO, E., TOMIYAMA, T., & KYONO, K. 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.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W. and; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum histologicum japonicum**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

LANGBEEN A, JORSSSEN EP, FRANSEN E, RODRIGUEZ AP, GARCIA MC, LEROY JL. Characterization of freshly retrieved preantral follicles using a low-invasive, mechanical isolation method extended to different ruminant species. **Zygote**, v.1, n.12, p.638-694, 2014.

LUCCI CM, RUMPF R, FIGUEIREDO JR, BAO SN. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**; v.57, n. 5, p.1467-1483, 2002.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, n.1,

p.101- 111, 2006.

Moraes, G. F.; Ronda, J. B.; Alves, K. A.; Alves, B. G.; Santos, R. M.; Reis, J. P. J.; Freitas, R. A. A.; Campos, B. S.; Silva Junior, E. D.; Marques, J. C. S.; Gontijo, D. A.; Moraes, A. B. A. 2018. Visual evaluation of fetal bovine ovarian tissue fragments submitted to xenotransplantation. In: Anais da VII ISABR, Aracajú

NOYES, N., LABELLA, P. A., GRIFO, J., & KNOPMAN, J. M. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 27, n. 8, p. 495-499, 2010.

PARIS, M. C., SNOW, M., COX, S. L., & SHAW, J. M. 2004. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 277-291, 2004.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de Lesão nas doenças Hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

REXOARD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crow-rump flength of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.3, p.346-347, 1974.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Society for Reproduction and Fertility**, v.139, n.2, p. 309-318, 2010.

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

CAPÍTULO 3 - Cytogenetic evaluation of bovine foetal ovarian cortex xenotransplanted after vitrification

**G.F. Moraes^a, J.B. Ronda^a, B.S. Campos^a, C. D. Rocha^a, R.A.A. Freitas^a, E.D.
Silva Junior^a, J.C.S. Marques^a, D.A. Gontijo^a, A.B.A. Moraes^a, R.M. Brito^b,
R. J. Oliveira Júnior^b, B.G. Alves^c, K.A. Alves^d, R.M. Santos^a**

a – Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. b – Laboratório de Citogenética do Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. c - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal de Goiás- regional de Jataí, GO, Brasil. d - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Abstract

Vitrification and xenotransplantation can be use as potential reproductive tissue preservation methods for different species, so, there is a need to study the possible genetic changes resulting from these techniques. Thus, this study aimed to evaluate the morphology and development ability of preantral follicles and chromosomal abnormalities related to the presence of micronuclei (MN) in bovine foetal ovarian tissues after vitrification and/or xenotransplantation. We used ten foetal bovine ovaries that were fragmented and randomly assigned to groups Fresh Control (FC), Vitrificated Control (VC), Vitrificated xenotransplanted (VX), and Fresh Xenotransplanted (FX). Fragments of the FC group were immediately directed to preserve the material for cytogenetic analysis and histology. Samples from VC and VX groups were subjected to vitrification after fragmentation, and heated after a week. Immediately after fragmentation of samples from the FX group and after heating those of VX, the xenotransplantation procedure was performed, in 10 female BALB C mice, with recovery after 14 days. Follicular viability was preserved in the VC group; however, a decrease in viable follicles was observed after the xenotransplantation procedure. Furthermore, there was lower follicular activation in the VC and VX groups ($68.1 \pm 1.7\%$ and $68.0 \pm 2.4\%$, respectively) than in the FX (74.8 ± 2.3). All treatments had increased number of cells with MN, compared to the FC group.

The visual scores of morphology, haemorrhage, and tissue adhesion between the fragments were similar between the FX and VX groups. In conclusion, it was observed that the reserve of preantral follicles in foetal bovine ovarian tissues were maintained; however, both xenotransplantation and vitrification are able to generate changes in DNA structure, thus increasing MN formation in the ovarian tissue cells of bovine foetuses.

Key words: cryopreservation, fertility, genotoxicity, micronuclei.

1. Introduction

The preservation of gametes for maintenance of gene banks and greater use of high-value livestock females is fostered by reproductive biotechnologies. To be able to preserve the viability of ovarian tissue, *in vitro* culture, cryopreservation, as vitrification, and xenotransplantation (*in vivo* culture) are feasible alternatives, combined with protocols that allow for efficient maintenance of cell viability.

Vitrification and foetal ovarian tissue xenografts are valid options for the utilisation of genetic material from females with high genetic value even during the foetal stage. Subsequent maturation and *in vitro* fertilisation of oocytes included in ovarian follicles preserved with this technique, may decrease the generation interval and successively increase genetic gain estimates [1]. This is because bovine foetal ovarian tissues suffer less the environmental interference, and during the foetal stage, they have greater reserves of primordial follicles that are more tolerant to cryopreservation (due to the small size and relatively nonspecific morphology, in addition to a low metabolism) [2]. In this context, the tissue may be cryopreserved by vitrification [3], a practical method with low execution cost [4], which requires high concentrations of cryoprotectant agents, providing a solution viscosity without formation of intracellular ice crystals [5].

