

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FELIPE PEREIRA DA SILVA BARÇANTE

**ENSAIO CLÍNICO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) NA
RECUPERAÇÃO DE OVÁRIOS DE CABRAS SUBMETIDAS A MÚLTIPLAS
ASPIRAÇÕES FOLICULARES POR LAPAROSCOPIA (LOPU)**

TERESINA - PI

2017

FELIPE PEREIRA DA SILVA BARÇANTE

**ENSAIO CLÍNICO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) NA
RECUPERAÇÃO DE OVÁRIOS DE CABRAS SUBMETIDAS A MÚLTIPLAS
ASPIRAÇÕES FOLICULARES POR LAPAROSCOPIA (LOPU)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,
como requisito para obtenção do Título de Doutor
em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução
Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de
Souza

Co-orientadora: Maria Acelina Martins de
Carvalho

TERESINA-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

B116e Barçante, Felipe Pereira da Silva

Ensaio clínico com células-tronco mesenquimais (CTM) na recuperação de ovários de cabras submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) / Felipe Pereira da Silva Barçante - 2018.

71 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2018.

Orientação: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Caprinos 2. Punção folicular 3. Laparoscopia 4. Células-tronco 5. Ovário I.Título.

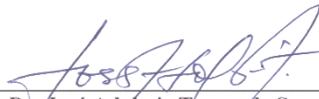
CDD 636.39

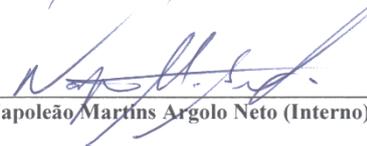
ENSAIO CLÍNICO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM) NA
RECUPERAÇÃO DE OVÁRIOS DE CABRAS SUBMETIDAS A MÚLTIPLAS
ASPIRAÇÕES FOLICULARES POR LAPAROSCOPIA (LOPU)

FELIPE PEREIRA DA SILVA BARÇANTE

Tese aprovada em: 25/08/2017

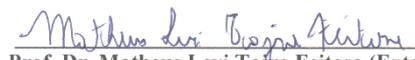
Banca Examinadora:


Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI


Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DCCV/CCA/UFPI


Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior (Externo) / UEMA


Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Externo) / UECE


Prof. Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa (Externo) / UEMA

Dedico este trabalho aos meus pais Guilherme e Liliane, à minha esposa Patrícia, aos meus filhos Luiz Felipe e Maria Flor e à minha avó Maria Zélia Melo Pereira da Silva (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo milagre da vida e por ter me dado forças para remover as pedras do caminho ou até mesmo contorná-las, quando isso não foi possível.

À Universidade Federal do Piauí - UFPI, que instituiu no Centro de Ciências Agrárias o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, possibilitando a realização desta Tese.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Piauí- FAPEPI, que disponibilizou bolsa de estudo viabilizando assim minha total dedicação ao doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, Guilherme Medeiros Barçante e Liliane Pereira da Silva Barçante por todo apoio, incentivo, educação e principalmente por terem me dado a vida;

À Patrícia Sobral Barçante, minha esposa que tanto amo, por todo companheirismo e dedicação. Por sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando nem eu mesmo mais acreditava. Muito obrigado!

À meus filhos Maria Flor e Luiz Felipe, motivo pelo qual tenho forças para seguir em frente, me dedicando dia após dia para lhes dar uma vida de amor, educação e sabedoria.

À minha Família, meus avôs Aníbal e Leopoldo (*in memorian*), minhas avós Zélia (*in memorian*) e Aparecida (*in memorian*), minha irmã Flávia e meus cunhados Alessandro, Rodrigo e Juliana, minha sogra Edilce e meu sogrão Amir, tios João Luiz, Ivana, Rommel e Marília, meus primos e primas por todo o incentivo e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, por ter me aceitado em sua equipe e por contribuir com minha formação profissional, proporcionando a conclusão do doutorado. Uma pessoa que tem todo meu respeito, admiração e amizade. Serei seu eterno orientado, Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Antonio de Sousa Júnior, pela contribuição fundamental para conclusão do experimento. Dr Jr é a pessoa que me espelho como profissional e como pessoa. Muito obrigado meu amigo!

Ao amigo Felipe de Jesus, por dedicar parte do seu tempo contribuindo de forma fundamental para conclusão da tese. Dividindo seu tempo entre cuidar do pequeno João Felipe e viagens ao Maranhão, mesmo assim arrumava tempo sempre que solicitado.

À prof^a. Dr^a Maria Acelina Martins de Carvalho, por viabilizar o desenvolvimento do experimento e por coordenar o projeto do ovário artificial no Piauí, sempre de forma clara e objetiva cobrando resultados. Professora se não fosse a senhora com suas cobranças e com seus incentivos não teríamos conseguido finalizar esta etapa do projeto. Muito obrigado!

Aos membros da banca Prof. Dr. José Ricardo Figueiredo, Prof. Dr. Matheus Levi Tajra Feitosa, Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, por aceitarem o convite e principalmente pelas sugestões para finalização da tese.

Aos amigos da Reprodução Animal/LBRA/UFPI Filipe Nunes, Cícero, Marlon, Luiz, Bruno Prado, Bruno Oliveira, Ícaro, Marcos Celestino vulgo “Marquim”, Sávio, Prof. Ney Rômulo, Dr^a. Isolda, Prof^a. Ana Lys, Viviany (futura sogra do meu filho Luiz Felipe), Deyse, Leopoldina, Luanna,, Dayse, Dayana, Micheli, Samara, Sabrina, por toda dedicação e amizade, agradeço em especial ao Jefferson vulgo “Jeffim”, Yndyra Nayan, Micherlene, que participaram ativamente de todas as etapas do projeto. Valeu de mais... Muito obrigado!

Aos amigos do NUPcelt, Renata Patrícia, Hermínio, Lucilene, Camila, Yulla Camila Arrivabene e Clautina, por toda ajuda tanto na execução do experimento quanto na elaboração da tese.

Aos amigos da Clínica de Grandes Animais da UFPI- Ramiro, Rafael, Glads, Matheus, Daniel, Alcir, Ana Luiza, Rosvaldo e Prof. Solano, por estarem sempre prontos quando eu precisava, sou muito grato pela ajuda de vocês.

Às funcionárias do NUPcelt Flávia e Luciana por organizar e limpar toda a bagunça feitas por nós e as cabrinhas do experimento. Em especial a Fabiana que ajudava a acalmar a professora Acelina nos momentos tensos, principalmente durante as reuniões, além de conseguia desenrolar todos os “pepinos” que apareciam e sempre me tratando muito bem. Muito obrigado!

Ao produtor José Wilson Rodrigues, por ceder alguns animais para a realização do experimento.