Several studies have tested different methods for cryopreservation and transplantation of ovarian tissues [6, 7, 8, 9]. However, an assessment of possible genetic changes in tissues subjected to reproductive biotechnologies is fundamental, and, in the case of foetal ovarian tissue xenotransplantation, such research is indispensable because the transplanted material still has a few differentiating factors [10] and it will be allocated

to another receiver species with a different genetic constitution from the donor. Therefore, cytogenetic analysis of the MN allows the observation of a possible genotoxic action, which can be disadvantageous for tissue viability [11]. Micronuclei are DNA fragments separated from the main nucleus during the conclusion of the telophase in mitosis, as they probably did not bind to the spindle during segregation in anaphase [12].

There are no studies that relate to vitrification and xenotransplantation with possible chromosomal alterations. In view of the applicability and importance of vitrification techniques as a tissue preservation method and xenotransplantation as a reproductive technique, it is important to study potential genotoxicity arising from these techniques. The aim of this study was to evaluate the morphology and development ability of preantral follicles and chromosomal abnormalities related to the presence of micronuclei (MN) in bovine foetal ovarian tissues after vitrification and/or xenotransplantation.

2. Methodology

2.1 Ethics Committee on Animal Experiments

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia, under protocol number 006/17.

2.2 Ovaries Collection

10 Bovine foetal ovaries (5 pairs) at least at 180 days of gestation were collected in a local slaughterhouse. The age of the foetus was determined by the length (cm) from the atlanto- occipital joint to the origin of the tail [13]. After collection, ovaries were washed in alcohol 70% for 10 s, washed twice in PBS, and then transported to the Animal Reproduction Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine - UFU in isothermal containers at 4°C within 2 h.

2.3 Preparation of samples and experimental design

In the laboratory, ovaries were cut in half; the fragmentation of the ovarian cortex yielded 3 x 3 x 1 mm fragments randomly distributed throughout the following groups: Fresh control (FC), Vitrificated Control (VC), Vitrificated xenotransplanted (VX), and Fresh Xenotransplanted (FX); with 25 fragments to each group. Two replicates were carried out. Fragments from all treatments were subjected to cytogenetic analysis and

classic histology. A part of the fragments for the FC group was fixed in 4% paraformaldehyde for 3 h and then fixed in 70% alcohol for histological analysis; the other part was placed in a saline solution for cytogenetic analysis.

2.4 Vitrification, thawing and cryprotection removal

The ovarian fragment vitrification protocol involved equilibrium of the samples in two vitrification solutions (VS) with different concentrations of cryoprotectants [14]. Solution 1 (S1) contained tissue culture medium 199 (TCM199) supplemented with 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.25 M sucrose, 10% ethylene glycol (EG), and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). Solution 2 (S2) contained TCM199 supplemented with 10 mg/mL BSA, 0.25 M sucrose, 20% EG, and 20% DMSO. Ovarian fragments were exposed to S1 for 4 min and then to S2 for 1 min. The whole procedure was carried out at room temperature (25°C). Then, the fragments were placed in French sheaths (normally used in artificial insemination) filled with S2, sealed with acrylic mass, exposed to nitrogen vapor for 5 min (-30°C), and then stored in liquid nitrogen (-196°C) for 1 week [15].

After 7 days, the samples were thawed as described. The ovarian fragments were exposed to room temperature for 30 s and then immersed in a water bath at 37°C for 1 min. After thawing, the fragments of the vitrified group were subjected to removal of the VS by a washing solution (WS), which was carried out in 3 steps: I) TCM199 + 3 mg/mL BSA + 0.5 M sucrose, II) TCM199 + 3 mg/mL BSA + 0.25 M sucrose, and III) TCM199 + 3 mg/mL BSA. Fragments were kept for 5 min in each step [14]. After thawing the fragments, they were incubated for 24 h in 24-well plates containing 500 µL TCM199 supplemented with gentamicin (1 µL/mL) at room temperature [16].

2.5 Xenotransplantation

Ten mice (6-week-old female BALB C) were used. They were bred in the reproduction section of the Bioterie of the Federal University of Uberlândia with a live weight of about 20 g. Before surgery, the mice were anaesthetised with 0.05 ml of 0.2% Acepran (1% Acepromazine - Vetnil, Vetecia Veterinary Products Laboratories, Louveira - SP), 0.09 ml of Xylazine 2% (Xylazine hydrochloride 2% - Syntec, Rhobifarma Pharmaceutical Industry, Hortolândia - SP), and Ketamine 2% (Ketamine hydrochloride 10% - Syntec, Rhobifarma Pharmaceutical Industry, Hortolândia - SP). Pain was controlled during the post-operative period with 0.05 ml Tramadol (Tramadol hydrochloride 50 mg/mL - Hipolabor Pharmaceuticals Ltd., Belo Horizonte - MG) and a

single dose of 0.05 ml of Pentabiotic Veterinary Small Animals (Zoetis Industry Ltda Veterinary Products, Fort Dodge Animal Health, Paulinia. - SP). Each animal was transplanted with five ovarian tissue fragments, which were fixed in the peritoneal abdominal cavity by a 6/0 Nylon non-absorbable suture. After transplantation of ovarian fragments, mice were housed at individual cages in temperature-controlled rooms (22°C) with alternate light and dark every 12 h. The animals were housed within the Network animal rodents of the Federal University of Uberlândia. Water and food offered were previously sterilized. The recovery of the grafts was made 14 days after transplantation. Mice were anaesthetised and euthanised using general anaesthesia. Fragments were surgically retrieved for further analysis.

2.6 Scores of tissue recovered

After 14 days, at the time of fragment recovery, the foetal bovine ovarian tissue fragments subjected to FX and VX were classified macroscopically according to the following criteria. (A) morphology, 1 = necrotic (totally dark); 2 = some points of necrosis; 3 = intact; 4 = intact and slightly swollen; and 5 = intact and swollen with increased volume; (B) adhesion, 1 = poor (ease removal); 2 = slightly inserted; 3 = moderate (well inserted); 4 = strong (well inserted with some difficulty to remove); and 5 = intense (very difficult to remove); and (C) haemorrhage, 1 = absent; 2 = up two areas; 3 = half of the fragment; 4 = two thirds of the fragment; 5 = all fragment. All classifications were performed by a single operator.

2.7 Classic histology

Fragments were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h and then kept in alcohol 70% to perform classical histological analyses. After embedding the fragments in paraffin, they were serially sectioned (7 mm thick) [17] and stained with haematoxylin and eosin (HE). The slides were analysed using light microscopy (Nikon, Japan) at 400x, and images captured using the Leica Imaging Software, Wetzlar, Germany. Follicles were classified as normal when the oocyte and nucleus were preserved and surrounded by granulosa cells arranged in one or more layers; follicles were classified as degenerate (abnormal) when they showed retracted or disorganized cytoplasm, oocyte with granulosa cells separated from basement membrane and the oocyte with pyknotic nucleus [18].

The preantral follicles were measured and ranked according to the developmental

stage: primordial (oocyte surrounded by a layer of granulosa cells with flattened elliptical shape), primary (one full layer of cuboidal granulosa cells and oocyte with any spherical aspect), and secondary (oocyte zona pellucida surrounded by two or more layers of cuboidal granulosa cells) [19]. The number of blood vessels per histologic section was counted in each section. All histological evaluation was performed by the same operator.

2.8 Cytogenetics

The methodology of tissue dissociation for cytogenetics analysis was developed by the authors for the purpose of research because there are no reports on performing cytogenetic analysis in foetal ovarian tissues. The principle was based on loosening the collagen matrix of foetal bovine ovarian tissues by enzymatic digestion of genetic material. Subsequently, samples were stained with a Hoechst 33258 fluorochrome for analysis in the fluorescence microscope (Olympus) of the Laboratory of Microscopy Image and Vegetal Morphology of the Federal University of Uberlândia (LAMOVI - UFU).

2.8.1 Tissue Dissociation

The fragmented tissue (3 x 3 x 1 mm) was transferred to an Eppendorf tube. Then, 0.5 mL of the enzyme solution (20 U/ μ L) was added. For loosening the collagenous matrix, we used the enzyme collagenase type I, isolated from *Clostridium histolyticum* (GIBCO). The enzyme was prepared according to the manufacturer's instructions and used at a concentration of 20 U/ μ L. The Eppendorf tubes were kept in a water bath at 37°C, and dissolution was assisted by periodic repeated pipetting of the suspension. After 3 h, enzyme activity was blocked with 450 μ L of 100% acetic acid and 50 μ L of distilled water. To obtain the cell concentrate, the Eppendorf tube was centrifuged at 1000 rpm for 15 min, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 20 μ L of 45% acetic acid. This final volume was transferred to the slide for smear.

2.8.2 Staining with the fluorochrome Hoechst

After drying the slide, 50 μ L of the Hoechst 33258 fluorochrome (diluted in PBS) was added. Then, a cover slip was placed over the slide for approximately 20 min in an oven at 37°C to dry the fluorochrome. After drying, the cover slip was removed using distilled water, 50 μ L of the assembly solution was added on the slide, and another coverslip was positioned.

2.8.3 Reading the blades

Slides were visualised in an Olympus fluorescence microscope at LAMOV – UFU. The number of cells with micronuclei per 1000 cells were counted. Cells with apoptosis characteristics were not considered. It should be noted that all treatments were used in the preparation of slides for cytogenetic analysis (15 slides/treatment).

2.9 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, USA). Data that were not normally distributed (Shapiro-Wilk test) were subjected to logarithmic transformation. Parametric variables were compared between treatments using the Kruskal-Wallis test. Correlation analysis evaluated the correlation between percentage of normal follicles and follicular class. In addition, the odds ratio was determined to evaluate the influence of follicular class on the percentage of normal follicles after vitrification and xenotransplantation. Data were presented as mean ($\pm$ standard error of the mean) and percentage. Results were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

The morphology score, haemorrhage, and tissue adherence between the fragments subjected to fresh xenotransplantation and those undergoing vitrification prior to xenotransplantation were similar ($P > 0.05$) (Table 1). Additionally, correlation analysis between the parameters showed a positive correlation between the transplanted tissue's adherence and haemorrhage ($P < 0.05$) (Table 2).