Aos funcionários do LBRA dona Noêmia, seu Zé, Narciso, Cléo e James, por todo suporte que nos proporciona todos os dias.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xi
Abstract.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Lesões ovarianas e comprometimento reprodutivo	16
2.2 Células-tronco.....	17
2.3 Produção in vitro de embriões	20
2.4 Origem e obtenção dos oócitos.....	21
2.4.1 Aspiração folicular por laparoscopia (LOPU).....	22
3 REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO I.....	30
Resumo	31
Introdução	32
Materiais e Métodos	33
Local e período de realização do experimento	33
Seleção dos animais experimentais	33
Sincronização e estimulação ovariana.....	33
Preparo dos animais e protocolo anestésico	34
Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU).....	34
Lavagem, rastreamento e seleção dos Complexos Cumulus Oophorus (CCO)	36
Biópsias	36
Dosagens Hormonais.....	36
Análise estatística	37
Resultados	37
Discussão	41
Conclusão	44
Referências	44
CAPÍTULO II.....	49
Resumo	50
1. Introdução	51

2. Material e Métodos	53
2.1. Comitê de Ética	53
2.2. Local e período de realização do experimento	53
2.3. Seleção dos animais experimentais	53
2.5. Aspirações foliculares e infusão de células tronco	55
2.6. Preparo dos animais e protocolo anestésico	55
2.7. Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU).....	56
2.8. Lavagem, rastreamento e seleção dos Complexos Cumulus Oophorus (CCO)	57
2.9. Obtenção, isolamento e cultivo de Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (CTCU).....	57
2.10. Marcação, transplante e rastreamento das células-tronco mesenquimais.....	57
2.11. Biópsias e cortes histológicos dos ovários	58
2.12. Análise estatística	58
3. Resultados	59
4. Discussão	63
5. Conclusão	65
Referências	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

Figura 1	Esquema de tratamento hormonal, punções foliculares, coletas sanguíneas e biopsias ovarianas em cabras durante o período experimental	35
Figura 2	Grau de qualidade dos Complexos <i>Cumulus oophorus</i> (CCO's) colhidos em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD	39
Figura 3	Viabilidade dos Complexos <i>Cumulus oophorus</i> (CCO's) colhidos em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD	39
Figura 4	Cortes histológicos de tecido ovariano caprino antes e após sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia em fêmeas caprinas SPRD	40
Figura 5	Níveis de progesterona e estradiol de cabras submetidas a sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia	41

CAPITULO 2

Figura 1	Esquema de tratamento hormonal, punções foliculares, coletas sanguíneas, biopsias ovarianas, infusão com células-tronco mesenquimais e ovariectomia em cabras durante o período experimental	54
Figura 2	Grau de qualidade dos Complexos <i>Cumulus oophorus</i> (CCO's) colhidos em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD tratadas e não tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)	61
Figura 3	Viabilidade dos Complexos <i>Cumulus oophorus</i> (CCO's) colhidos em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD tratadas e não tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)	61
Figura 4	Cortes histológicos de ovários caprinos. Folículo terciário (A). Parênquima ovariano normal: vasos (seta) (B), Folículos primordiais	62

(seta preta) e corpo *albicans* (seta vermelha) (C) Área de infiltrado inflamatório mononuclear focal (D). Hemorragia focal (E) e Pigmentos de hemossiderina (F), H-E, aumento de 200x

Figura 5 Fotomicrografia de fluorescência de CTM's marcadas com Qtracker® em cortes parafinados de tecido ovariano de cabras após 115 dias de infusão celular, ovário direito (A), ovário esquerdo (B) **63**

LISTA DE TABELAS**CAPITULO 1**

Tabela 1	Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação oocitária em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD	38
-----------------	---	-----------

CAPITULO 2

Tabela 1	Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação oocitária em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD tratadas e não tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)	60
-----------------	---	-----------

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CCO – Complexo cúmulo oócito
CIV – Cultivo *in vitro*
CT – Células-tronco
CTA – Células-tronco adultas
CTE – Células-tronco embrionárias
CTM – Células-tronco mesenquimais
CTR - Controle
D0 – Dia 0
ECC – Escore de condição corporal
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
FIV – Fertilização *in vitro*
FSHp – Hormônio Folículo Estimulante Suíno
IA – Inseminação Artificial
IM - Intramuscular
IV - Intravenoso
Kg - Kilograma
LOPU – Punção Ovariana por Laparoscopia
mg - Miligrama
min - Minuto
MIV – Maturação *in vitro*
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MOET - Transferência de embriões após múltiplas ovulações
MOIFOPA - Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
OPU - Punção de folículos guiada por ultra-som
PIV – Produção *in vitro*
RIA – Radioimunensaio
RPM – Rotação por Minuto
SPRD – Sem Padrão Racial Definido
UI – Unidade Internacional
µg - Micrograma

RESUMO

Os problemas ligados à diminuição do potencial produtivo dos ovários estão entre os principais fatores limitantes à reprodução com isso, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da infusão de células-tronco mesenquimais (CTM) em ovários de cabras submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU). Foram utilizadas cabras sem padrão racial definido (SPRD), não lactantes, com idade média de três anos e escore da condição corporal (ECC) variando de 3,0 a 4,0 e distribuídas em dois experimentos, no primeiro com doze cabras (n=12) e no segundo com sete (n=7). No experimento um as cabras foram sincronizadas com o uso de esponjas intravaginais com acetato de medroxiprogesterona e aplicações de d-cloprostenol e a estimulação ovariana constituiu-se na administração de FSHp e eCG, em aplicações únicas, feita 36 horas anterior às LOPU's, e posteriormente as fêmeas foram submetidas a 5 sessões/animal de LOPU com intervalos de 12 dias. No experimento dois as cabras sincronizadas da mesma forma do experimento um e posteriormente divididas em dois tratamentos: T1-CTR (Controle – 3 animais); T2 - CTM (ovários tratados com células tronco mesenquimais – 4 animais), incluindo a terapia celular através de infusão ovariana com células tronco – CTM, na concentração de 1×10^6 cel/mL, nanomarcadas com Qtracker® e diluídas em 0,2 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,9%) em duas aplicações: na última LOPU e 70 dias após. As avaliações quanto à funcionalidade ovariana/oocitária foi realizada 45 dias posterior à última infusão de CTM. Coletas de sangue para dosagens hormonais de estradiol e progesterona foram realizadas, antes da primeira, e após a quinta LOPU juntamente com biopsias do córtex ovariano. A avaliação histológica foi realizada após 115 dias da primeira infusão de CTM, a partir do abate dos animais e coleta dos ovários. Todas as análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2002). No experimento um, houve diferença significativa ($P < 0,05$) na média de folículos aspirados com menor média na 3ª LOPU. Em relação à média de oócitos recuperados, não observou-se diferença significativa entre a 1ª e a 5ª LOPU ($P > 0,05$), porém as médias dos folículos aspirados na 2ª, 3ª e 4ª LOPU reduziram significativamente em relação a 1ª LOPU ($P < 0,05$). Quanto a taxa de recuperação oocitária, houve uma redução na 3ª e 4ª LOPU em relação à 1ª e 2ª LOPU ($P < 0,05$) e na 5ª LOPU observou-se um aumento da recuperação oocitaria em relação à 3ª e 4ª LOPU ($P < 0,05$). Quanto a qualidade, os CCO's de grau 2 reduziram entre a 1ª e a 4ª LOPU e os oócitos de grau 4 aumentaram na 2ª, 4ª e 5ª LOPU em relação a 1ª e 3ª LOPU ($P < 0,05$). Houve uma redução ($P < 0,05$) de estruturas viáveis na 2ª e 4ª LOPU (46,4% e 53,8% respectivamente), com retomada da viabilidade na 3ª e 5ª LOPU (80,76% e 61,2% respectivamente). As biópsias que antecederam as coletas e pós sucessivas aspirações evidenciaram tecidos ovarianos morfológicamente normais, com alterações discretas no parênquima ovariano. Não houve diferença ($P > 0,05$) na dosagem de progesterona entre as sucessivas LOPU's porém houve um aumento ($P < 0,05$) na dosagem de estradiol da 2ª LOPU em relação às demais. No experimento 2, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação em relação aos grupos controle e grupos tratados com CTM's. Em relação a qualidade dos CCO's não ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) entre as classificações das estruturas oocitárias. Nas avaliações histológicas foram observadas discretas alterações no parênquima ovariano, sem comprometimento do mesmo. Conclui-se que, cinco sessões de aspirações foliculares por laparoscopia com intervalos de doses dias não interfere morfofuncionalmente nos ovários de cabras e que a utilização de CTM não influenciou nos parâmetros qualitativos e quantitativos de oócitos recuperados por LOPU de cabras SPRD.

Palavras-chave: Punção folicular, caprinos, laparoscopia, células tronco, ovário.

Abstract

The problems related to the reduction of ovaries productive potential are among the main limiting factors for reproduction, therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of the infusion of mesenchymal stem cells (CTM) on ovary of goats submitted to multiple follicular aspirations by laparoscopy (LOPU). Goats with undefined racial pattern (SPRD), non-lactating, with mean age of three years and body condition scoring (ECC) ranging from 3.0 to 4.0 were used and distributed in two experiments, in the first with twelve goats (n= 12) and in the second with seven (n = 7). In the first experiment, the goats were synchronized using intravaginal sponges with medroxyprogesterone acetate and d-cloprostenol applications, ovarian stimulation consisted of administration of FSHp and eCG in single applications 36 hours prior to LOPUs, and later females were submitted to 5 sessions/animal of LOPU at 12-day intervals. In the second experiment, the goats were synchronized in the same way of the first experiment and later divided into two treatments: T1-CTR (Control - 3 animals); T2-CTM (ovaries treated with mesenchymal stem cells - 4 animals), including cell therapy through ovarian infusion in two applications with 1×10^6 cel/mL of stem cells - CTM, nanoparticulated with Qtracker® and diluted in 0.2 mL of physiological solution (0.9% NaCl), these two applications were performed at the last LOPU and 70 days after. Evaluations for ovarian / oocyte functionality were performed 45 days after the last CTM infusion. Blood collections for hormonal dosages of estradiol and progesterone were performed, before the first LOPU, and after the fifth LOPU simultaneously to biopsies of the ovarian cortex. The histological evaluation was performed after the animals slaughter and collection of the ovaries, 115 days after the first CTM infusion. All analyzes were performed through the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2002). In the first experiment, there was a significant difference ($P < 0.05$) in the mean of the aspirated follicles with lower mean in the 3rd LOPU. Regarding the mean of oocytes recovered, no significant difference was observed between the 1st and 5th LOPU ($P > 0.05$), however the mean of follicles aspirated in 2nd, 3rd and 4th LOPU significantly reduced compared to 1st LOPU ($P < 0.05$). Regarding the oocyte recovery rate, there was a reduction in the 3rd and 4th LOPU in relation to the 1st and 2nd LOPU ($P < 0.05$) and in the 5th LOPU there was an increase in oocyte recovery in relation to the 3rd and 4th LOPU ($P < 0.05$). As regards the quality, the grade 2 levels of the CCO system increased between 1st and 4th LOPU and grade 4 levels increased in 2nd, 4th and 5th LOPU in relation to 1st and 3rd LOPU ($P < 0.05$). There was a reduction ($P < 0.05$) of viable structures in the 2nd and 4th LOPU (46.4% and 53.8%, respectively), with recovery of viability in the 3rd and 5th LOPU (80.76% and 61.2% respectively). The biopsies that preceded the collections and subsequent successive aspirations revealed morphologically normal ovarian tissues, with discrete alterations in the ovarian parenchyma. There was no difference ($P > 0.05$) in the progesterone dosage between successive LOPU's, but there was an increase ($P < 0.05$) in the estradiol dosage of the 2nd LOPU in relation to the others. In the second experiment, there was no significant difference ($P > 0.05$) between aspirated follicles, recovered oocytes and recovery rate in relation to the control groups and groups treated with CTM's. Regarding the quality of CCOs, there was no significant difference ($P < 0.05$) between the classifications of oocyte structures. In the histological evaluations, discrete alterations in the ovarian parenchyma were observed, without any impairment. It was concluded that five sessions of follicular aspiration by laparoscopy with dose and day

intervals did not interfere morphofunctionally in the ovaries of goats and that the use of CTM did not influence the qualitative and quantitative parameters of oocytes recovered by LOPU from SPRD goats.

Key words: Follicular puncture, goats, laparoscopy, stem cells, ovary.

1 INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Neste sentido, especialmente no tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial (IA), fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões (TE) vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras biotécnicas estão em fase de desenvolvimento e são objetos de intensas pesquisas.

Diversas tecnologias reprodutivas, tais como produção *in vitro* de embriões (PIV), transgênese e clonagem podem ser amplamente aplicadas às espécies domésticas. No entanto, para a sua execução é necessária uma grande quantidade de complexos *cumulus ooforus* (CCO's) competentes capazes de produzir embriões e, conseqüentemente, maximizar a produção de caprinos.

Em pequenos ruminantes a PIV foi inicialmente adaptada a partir de protocolos de bovinos, o que demonstrou uma marcante diferença entre as espécies (PADILHA, 2013), com o avançar das pesquisas, os protocolos foram sendo adaptados aos pequenos ruminantes e conseqüentemente os resultados foram aparecendo (COX; ALFARO, 2007). A obtenção dos CCO's é etapa fundamental para a realização da biotécnica de PIV em animais domésticos, e esses podem ser colhidos de ovários obtidos em abatedouros, por ovariectomia ou *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultrassom (GONÇALVES et al., 2008; PADILHA, 2013).

A aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) vem sendo a mais utilizada na obtenção de oócitos, principalmente por permitir que a mesma doadora possa ser utilizada repetidamente, uma vez que o procedimento é minimamente invasivo e a recuperação pós-operatória é muito mais rápida (ABDULLAH et al., 2008). Outro fato marcante é que o sistema permite a produção de descendentes de animais que não seriam capazes de reproduzir usando inseminação artificial ou transferência de embriões após múltiplas ovulações (MOET), tais como animais pré-púberes (TEIXEIRA, 2013).

Apesar dos excelentes resultados obtidos na recuperação de oócitos por LOPU (BALDASSARRE et al., 1994; BALDASSARRE et al., 1996; BALDASSARRE et al., 2002), ainda são encontrados resultados controversos na literatura, principalmente quanto a

diminuição do número de folículos e da qualidade dos oócitos aspirados (CORDEIRO et al., 2014) e o aparecimento de alterações ovarianas que podem comprometer a recuperação dos oócitos (VIANA et al., 2003) após sucessivas punções foliculares. Outra observação relevante, é que apesar de pouca ocorrência, também pode ser observada aderências devido a manipulação e punção dos ovários (CORDEIRO et al., 2014).

A lesão tecidual ocasionada por traumatismo, agentes químicos e/ou infecciosos e procedimentos cirúrgicos, como é o caso da LOPU, pode resultar em perda anatômica e funcional da integridade dos tecidos (MONTEIRO et al, 2010). Com isso, surge a possibilidade de reparação desses danos com a utilização de células-tronco (PAN et al., 2017), pois a partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta ou indireta, potencial imunomodulador e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006; TERRACIANO, 2013). A possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu inigualável potencial terapêutico e tornou-se a principal alternativa da terapia celular (LAI et al., 2008).

Portanto, o experimento tem por objetivo avaliar o efeito da infusão de células-tronco mesenquimais (CTM) em ovários de cabras submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lesões ovarianas e comprometimento reprodutivo

Os ovários são um corpo irregular firme com uma forma basicamente ovoide (DYCE, 2004), que estão localizados aproximadamente ao nível da bifurcação uterina, na bursa ovariana, ligadas a uma alça suspensa na porção superior do oviduto (COUTINHO et al., 2013). Tal órgão exercem funções exócrinas, com a liberação de oócitos, que são os gametas femininos, e endócrinos com produção e liberação de hormônios esteroides (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Diversas podem ser as causas de perda das funções ovarianas, podendo ser hereditária ou adquirida. A lesão tecidual pode ser ocasionada por procedimentos cirúrgicos, como no caso das punções de folículos ovarianos, na tentativa de coleta de CCO's (VIANA et al., 2003), por traumatismo, ou por agentes químicos e/ou infecciosos pode resultar em perda anatômica e funcional da integridade dos tecidos (MONTEIRO et al., 2010).

Dentre as causas de perda da função ovariana podemos descrever a insuficiência ovariana prematura que acomete cerca de 1% das mulheres na população mundial antes dos 40 anos (WELT, 2008). As mulheres com insuficiência ovariana prematura sofrem de amenorréia primária ou secundária, deficiência de esteroides sexuais, infertilidade e síndrome da menopausa (KALANTARIDOU et al., 1998; TAYLOR, 2001).