Table 1 - Morphology, adherence, and haemorrhage scores of foetal bovine ovarian tissue fragments undergoing fresh xenotransplantation or xenografted after vitrification.

Treatment	Morphology	Adherence	Hemorrhage
FX	3.2 ± 0.44^a	3.8 ± 0.44^a	3.0 ± 1.0^a
VX	3.4 ± 0.54^a	3.6 ± 1.14^a	3.6 ± 0.89^a

Different letters in the columns indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). VX -

Vitrificated xenotransplanted, FX - Fresh xenotransplanted.

Table 2 - Correlations among morphology, adherence, and haemorrhage scores of foetal bovine ovarian tissue fragments after xenotransplantation.

	Morphology	Adherence	Hemorrhage
Treatment	ns	ns	ns
Morphology	-	ns	ns
Adherence	-	-	0.75**
Hemorrhage	-	-	-

ns - not significant; ** Statistically significant difference ($P < 0.01$)

A total of 5916 preantral follicles in 533 histological sections were analysed in this study. Follicular viability in the VC group was similar to that of the FC ($P > 0.05$) and higher ($P < 0.05$) than the xenotransplantation groups (FX and VX). In addition, fragments of the FX group showed a similar percentage of viable follicles ($P > 0.05$) than those of the FC and VX groups. Furthermore, we observed high follicular activation ($P < 0.05$) in fresh xenotransplanted group fragments compared to the FC and vitrification groups (Table 3).

In general, there was a reduction ($P > 0.05$) in the number of blood vessels in the histological sections from all treatments when compared to FC. The lowest ($P < 0.05$) number of vessels was observed in sections from the FX group. Additionally, the vitrification groups (VC and VX) showed similar results ($P > 0.05$) in the number of blood vessels measured in histological sections (Table 3).

Table 3 - Percentage viability, follicular activation, and number of blood vessels in histological sections of bovine foetal ovarian tissues subjected to various treatments.

Treatment	Viability (%) (mean $\pm$ SE)	Follicular activation (%) (mean $\pm$ SE)	Blood vessels / section (mean $\pm$ SE)
FC	85.9 $\pm$ 1.9 ^{bc}	52.9 $\pm$ 2.5 ^a	8.1 $\pm$ 0.5 ^c
VC	91.6 $\pm$ 1.5 ^c	68.1 $\pm$ 1.7 ^b	3.7 $\pm$ 0.2 ^b
FX	82.2 $\pm$ 1.60 ^{ab}	74.8 $\pm$ 2.3 ^c	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
VX	75.3 $\pm$ 2.1 ^a	68.0 $\pm$ 2.4 ^b	4.1 $\pm$ 0.2 ^b

Different letters in the column are statistically different ($P < 0.05$). SE - standard error. FC - Fresh control, VC - Vitricated control, FX - Fresh Xenotransplanted, VX - Vitricated xenotransplanted.

The number of blood vessels in foetal ovarian tissues showed a negative correlation with follicular activation (-0.33 , $P < 0.01$), as between the percentage of activated follicles and the percentage of follicular viability (-0.26 , $P < 0.001$).

The Odds Ratio analysis demonstrated that there is a higher probability (5.1-fold) that foetal ovarian tissue fragments with a higher percentage of morphologically viable follicles belong to the VX group than to the FX group ($P < 0.0001$). In addition, there is a higher probability (7.8-fold) that these fragments belong to the VC group than to the VX group ($P < 0.0001$). In contrast, analysis of the xenograft groups showed that there is a higher probability (1.5-fold) that foetal ovarian tissue fragments with a higher percentage of morphologically viable follicles belong to the FX group than to the VX group ($P < 0.001$) (Table 4).

Table 4 - Odds Ratio analysis for follicular viability in bovine foetal ovarian tissues assessed among treatments

Follicular Viability (%)	Odds Ratio	95% CI
VC x FX 96.2 (1802/1873) x 83.3 (695/834)	5.1 ***	3.7 to 6.8
VC x VX 96.2 (1802/1873) x 76.3 (490/642)	7.8 ***	5.8 to 10.6
FX x VX 83.3 (695/834) x 76.3 (490/642)	1.5 **	1.1 to 2.2

VC - Vitrificated control, FX - Fresh xenotransplanted, VX - Vitrificated xenotransplanted, 95% CI - confidence interval of 95%. *** (P < 0.0001), ** (P < 0.001).

In Table 5, the Odds Ratio analysis for follicular activation reveals that there is a higher probability (2.1-fold) that bovine foetal ovarian tissue fragments with a higher percentage of follicular activation belong to the FX group than to the CV group (P < 0.0001). In addition, there is a higher probability (2.3-fold) that these fragments belong to the FX group than to the VX group (P < 0.0001). However, the analysis was not significant when comparing the odds of probable follicular activation between CV and VX groups.