Também podemos citar os efeitos nocivos de quimioterápicos em relação a função ovariana, que é uma das consequências mais devastadoras do tratamento do câncer principalmente na população jovem, resultando em falência ovariana (TERRACIANO, 2013).

Dentre as biotecnias reprodutivas, os traumatismos provocados pelas perfurações das agulhas nas punções ovarianas na busca por complexos *cumulus ooforus* (CCOs), pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários, podendo ocorrer substituição das células ovarianas por tecido fibroso. Esse processo pode estar diretamente relacionado ao número de sessões de punção ao qual as doadoras são submetidas (VIANA et al., 2003).

2.2 Células-tronco

Células-tronco são células capazes de autorrenovação e diferenciação em muitas categorias de células, podendo-se dividir e se transformar em outros tipos de celulares. Além disso, as células-tronco podem ser programadas para desenvolver funções específicas, tendo em vista que ainda não possuem uma especialização (TERRACIANO, 2013).

Em todos os animais vertebrados são encontrados dois tipos de células-tronco (CT): as células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA), também denominadas células-tronco somáticas (DEL CARLO et al., 2008). As CTEs são obtidas de zigoto e da cavidade interna do pré-embrião (blastocisto) e as CTAs são obtidas em diversos locais do corpo como medula óssea, tecido adiposo, rim, fígado, baço, pulmão, pâncreas, tendões, membrana sinovial, fluido amniótico, placenta, cordão umbilical, polpa dentária e etc (NARDI; MEIRELLES, 2006; CARVALHO et al., 2015; FADEL et al., 2011; COSTA et al., 2017).

Células-tronco adultas podem se dividir em hematopoiética e mesenquimais. As células-tronco hematopoiéticas além de possuírem a capacidade de se autorrenovar, podem se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune (AMORIM et al., 2012). A sua obtenção é feita a partir da medula óssea, do cordão umbilical ou do sangue periférico (SILVA JUNIOR et al., 2009).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas células multipotentes com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, possivelmente, em não mesenquimais. As células-tronco mesenquimais são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivascularares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009; ZUCCONI et al., 2009).

Existem também as classificações das células-tronco em: totipotentes que são células capazes de originar um organismo completo, uma vez que têm a capacidade de gerar todos os tipos de células e tecidos do corpo, incluindo tecidos embrionários e extraembrionários (VERFAILLIE, 2002). As células pluripotentes são aquelas obtidas a partir da massa celular interna de blastocistos, dotadas de grande plasticidade e apresentam

uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro*, além da possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários em cultura (AMORIM et al., 2012; SYLVESTER; LONGAKER, 2004). As multipotentes têm a capacidade de gerar um número limitado de células especializadas podendo ser encontradas em quase todas as áreas do corpo (SOUZA et al., 2010). As células oligopotentes são capazes de diferenciar-se em poucos tecidos e são encontradas em diversos tecidos já diferenciados. As unipotentes são células que conseguem apenas se diferenciar em um único tecido, ou seja, o tecido a que pertencem (SOARES, 2010).

As CTM's foram primeiramente estudadas a partir de aspirados da medula óssea, onde estão localizadas no compartimento basal medular, sendo responsáveis pela hematopoiese e diferenciação em linhagens mesenquimais (CAPLAN; BRUDER, 2001; PHINNEY; PROCKOP, 2007; BIANCO et al., 2008; ABDALLAH; KASSEM, 2009).

A *Society for Cellular Therapy* definiu critérios mínimos para que uma célula seja qualificada como célula-tronco mesenquimal, que incluem: aderência plástica, quando isoladas em cultura; expressão de marcadores moleculares para CD105, CD73 e CD90, em mais de 95% das células em cultivo; ausência de expressão dos marcadores para CD34, CD45, CD14 ou ainda dos CD11b, CD79, CD19, HLA-DR, em mais de 95% das células em cultivo; e capacidade dessas células em se diferenciarem em osso, gordura e cartilagem (DOMINICI et al., 2006; HORWITZ et al., 2005).

A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta ou indireta e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (HERZOG et al., 2003; MEIRELLES et al., 2006). A possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou notoriedade devido ao seu inigualável potencial terapêutico e tornou-se a principal alternativa da terapia celular (COLOMÉ et al., 2008; LAI et al., 2008).

2.2 Terapia com células-tronco

As células-tronco tem sido alvo de grandes pesquisas clínicas e experimentais pelos seus efeitos benéficos com utilização neurológicas (HIMES et al., 2006; PARK et al., 2006; CHOI et al., 2010; LEE; PARK, 2009), cardíacas (OHNISHI et al., 2007; PSALTIS

et al., 2008; ILÁRDUYA et al., 2009; CHIN et al., 2010), hepáticas (MOHAMADNEJAH et al., 2007; WANG et al., 2009), renais (MORIGI et al., 2008), pulmonares (HACKETT et al., 2010), ortopédicas (FEITOSA et al., 2010), das glândulas mamárias (COSTA et al., 2016), cicatrização (DEL CARLO et al., 2008; ARGÔLO NETO et al., 2012) e também na restauração reprodutiva com recuperação ovariana (PAN et al., 2016; TERRACIANO et al., 2014; SU et al., 2016).

Em cardiologia, pesquisas contemporâneas referem restabelecimento das funções inotrópicas e cronotrópicas em modelos de cardiomiopatia dilatada, arritmias e focos de necrose isquêmica tratados com células-tronco mesenquimais (CTM's) autólogas (OHNISHI et al., 2007; PSALTIS et al., 2008; ILÁRDUYA et al., 2009; CHIN et al., 2010).

O restabelecimento morfofuncional do tecido lesado, foram alcançados utilizando-se CTM's para o tratamento experimental de desordens neurológicas, como discopatias vertebrais (HIMES et al., 2006), doença de Parkinson (PARK et al., 2006), esclerose amiotrófica lateral (CHOI et al., 2010) e atrofia sistêmica múltipla (LEE; PARK, 2009).

Em doenças metabólicas como no diabetes *mellitus* experimental, observou-se redução dos níveis séricos de glicose e restabelecimento de células β pancreáticas após a infusão endovenosa de CTM's (XIE et al., 2009). Em modelos de cirrose hepática, observou-se que o tratamento com MSCs retarda a progressão da fibrogênese hepática (MOHAMADNEJAD et al., 2007).

O tratamento de lesões ósteo-articulares degenerativas, como artrite reumatóide e osteoartrite, com CTM's reduziu a inflamação local e a progressão das lesões articulares (CHEN; ROCKY, 2008). Também foi verificando os efeitos das células-tronco mesenquimais da medula óssea de ovinos e da polpa dentária imatura humana em ovinos com osteonecrose induzida, da cabeça do fêmur e os resultados encontrados aparentemente favorecem a regeneração óssea de tecidos lesados (FEITOSA et al., 2010)

Na dermatologia Argôlo Neto et al. (2012) avaliando o uso de CTM's sozinho ou em combinação com plasma rico em plaquetas autólogo na reparação de lesões cutâneas em ratos diabéticos constatou que ambos os tratamentos apresentaram melhores resultados do que a limpeza diária das lesões cutâneas com solução salina ou cobertura das lesões com curativo semipermeável.

As CTM's demonstram excelentes resultados na reparação de lesões provocadas por mastite em caprinos (COSTA et al., 2017), conseguindo recuperar a glândula mamaria, com reestabelecimento da produção leiteira.

Foram avaliados os efeitos e a segurança da aplicação das CTM humanas do tecido adiposo em ratos com lesões ovarianas induzidas por ciclofosfamida (TAKEHARA et al., 2013). Segundo os autores não foi notada a formação de tumores ou mortes nos animais experimentais, e as CTM da gordura humana foram capazes de induzir a angiogênese e restaurar o número de folículos ovarianos e corpo lúteo dos ovários. Esses achados sugerem que as CTM tem uma importante função na restauração da função de ovários danificados e podem ser úteis na medicina regenerativa já que durante muitos anos, acreditou-se que não haveria a possibilidade de renovação da reserva oocitária. Porém, com o avanço dos estudos da oogênese, a teoria se tornou alvo de grande controvérsia (TILLY; JOHNSON, 2007; JOHNSON et al., 2004).

As pesquisas que visam solucionar os problemas de infertilidade em humanos, bem como aumentar a eficiência reprodutiva de animais de alto valor genético ou em via de extinção, são de grande importância. Assim, a possibilidade de formação de novos oócitos após o nascimento, utilizando-se células-tronco de diferentes origens, pode ter uma importante aplicação terapêutica reprodutiva, mas ainda não se sabe quais os mecanismos ideais para a produção de gametas (COSTA, 2016).

2.3 Produção *in vitro* de embriões

As técnicas reprodutivas devem garantir a manutenção da morfologia folicular e a obtenção de oócitos viáveis a serem utilizados em programas de criopreservação, cultivo e fecundação *in vitro*, melhorando a produtividade de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

Estão envolvidas na produção *in vitro* de embriões (PIV) as etapas de colheita de oócitos, maturação (MIV), fecundação (FIV), bem como o cultivo ou co-cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias com posterior transferência para as receptoras ou a criopreservação (GONÇALVES et al., 2008; PADILHA, 2013; PARAMIO; IZQUIERDO, 2014).

A PIV tem sido consideravelmente desenvolvida nos últimos anos, devido à alta variabilidade na resposta ovulatória, falhas de fertilização e processos de degeneração

embrionária que afetam os rendimentos obtidos com a tradicional múltipla ovulação e a transferência de embriões (ABDULLAH et al., 2008). Atualmente, a maioria dos protocolos de PIV combina a estimulação do desenvolvimento folicular com tratamentos curtos de gonadotrofinas e a recuperação do oócito por técnicas minimamente invasivas, geralmente por captação de oócitos por laparoscopia (LOPU) (GIBBONS et al., 2007; BALDASSARRE et al., 2002; BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

Em pequenos ruminantes a PIV foi inicialmente adaptada a partir de protocolos de bovinos, o que demonstrou uma marcante diferença entre as espécies (PADILHA, 2013), com o avançar das pesquisas, os protocolos foram sendo adaptados aos pequenos ruminantes e conseqüentemente os resultados foram melhorando (COX; ALFARO, 2007), porém ainda necessita-se de mais pesquisas, pois os resultados são bastante oscilantes.

2.4 Origem e obtenção dos oócitos

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIV) em animais domésticos, e esses podem ser colhidos de ovários obtidos em abatedouros, por ovariectomia ou *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultrassom (GONÇALVES et al., 2008; PADILHA, 2013). Ovários de abatedouros aparecem como fonte de oócitos de menor custo e em maior quantidade para a produção de embriões em larga escala (GONÇALVES et al., 2008). Além disso, oócitos de animais abatidos têm sido importantes na obtenção de embriões para uma variedade de propósitos de pesquisa, mas são de limitado valor em programas de melhoramento genético, visto que o histórico e estado sanitário das fêmeas são, na maioria das vezes, desconhecidos.

A punção de folículos guiada por ultra-som “ovum pick-up” (OPU), para a recuperação de oócitos em fêmeas vivas, é frequentemente realizada em bovinos (VIANA et al., 2003; VIANA; BOLS, 2005). A técnica ainda é bastante limitada em pequenos ruminantes, pois não é fácil manipular os órgão do sistema reprodutivo pelo reto, como ocorre em bovinos, bubalinos e equinos, optando-se assim por intervenções cirúrgicas para facilitar a execução da técnica, diante disso, torna-se um procedimento difícil para os veterinários, mesmo experientes, além de causar mais traumatismo do que a laparotomia ou laparoscopia (BALDASSARRE et al., 1996). A laparotomia causa inevitavelmente algum grau de trauma cirúrgico, sendo necessário um cuidado extremo para evitar a

formação de aderências pós-operatórias (BASSO et al., 2008). Essas consequências tornam a laparotomia inadequada para uso em médio e longo prazo, especialmente em fêmeas de alto valor genético (FREITAS; SIMPLÍCIO, 2002; TERVIT, 1996).

Em pequenos ruminantes, a coleta de oócitos após a exposição do ovário por laparotomia foi gradualmente substituída por punção laparoscópica dos folículos e aspiração de seu conteúdo (ABDULLAH et al., 2008; TERVIT, 1996).

2.4.1 Aspiração folicular por laparoscopia (LOPU)

Snyder e Dukelow descreveram pela primeira vez a LOPU em 1974. Eles aspiraram 21 folículos e recuperaram 6 oócitos de uma ovelha por laparoscopia.

Uma vantagem substancial da LOPU sobre a laparotomia é que a mesma doadora pode ser utilizada em mais procedimentos de aspiração, uma vez que o procedimento é minimamente invasivo e a recuperação pós-operatória é muito mais rápida (ABDULLAH et al., 2008). Outro fato marcante é que o sistema permite a produção de descendentes de animais que não seriam capazes de reproduzir usando inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões após múltiplas ovulações (MOET), tais como animais pré-púberes (TEIXEIRA, 2013).

A LOPU também proporciona um bom rendimento de oócitos com o intuito de produção de zigotos para microinjeção de DNA ou para citoplastos receptores em programas de transferência nuclear (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

Apesar dos excelentes resultados obtidos na recuperação de oócitos por LOPU (BALDASSARRE et al., 1994; BALDASSARRE et al., 1996; BALDASSARRE et al., 2002), resultados controversos são encontrados na literatura, atribuídos principalmente a quantidade de punções no mesmo animal, podendo interferir quanto a diminuição do número de folículos e da qualidade dos oócitos aspirados (CORDEIRO et al., 2014) e o aparecimento de lesões ovarianas que podem comprometer a recuperação dos oócitos (VIANA et al., 2003) após sucessivas punções foliculares (OPU). Outra observação relevante, é que apesar de pouca ocorrência, também podem ser observadas aderências devido a manipulação e punção dos ovários (McEvoy et al., 2006; CORDEIRO et al., 2014).

3 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, p. 9-12, 2009.

ABDULLAH, R. B.; LIOW, S. L.; RAHMAN, A. N. M. A.; CHAN, W. K.; WAN-KHADIJAH, W. E.; NG, S. C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, v. 70, p. 765–771, 2008.

AMORIM, B.; VALIM, V. S.; LEMOS, N. E.; MORAES JÚNIOR, L.; SILVA, A. M. P.; SILVA, M. A. L.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v. 32, n. 1, 2012.

ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; NARDI, N. B. CHAGASTELLES, P. C.; BRITO A. F. S.; REIS, A. M. S. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, p. 544–553, 2012.

BALDASSARRE, H.; MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; CASTRO, T. E.; CABRERA FISCHER, E. I. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculo centesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; FUMUS, C. C.; MATOS, D. G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v. 45, p. 707-717, 1996.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 276-264, 2002.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 82 - 83, p. 255 - 266, 2004.

BASSO, A. C.; MARTINS, J. F. P.; FERREIRA, C. R.; ERENO, A.; TANNURA, J.; TABET, A.; FIGUEIREDO, C. L.; DE OLIVEIRA, P. C.; PONTES, J. H. F. Produção in vitro de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. **O embrião**, n. 38, p. 9-13, 2008.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. **Stem Cell**, v. 2, p. 313-319, 2008.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 6, p. 259-264, 2001.