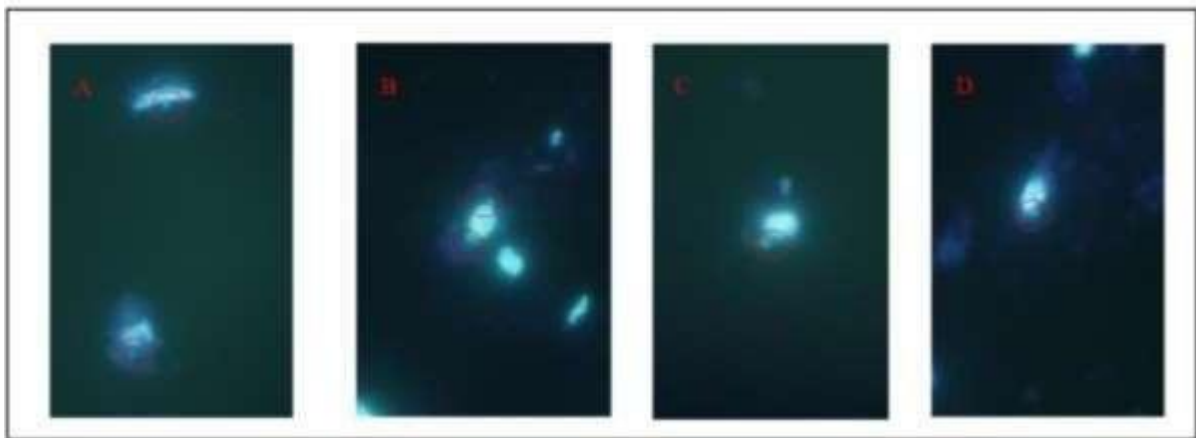
Table 5 - Odds Ratio analysis for follicular activation of bovine foetal ovarian tissues between the analysed treatments

Follicular Activation (%)	Odds Ratio	95% CI
FX x VC 80.1 (557/695) x 65.2 (1176/1802)	2.1 ***	1.7 to 2.6
FX x VX 80.1 (557/695) x 63.4 (311/490)	2.3 ***	1.7 to 3.0
VC x VX 65.2 (1176/1802) x 63.4 (311/490)	1,1 ^{ns}	0.8 to 1.3

VC- Vitrificated control, FX - Fresh xenotransplanted, VX - Vitrificated xenotransplanted, 95% CI - confidence interval of 95%. *** (P < 0.0001), ** (P < 0.001) ns - not significant (P > 0.05).

The presence of MN in ovarian tissue foetal cells was identified in all treatment fragments analysed (Figure 1).

Figure 1: Detection of micronuclei with the Hoechst 33258 fluorochrome in cells of bovine foetuses ovarian tissue fragments subjected to different treatments



A: micronucleated cells found in the fresh control group fragments. B: cells with two micronuclei found in the vitrified control fragments. C: micronucleated cell found in the fresh xenograft group. D: micronucleated cell found in the vitrified xenotransplanted group fragment.

From the results of the cytogenetic analysis, we noted that there were no differences in the number of cells with MN between any of the treated groups (VC, FX, and VX). However, all groups had higher amounts of MN ($P < 0.05$) compared to fragments from the FC group. All groups showed similar results when analysing the number of cells with more than one MN (Table 6).

Table 6 – Number (mean $\pm$ SE) of cells with micronuclei (MN) in bovine foetal ovarian tissue fragments subjected to different treatments.

Treatment	Cells with MN (mean $\pm$ SE)	Cells with two MN (mean $\pm$ SE)
FC	7.8 $\pm$ 0.6 ^a	0.6 $\pm$ 0.2 ^a
VC	11.4 $\pm$ 1.6 ^b	0.8 $\pm$ 0.4 ^a
VX	10.4 $\pm$ 0.6 ^b	0.2 $\pm$ 0.1 ^a
FX	10.0 $\pm$ 0.9 ^b	0.4 $\pm$ 0.2 ^a

Different letters in the column are statistically different ($P < 0.05$). SE - standard error. FC - Fresh control, VC - Vitrified Control, VX - Vitrified xenotransplanted, FX - Fresh xenotransplanted.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study that relates vitrification techniques and xenografts from bovine foetal ovarian tissues with possible chromosomal alterations.

The results from follicular viability in the vitrification groups demonstrate that this cryopreservation methodology is effective to preserve foetal ovarian tissues. Because xenografts have been shown as a technique that is more sensitive due to injuries caused by hypoxia and ischemia, and considering the biotechnology association, the VX group resulted in smaller follicular viability. Biotechnologies to which the ovarian fragments are exposed in order to keep follicular viability should provide the conditions to minimise follicular degeneration and allow development. This scenario is also favoured when using foetal material, as it is believed that it is in an important stage of tissue development, because it has low environmental interferences with lower incidence of degenerated follicles [2] and has a large amount of blood vessels. This can be explained by the fact that follicles in advanced stages of development require higher oxygen consumption [20], indicated by an increase in the metabolic rate; this situation may signal difficulties in tissue neoangiogenesis after transplantation. Most sections of the vasculature subjected to vitrification demonstrate that there is a low potential for injuries to the preexisting vessels and neoangiogenesis factors have an effective performance even after cryopreservation [7].

The lowest percentage of follicular activation in fragments subjected to vitrification shows that this methodology was efficient for the preservation of follicular reserves. This condition is essential in biotechnology, which is intended to preserve the reproductive capacity of females [21]. Additionally, during the foetal stage, the animal has greater reserves of primordial follicles that are more tolerant to cryopreservation due to their small size and relatively nonspecific morphology, in addition to a low metabolism [2].

Considering the fragments that were freshly xenotransplanted, it is probable that the changes seen in the ovarian tissues caused a reduction in the inhibiting factors related to follicular development processes that stimulate activation mechanisms. We should also to consider that intense activation follicular can be attributed to mechanical manipulation and post-transplant ischemia [22], which probably results in a decrease in the anti-Mullerian hormone inhibiting factor of follicular activation [23].

Negative correlations between activation and follicular viability, and between the percentage of activated follicles and the number of blood vessels in the tissue suggests that the supply of oxygen and nutrients received by the tissue are essential for follicle development. The most intense blood supply (due to the increased number of blood vessels) favours follicular activation, however, with the development of follicles and their consequential growth, there is a decrease in the number of vessels, suggesting that a new spatial configuration of foetal ovarian tissue occurs. Therefore, the higher the percentage of advanced stages of follicle activation, the lower the percentage of follicles considered viable in the tissue in question, and the fewer blood vessels by histological section.

The odds ratio analysis is a measure of epidemiological causality, thus it depicts the association between the obtained result and the applied technique. This measure is reported to be effective for this purpose and is used in other studies [15], confirming that even with the use of different sample sizes, the results of this study are valid. In this study, we found that the use of vitrification was effective to preserve the tissue and thus provided considerable follicular viability, whereas the use of xenotransplantation, with or without vitrification, although fundamental for culture, subjects the tissue to injury that can harm the morphology of the follicles. The results of the Odds Ratio analysis also reaffirm that the studied technique maintains good prospects for maintenance of preantral follicles included in bovine foetal ovarian tissues. Considering the objective of preserving the reproductive capacity for further utilisation of high livestock merit females' genetic material, which may be preserved in gene banks, the discrete inhibition of activation factors due to cryopreservation is beneficial for the maintenance of follicular reserves [24].

By subjecting foetal ovarian tissues to these techniques, attention should be paid to the fact that a more undifferentiated tissue than adult animal tissues is expected, which may induce severe damage to the genetic development of the future animal. The greatest amount of micronucleated cells in foetal ovarian tissue fragments that were exposed to vitrification and/or xenotransplantation demonstrates that the mutagenic aggression level of these techniques (alone or in combination) was similar. The frequency of MN in ovarian tissue cells provides a cumulative genetic damage index that occurs during the lifetime of these cells [25].

For the application of a MN cytogenetic assay to monitor chromosomal damage, the level of DNA damage in the "normal" population must be identified. In this study, the average was 7.8

± 0.6 micronucleated cells every 1,000 cells analysed in fragments of the FC group. A previous study [26] reported a smaller number (2.33 ± 2.23) of micronucleated cells per 1000 cells from ovarian tissue fragments of healthy BALB/C adult mice. This difference may be due to different species and even life stages of the animals under study. Foetal cells, as treated in this study, are in intensive mitotic division [27] and therefore may be more susceptible to formation of MN.

Vitrification demands high concentrations of cryoprotectant so that cells are supported in the lower temperatures. These factors can compromise the integrity of the membrane and organelles, and thus generate DNA damage such as the formation of MNs. It is possible that the fragments subjected to xenotransplantation had inflammation given the change of habitat, which induces oxidative stress in the tissue. According to Bartsch and Nair (2006) [28], the activation of inflammatory cells induces the production of enzymes oxidants such as NADPH oxidase, nitric oxide synthase (iNOS), xanthine oxidase (XO), and myeloperoxidase, which are responsible for the generation of high concentrations of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which react and form more potent reactive species such as peroxynitrite. These reactive species are capable of damaging DNA, producing breaks in their structure and generating MN.

Due to the genotoxic effect of both vitrification and xenotransplantation, it would be expected that the tissue that underwent both techniques presented an even greater number of MN than just vitrified or xenotransplanted tissues; this was not observed in this study. One possible explanation relates to the cell's machinery repair against damage to DNA, which was efficient by induction of apoptosis [25], and then restoring genetic

homeostasis.