CARVALHO, Y. K. P.; ARGÔLO-NETO, N. M.; AMBRÓSIO, C. E.; OLIVEIRA, L. J.; ROCHA, A. R. J. B. S.; CARVALHO, M. A. M.; ALVES, F. R. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyproctaprymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 590-598, 2015.

CARVALHO, M. A. M. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular & Development Biology - Animal**, n. 53, p. 363-370, 2017.

CHEN, F. H.; ROCKY, S. T. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, n. 10, p. 223, 2008.

CHIN, M. H.; PELLEGRINI, M.; PLATH, K.; LOWRY, W. E. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, p. 263-269, 2010.

CHOI, M. R.; KIM, H. Y.; PARK, J. Y.; LEE, T. Y.; BAIK, C. S.; CHAI, Y. G.; JUNG, K. H.; PARK, K. S.; ROH, W.; KIM, K. S.; KIM, S. H. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, v. 472, p. 94-98, 2010.

COLOMÉ, L. M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, L. P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D. L.; MEURER, L.; PASSOS, E. P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; LIMA, E. O. C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulinização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2529-2534, 2008.

CORDEIRO, M. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; OLIVEIRA, M. E. F.; DI FILIPPO, P. A.; DIAS, D. P. M.; BERETTA, C. A. G.; DÓRIA, R. G. S.; FELICIANO, M. A. R.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 137-144, 2014.

COSTA, J. J. N. **Expressão de marcadores de células germinativas e de oócitos em fibroblastos bovinos tratados com 5-aza-citidina e em células-tronco adultas cultivadas *in vitro* na presença de BMP-2, BMP-4 ou fluido folicular**. 2016. 208 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2016.

COSTA, C. R. M.; FEITOSA, M. L. T.; BEZERRA, D. O.; CARVALHO, Y. K. P.; OLIVINDO, R. F. G.; FERNANDO, P. B.; SILVA, G. C.; SILVA, M. L. G.; AMBRÓSIO, C. E.; CONDE JÚNIOR, A. M.; ARGÔLO NETO, N. M.; SILVA, L. M. C.; COX, J. F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 83-87, 2007.

COUTINHO, L. N.; OLIVEIRA, M. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; BARROS, F. F. P. C. **Anatomia do sistema reprodutor feminino**. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P.

M.; VICENTE, W. R. R. Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos. 1. ed. São Paulo, MedVet, 2013. p. 1-8.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 11, p. 167-169, 2008.

DOMINICI, M. L.; BLANK, K.; MUELLER, I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315–317, 2006.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

FADEL, L.; VIANA, B. R.; FEITOSA, M. L. T.; ERCOLIN, A. C. M.; ROBALLO, K. C. S.; CASALS, J. B.; PIERI, N. C. G.; MEIRELLES, F. V.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 267-273, 2011.

FEITOSA, M. L. T.; FADEL, L.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; WENCESLAU, C. V.; KERKIS, I.; KERKIS, A.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; MARTINS, J. F. P.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head. Preliminary results. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 416-422, 2010.

FREITAS V. J. F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 179-194, 2002.

GIBBONS, A.; BONNET, F. P.; CUETO, M. I.; CATALA, M.; SALAMONE, D. F.; GONZALEZ-BULNES, A.; PEREYRA-BONNET, F. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 423-426, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISITIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 261-291.

HACKETT, T. L.; KNIGHT, D. A.; SIN, D. D. Potential role of stem cells in management of COPD. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 7, n. 5, p. 81-88, 2010.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**. v. 102, p. 3483- 3493, 2003.

HIMES, B. T.; NEUHUBER, B.; COLEMAN, C.; KUSHNER, R.; SWANGER, S. A.; KOPEN, G. C.; WAGNER, J.; SHUMSKY, J. S.; FISHER, I. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 20, n. 2, p. 278-296, 2006.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

ILÁRDUYA, O. M.; BARREIRO, J. B.; MOSCOSO, I.; AÑÓN, P.; FRAGA, M.; CENTENO, A.; LÓPEZ E.; DOMÉNECH, N. Gene Expression Profiles in a Porcine Model of Infarction: Differential Expression After Intracoronary Injection of Heterologous Bone Marrow Mesenchymal Cells. **Transplant Proced.** v. 41, p. 2276 -2278, 2009.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K., TILLY, J.L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the post natal mammalian modifiers of ovarian. **Nature**, v. 428, p. 145–150, 2004.

KALANTARIDOU, S. N.; DAVIS, S. R.; NELSON, L. M. Premature ovarian failure. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 27, p. 989–1006, 1998.

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 146-59, 2008.

LEE, P. H.; PARK, H. J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a candidate disease-modifying strategy in Parkinson's disease and multiple system atrophy. **Journal of Clinical Neurology**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2009.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J.; FRAZÃO, P. J.; CHAPARRO, M. B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A. L.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2009.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v. 119, p. 2204-2213, 2006.

MOHAMADNEJAD, M.; ALIMOGHADDAM, K.; MOHYEDDIN-BONAB, M.; BAGHERI, M.; BASHTAR, M.; GHANAATI, H.; BAHARVAND, H.; GHAVAMZADEH, A.; MALEKZADEH, R. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. **Archives of Iranian Medicine**, v. 10, n. 4, p. 459-66, 2007.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MORIGI, M.; INTRONA, M.; IMBERTI, B.; CORNA, D.; ABBATE, M.; ROTA, C.; ROTTOLI, D.; BENIGNI, A.; PERICO, N.; ZOJA, C.; RAMBALDI, A.; REMUZZI, A.; REMUZZI G. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Renal Injury and Prolong Survival in Mice. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, p. 2075, 2008.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.

OHNISHI, S.; YASUDA, T.; KITAMURA, S.; NAGAYA, N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. **StemCells**, v. 25, n. 5, p. 1166-77, 2007.

PADILHA, L. C. Produção *in vitro* de embriões. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2013. p. 157-186.

PAN, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; HU, C.; LIU, R. Biological and biomechanical analysis of two types of mesenchymal stem cells for intervention in chemotherapy-induced ovarian dysfunction. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, n. 295, p. 247–252, 2017.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 37-48, 2014.

PARK, H. J.; LEE, P. H.; BANG, O. Y.; LEE, G.; AHN, Y. H. Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, p. 141–151, 2008.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise Review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. **Stem Cells**, v. 25, p. 11, p. 2896-2902, 2007.

PSALTIS, P. J.; ZANNETTINO, A. C.W.; WORTHLEY, S. G.; GRONTHOS, S. Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. **StemCells**, v. 26, p. 2201-2210, 2008.

SILVA JÚNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31,p. 53-58, 2009.

SOARES, A. C. R. P. Células-tronco - Revisão. webartigos. Acesso em: 12 Ago. 2017. Disponível em:<<http://www.webartigos.com/artigos/celulas-tronco/32338/#ixzz49UEIMtqr>>.2010.

SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S. W.; LIMA, V. C.; CARVALHO, A. C. C. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 18 n. 3, p. 344-353, 2010.

SU, J.; DING, L.; CHENG, J.; YANG, J.; LI, X.; YAN, G.; SUN, H.; DAI, J.; HU, Y. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagens scaffolds restores ovarian function in rat model of premature ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 31, n.5, p. 1075–1086, 2016.

SYLVESTER, K. G.; LONGAKER, M. T. Stem cells: review and update. **Archives of Surgery**, v. 139, p. 93-99, 2004.

SNYDER, D. A.; DUKELOW, R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnoses, and follicle aspiration in sheep. **Theriogenology**, v. 2, p. 143-148, 1974.

TAKEHARA, Y.; YABUUCHI, A.; EZOE, K.; KURODA, T.; YAMADERA, R.; SANO, C.; MURATA, N.; AIDA, T.; NAKAMA, K.; AONO, F.; AOYAMA, N.; KATO, K.; KATO, O. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. **Laboratory Investigation**, v. 93, n. 2, p. 181–193, 2013.

TAYLOR, A. E. Systemic adversities of ovarian failure. **Journal of the Society for Gynecology Investigation**, v. 8, p. 7–9, 2001.

TEIXEIRA, P. P. M. **Aspiração folicular videolaparoscópica em ovelhas recém-desmamadas submetidas à estimulação ovariana**. 2013. 58 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

TERRACIANO, P. B. **Utilização de células-tronco adultas para tratamento de falência ovariana causada por quimioterapia em camundongos**. 2013. 47 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

TERRACIANO, P.; GARCEZ, T.; AYRES, L.; DURLI, I.; BAGGIO, M.; KUHL, C. P.; LAURINO, C.; PASSOS, E.; PAZ, A. H.; CIRNE-LIMA, E. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cells International**, p. 1-8, 2014.

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 227-238, 1996.

TILLY, J. L.; JOHNSON, J. Recent Arguments Against Germ Cell Renewal in the Adult Human Ovary: Is an Absence of Marker Gene Expression Really Acceptable Evidence of an Absence of Oogenesis? **Cell Cycle**, v. 6, n. 8, p. 879-883, 2007.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**, v. 12 n. 11, p. 502-508, 2002.

VIANA, J. H. M.; NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 119-124, 2003.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinaria**, v.33, p. 1-4, 2005.

WELT, C. K. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. **Clinical Endocrinology**, v. 68, p. 499–509, 2008.

XIE, Q. P.; HUANG H.; XU, B.; DONG, X.; GAO, S. L.; ZHANG, B.; WU, Y. L. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon micro environmental manipulation in vitro. **Differentiation**, v. 77, p. 483-449, 2009.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO, D. F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO C. E.; PASSOS-BUENO, M. R.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein - a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 3, p. 395-402, 2010.

CAPÍTULO I

Avaliação morfofuncional dos ovários de cabras após sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU)

1 **Avaliação morfofuncional ovariana em cabras após sucessivas aspirações foliculares**
2 **por laparoscopia**

3

4 Barçante FPS*¹, Sousa RP³, Silva LS³, Souza ÍOT¹, Moraes Júnior FJ⁴, Sousa Junior A⁵,
5 Rocha Neto HJ³, Carvalho MAM³, Castelo Branco YNTC¹, Silva JHL¹, Batista JF¹, Souza
6 JAT²

7

8 ¹Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

9 ² Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

10 ³Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), CCA, UFPI, Teresina, PI,
11 Brasil.

12 ⁴ Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, MA, Brasil.

13 ⁵Colégio Técnico de Teresina (CTT), CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

14

15 *Autor para Correspondência:

16 Felipe Pereira da Silva Barçante

17

18 Endereço

19 Centro de Ciências Agrárias

20 Universidade Federal do Piauí

21 Bairro Socopo – Teresina-PI

22 CEP: 64049-550

23 Telefone: (86) 9 9970-2747

24 E-mail: felipebarcantevet@gmail.com

25

26 **Resumo**

27

28 Para avaliar o efeito de sucessivas LOPU's podem provocar nos ovários de cabras, foram
29 utilizadas 12 cabras saudáveis e aptas à reprodução. Os animais foram sincronizados e
30 estimulados com dose única de FSHp e eCG 36 horas precedente às LOPU's. Foram feitas
31 cinco sessões de aspirações com intervalos de 12 dias. Foram coletados sangue e
32 fragmentos do ovariano. Observou-se diferença ($P < 0,05$) na média de folículos aspirados
33 nas LOPU's, com menor média na 3ª LOPU. A média de oócitos recuperados, não
34 observou-se diferença entre a 1ª e 5ª LOPU ($P > 0,05$), porem as médias dos folículos
35 aspirados na 2ª, 3ª e 4ª LOPU reduziram em relação a 1ª LOPU ($P < 0,05$). Quanto a taxa de
36 recuperação oocitária, houve uma redução na 3ª e 4ª LOPU em relação à 1ª e 2ª LOPU

37 (P<0,05) e na 5ª LOPU observou-se aumento da recuperação oocitária em relação à 3ª e 4ª
38 LOPU (P<0,05). A qualidade dos CCO's de grau 2 reduziram entre a 1ª e 4ª LOPU e os de
39 grau 4 aumentaram na 2ª, 4ª e 5ª LOPU em relação a 1ª e 3ª LOPU(P<0,05). Houve
40 redução (P<0,05) de estruturas viáveis na 2ª e 4ª LOPU, com aumento na 3ª e 5ª LOPU. As
41 biópsias evidenciaram tecidos ovarianos morfológicamente normais. Não houve diferença
42 (P>0,05) na dosagem de progesterona, porém houve um aumento (P<0,05) na dosagem de
43 estradiol da 2ª LOPU em relação às demais. Desta forma conclui-se que cinco sessões de
44 LOPU com intervalos de dose dias não interfere morfofuncionalmente nos ovários de
45 cabras.

46

47 **Palavras-chave:** Aspiração folicular; caprinos; laparoscopia; ovários.

48

49 **Introdução**

50

51 Em pequenos ruminantes a produção *in vitro* de embriões (PIV) foi inicialmente
52 adaptada a partir de protocolos de bovinos, o que demonstrou uma marcante diferença
53 entre as espécies (Padilha, 2013), com o avançar das pesquisas, os protocolos foram sendo
54 adaptados aos pequenos ruminantes e conseqüentemente os resultados foram aparecendo
55 (Cox & Alfaro, 2007). A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da
56 biotécnica de PIV em animais domésticos, e esses podem ser colhidos de ovários obtidos
57 em abatedouros, por ovariectomia ou *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se
58 métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultrassom (Gonçalves
59 et al., 2008; Padilha, 2013).

60 A aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) vem sendo a mais utilizada na
61 obtenção de oócitos, principalmente por permitir que a mesma doadora possa ser utilizada
62 repetidamente, uma vez que o procedimento é minimamente invasivo e a recuperação pós-
63 operatória é muito mais rápida (Abdullah et al., 2008). Outro fato marcante é que o sistema
64 permite a produção de descendentes de animais que não seriam capazes de reproduzir
65 usando inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões após múltiplas ovulações
66 (MOET), tais como animais pré-púberes (Teixeira, 2013).

67 Apesar dos excelentes resultados obtidos na recuperação de oócitos por LOPU
68 (Baldassarre et al., 1994; Baldassarre et al., 1996; Baldassarre et al., 2002), ainda são
69 encontrados resultados controversos na literatura, principalmente quanto a diminuição do

70 número de folículos e da qualidade dos oócitos aspirados (Cordeiro et al., 2014) e o
71 aparecimento de lesões ovarianas que podem comprometer a recuperação dos oócitos
72 (Viana et al., 2003) após sucessivas punções foliculares. Outra observação relevante, é que
73 apesar de pouca ocorrência, também pode ser observada aderências devido a manipulação
74 e punção dos ovários (Cordeiro et al., 2014). Esse estudo tem por objetivo avaliar o efeito
75 de sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia sobre a morfofuncionalidade de
76 ovários de cabras SPRD.

77

78 **Materiais e Métodos**

79

80 **Comitê de Ética**

81

82 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
83 Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo de 117/15.

84

85 **Local e período de realização do experimento**

86

87 O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
88 do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI) localizado no
89 município de Teresina – PI, no período de outubro de 2016 e maio de 2017.

90

91 **Seleção dos animais experimentais**

92

93 Foram utilizadas 12 cabras SPRD, não lactantes, com idade média de 3 anos, com
94 escore da condição corporal variando de 3,0 a 4,0, em escala de 1 a 5, de acordo com
95 Machado et al. (2008). As fêmeas selecionadas foram mantidas em piquetes com pastagem
96 de *Andropogon (gayanus Kunth)*, com suplementação de 400 gramas de concentrado por
97 animal fornecido ao cocho no período da tarde, com água e sal mineral *ad libitum*.