The results of the MN quantification suggest the occurrence of cytogenetic changes associated with both vitrification (as an ovarian tissue preservation method) and the use of xenotransplantation. Interestingly, the frequency of chromosomal instability in infertile humans has been demonstrated by some authors. Trkova et al. (2000) [29] showed that the frequency of MN is increased in human couples with infertility or couples with two or more miscarriages. In the same line of research, Milosevic-Djordjevic et al. (2012) [30] showed that the frequency of MN in patients with fertility problems was higher compared to the average frequency of MN in healthy patients. The influence of genotoxicity presented by the presence of MN in future generations is not well defined, but it may be characterised by deletion of genes that have important characteristics for embryonic development and the species survival. Cytogenetic studies have been demonstrated to be fundamental to evaluate biotechnologies aimed at fertility preservation, in order to search and provide viability parameters of the applied methodologies and subsequent genetic safety for patients.

According to the morphology, haemorrhage, and adhesion scores evaluated in the tissue recovery, we noted that the vitrification process before xenotransplantation allowed the fragments to maintain the same characteristics as those freshly xenotransplanted, without any extra injuries to the tissue. This result demonstrates that vitrification has the potential to maintain the functionality of ovarian tissue, preserving it until time of use in *in vitro* [31] or *in vivo* procedures such as xenotransplantation. The positive correlation between adherence and haemorrhage scores demonstrate that perfusion of the blood vessels of the transplanted fragment influence its adherence. These factors are critical to tissue viability after surgery [7].

5. Conclusion

The use of vitrification and xenograft techniques maintained the reserve of preantral follicles included in bovine foetal ovarian tissues, however, the use of a cryopreservation methodology is more efficient in preserving the tissue, whereas the xenograft demonstrated to be a more sensitive technique due to injuries. Both vitrification and xenografts can generate damage to DNA structures, increasing micronucleus formation in the ovarian tissue cells of bovine foetuses.

Acknowledgment: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. We are also grateful for the support of the Rodent Biotteries (REBIR) of the Federal University of Uberlândia (UFU), the Cytogenetics Laboratory of UFU and the Laboratory of Morphology, Microscopy and Imaging (LAMOVI) of UFU.

References

- [1] Moraes GF, Ronda JB, Alves KA, Alves BG, Santos RM, Reis JPJ. et al. Visual evaluation of fetal bovine ovarian tissue fragments submitted to xenotransplantation. 2018. In: Anais da VII ISABR, Aracajú.
- [2] Paris MCJ, Snow M, Cox SL, Shaw JM. Xenotransplantation: A tool for reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology* 2004;61:277–91. doi:10.1016/S0093-691X(03)00234-6.
- [3] Lunardi FO, Araújo VR, Faustino LR, Carvalho A de A, Gonçalves RFB, Bass CS, et al. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Small Rumin Res* 2012;107:121–30. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.04.009.
- [4] Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro S V., Luz HKM, Rossetto R, et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology* 2011;76:933–41. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.04.024.
- [5] Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 2009;24:1670–83. doi:10.1093/humrep/dep079.
- [6] Lotz L, Montag M, Van Der Ven H, Von Wolff M, Mueller A, Hoffmann I, et al. Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with ovarian tumors into SCID mice - No evidence of malignant cell contamination. *Fertil Steril* 2011;95:2612-2614.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.05.003.
- [7] Henry L, Labied S, Fransolet M, Kirschvink N, Blacher S, Noel A, et al. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:1–10. doi:10.1186/s12958-015-0015-2.
- [8] Lee S, Ryu K, Kim B, Kang D, Kim YY, Kim T. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation 2019.
- [9] Ruan X, Cui Y, Du J, Jin J, Gu M, Chen S, et al. Randomized study to prove the quality of human ovarian tissue cryopreservation by xenotransplantation into mice. *J Ovarian Res* 2019;12:1–8. doi:10.1186/s13048-019-0521-5.

- [10] Cox S, Shaw J. Transplantation cryopreserved 1992.
- [11] Agostini JMS. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. Biotemas 1993;6:1–19. doi:10.5007/%X.
- [12] Doherty A, Bryce SM, Bemis JC. The *in vitro* micronucleus assay. In: Genetic Toxicology Testing- A Laboratory Manual, Academic Press. 2016, 161-205 doi: 10.1016/B978-0-12-800764-8.00006-9
- [13] C. E. Rexroad, Jr., L. E. Casida, and W. J. Tyler. Crown-Rump Length of Fetuses in Purebred Holstein-Friesian Cows. J Dairy Sci 1974;57:346–7. doi:10.3168/jds.S0022-0302(74)84891-5.
- [14] Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro S V., Lobo CH, Santos FW, et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. Res Vet Sci 2014;97:140–7. doi:10.1016/j.rvsc.2014.05.006.
- [15] Rocha CD, Soares MM, de Cássia Antonino D, Júnior JM, Freitas Mohallem RF, Ribeiro Rodrigues AP, et al. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. Theriogenology 2018;114:244–51. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.04.004.
- [16] Dai J, Wu C, Muneri CW, Niu Y, Zhang S, Rui R, et al. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. Cryobiology 2015;71:291–8. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.08.002.
- [17] Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RFF, Gastal MO, et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. Theriogenology 2015;83:1048–55. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.004.
- [18] Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Morphological classification of bovine ovarian follicles. Reproduction 2010;139:309–18.
- [19] Figueiredo Jr, Hulshof Scj, Van Den Hurk R, Ectors FJ, Fontes RS, Nusgenq B, et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. Theriogenology. 1993; 40:789-799.
- [20] Yoshiki S, Hiradate Y, Inoue H, Sato E, Tanemura K. Advance Publication by J-STAGE Journal of Reproduction and Development. J Reprod Dev 2014.
- [21] Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van Den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. Cell Tissue Res 2007;327:167–76. doi:10.1007/s00441-006-0240-2.
- [22] Gavish Z, Peer G, Hadassa R, Yoram C, Meirow D. Follicle activation and “burn-out” contribute to post-transplantation follicle loss in ovarian tissue grafts: The effect of graft thickness. Hum Reprod 2014;29:989–96. doi:10.1093/humrep/deu015.
- [23] Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: A new marker for ovarian function. Reproduction 2006;131:1–9. doi:10.1530/rep.1.00529.

- [24] Figueiredo JR, Jales J, Celestino H, Paula A, Rodrigues R, Roberto J, et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. 2007;31:143–52.
- [25] Stopper H, Muller S. General Cytotoxicity Micronuclei as a Biological Endpoint Genotoxicity : A Minireview for. *Toxicol Vitr* 1997;11:661–7.
- [26] Salimi-Asl M, Mozdarani H, Kadivar M. Up-regulation of miR-21 and 146a expression and increased DNA damage frequency in a mouse model of polycystic ovary syndrome (PCOS). *BiolImpacts* 2016;6:85–91. doi:10.15171/bi.2016.12.
- [27] Diniz EG, Esper CR, Jacomini JO, Wein RC. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2005;57:70–6.
- [28] Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Arch Surg* 2006;391:499– 510. doi:10.1007/s00423-006-0073-1.
- [29] Trková M, Kapras J, Bobková K, Stanková J, Mejstnarová B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. *Reprod Toxicol* 2000;14:331–5. doi:10.1016/S0890-6238(00)00087- 3.
- [30] Milosevic-Djordjevic O, Stošić I, Grujičić D, Zelen I, Sazdanović P. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63:367–75. doi:10.2478/10004-1254-63-2012-2225.
- [31] Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Magnani V, Paradisi R, Venturoli S. Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum. *Reprod Biomed Online* 2010;21:819–28. doi:10.1016/j.rbmo.2010.07.008.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial reprodutivo das fêmeas é subutilizado, pois apesar da grande reserva de folículos ovarianos, apenas alguns conseguirão chegar à ovulação. Em seres humanos, protocolos de manutenção da fertilidade são essenciais, como em casos de mulheres que optam por uma gravidez em idade mais avançada ou tenham sido submetidas a tratamentos quimioterápicos, tóxicos para os ovários. Já em animais, o aproveitamento da capacidade reprodutiva de fêmeas, além de fomentar a criação de bancos de gametas para espécies em extinção, naqueles de interesse zootécnico, pode culminar em maior número de descendentes de alto mérito genético, em menor intervalo de tempo. Para viabilizar tais situações, o estudo de biotecnologias reprodutivas, é então, fundamental, permitindo que haja evolução das metodologias utilizadas, como a vitrificação e o cultivo *in vitro* ou *in vivo* de folículos. As biotecnologias devem manter a viabilidade e reserva folicular, além de fornecerem segurança genética.

Com grande número de folículos primordiais e baixa exposição a fatores externos, o tecido ovariano bovino fetal submetido a biotecnologias apresenta bons resultados de manutenção da viabilidade, prospectando produção *in vitro* de embriões, com menor intervalo de gerações, quando se considera o emprego na produção animal. As biotecnologias de cultivo *in vitro* e *in vivo* (xenotransplante), apresentaram-se capazes de manter a viabilidade de folículos pré antrais inclusos em tecido ovariano fetal bovino, sendo que houve maior preservação da reserva folicular em tecido submetido ao xenotransplante. Já a vitrificação, demonstrou ser eficiente na preservação do tecido, podendo ser associada aos métodos de cultivo. Entretanto, deve-se atentar para o fato de que tanto a vitrificação quanto o xenotransplante foram capazes de gerar danos a estrutura do DNA, aumentando a formação de micronúcleos no tecido ovariano fetal bovino, o que pode surtir em deleção de genes. Caso tais danos ocorram em células germinativas, há de se considerar o risco para a progênie, que poderia apresentar em seu material genético alterações decorrentes da formação de micronúcleos. Há então, futuramente, a necessidade de realização de monitoramento de seres que sejam gerados com o auxílio dessas biotecnologias, para haja o acompanhamento de possíveis alterações no material genético e suas consequências.

Pesquisas que avaliam a responsividade e a segurança genética de biotecnologias fornecem parâmetros para auxiliar na opção por determinada metodologia de forma mais

segura e confiável, de acordo com as expectativas de viabilidade e ativação folicular. Posteriormente, espera-se que novos estudos possam expandir os resultados, abordando consequências das alterações citogenéticas estimuladas por biotecnologias reprodutivas. Dessa forma, poderão fornecer maiores indícios sobre exequíveis melhorias nas metodologias praticadas atualmente.