98

99 **Sincronização e estimulação ovariana**

100

101 Os animais foram sincronizados com uso de esponjas intravaginais impregnadas com
102 60 mg de acetato de medroxiprogesterona no (D0) permanecendo por 11 dias. No nono dia
103 (D9) foi administrado por via intramuscular, 75 µg de d-cloprostenol. A estimulação

104 ovariana constituiu na administração de 80 mg de FSHp e 300 UI de eCG, ambas em
105 aplicação única, por via intramuscular, feita 36 horas anterior às LOPU's.

106

107 **Preparo dos animais e protocolo anestésico**

108

109 Antes de cada aspiração, as fêmeas foram submetidas a um jejum alimentar de 36h,
110 e líquido de 24h. A medicação pré-anestésica, foi realizada utilizando 0,05 mg/Kg/IM de
111 cloridrato de xilazina a 2% por via intramuscular e, após 10 minutos, foi aplicado
112 cloridrato de cetamina a 10% para indução na dose de 5 mg/Kg/IV. Em seguida a fêmea
113 foi colocada em maca cirúrgica apropriada, onde o animal foi entubado com uma sonda
114 endotraqueal de 7,5mm com balonete insuflável, com o auxílio de um laringoscópio de
115 lâmina reta. A sonda foi fixada no chanfro do animal, evitando assim aspiração do
116 conteúdo ruminal. Em seguida a sonda foi acoplada ao aparelho de anestesia inalatória para
117 permitir o fornecimento de oxigênio medicinal, sob ventilação assistida, facilitando a troca
118 gasosa, e Isoflurano como anestesia inalatória. No campo cirúrgico, região do abdome
119 cranial ao úbere, foi realizada a tricotomia e antissepsia com álcool iodado 2%.

120

121 **Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU)**

122

123 As fêmeas foram submetidas à 5 sessões/animal de LOPU com intervalos de doze
124 dias entre as aspirações foliculares.

125 As LOPU's iniciaram com o posicionamento da fêmea em Trendelemburg, e a
126 agulha de Veress foi introduzida cerca de 10 cm cranial ao úbere e cinco centímetros à
127 direita da linha média, para inflar a cavidade com CO₂, e com o auxílio de um bisturi,
128 realizado um orifício para inserir trocarter de 7 mm a qual foi introduzido o laparoscópio.

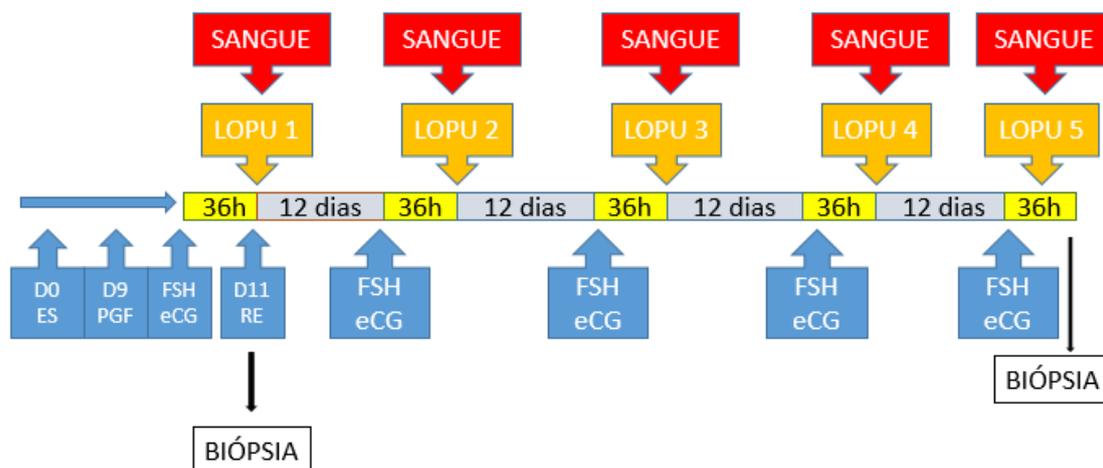
129 O endoscópio rígido foi conectado a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o
130 interior da cavidade e a imagem resultante foi visualizada. Uma vez obtida a visão interna
131 da cavidade, foi realizada uma pequena incisão na pele para a introdução do trocarte de 10
132 mm, para a passagem da pinça fenestrada de apreensão com cremalheira para manipulação
133 do útero, tubas e bursas ováricas, a fim de visualizar os ovários. Antes de iniciar a
134 aspiração, os ovários foram examinados e o número de folículos visíveis (três a oito mm)
135 na superfície de cada um foi registrado. O ovário foi imobilizado pela apreensão próxima
136 ao seu ligamento, evitando ao máximo danificar as estruturas das tubas e do pedículo. Em

137 seguida, a agulha de aspiração foi introduzida na cavidade próxima ao local onde se
138 encontrará o ovário.

139

140 **Figura 1** - Esquema de tratamento hormonal, punções foliculares, coletas sanguíneas e
141 biopsias ovarianas em cabras durante o período experimental

142



143

D0- dia zero (início do tratamento com progestágeno)

ES- colocação da esponja

D9- nono dia do tratamento progestágeno e PGF2α- aplicação de 70µg de cloprostenol – intramuscular

D11- décimo primeiro dia(RE- retirada das esponjas final do tratamento progestágeno)

FSH + eCG Aplicação de 80 mg de FSHp e de 300 UI de eCG- estimulação ovariana

12 dias Intervalos entre LOPUS

36h 36 horas antes das laparoscopias(LOPUS)

LOPU Punção Folicular por Laparoscopia

SANGUE Coleta de sangue para dosagem hormonal

BIÓPSIA Biopsia dos ovários das cabras experimentais destinados a histologia

144

145

146 Os folículos foram puncionados pela movimentação dos ovários em diferentes
147 posições com a pinça de apreensão. A pressão do vácuo foi ajustada para 35 mmHg em um
148 sistema de aspiração composto de uma agulha de 20G, conectada a uma cânula de teflon de
149 50 cm de comprimento presa a rolha de silicone conectada no tubo de colheita (50 mL). No
150 interior do sistema de aspiração por onde passarão complexos *cumulus oophorus* foi feita
151 uma lavagem prévia com o meio de colheita deixando aproximadamente 2 mL deste
152 líquido, no fundo do tubo, para receber os oócitos.

153

154 A fim de minimizar a formação de possíveis aderências, os ovários, ao final da
laparoscopia, foram banhados com 20 mL de solução fisiológica com 5% de glicerina

155 aquecido a 37°C e, logo após, o líquido da lavagem foi aspirado da cavidade. Ao final da
156 laparoscopia, as feridas cirúrgicas foram suturadas com e colocado antibiótico tópico sobre
157 cada incisão na pele. Ao redor das feridas cirúrgicas foi utilizada pomada
158 repelente/cicatrizante. Nas intervenções subsequentes, as incisões foram realizadas no
159 mesmo local da incisão anterior. Após serem retiradas da maca cirúrgica as fêmeas foram
160 colocadas em local limpo até o seu completo restabelecimento.

161

162 **Lavagem, rastreamento e seleção dos Complexos *Cumulus Oophorus* (CCO)**

163

164 O material aspirado foi transferido para um filtro de coleta de embriões e lavado
165 com PBS a 37°C. O conteúdo aspirado foi depositado em placas de Petri de 100 x 20mm
166 para a pesquisa de estruturas sob lupa estereomicroscópica. Os CCOs foram transferidos
167 para placas de 30 x 15 mm contendo TCM 199 (com Sais de Hanks), e classificados de
168 acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Viana et al., 2004).

169

170 **Biópsias**

171

172 Foram realizadas duas biópsias na região cortical do ovário com agulha/cânula para
173 biópsia semi automática de tecidos moles 14G antes da primeira LOPU e ao final (LOPU
174 5). Os materiais obtidos nas biópsias foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30%
175 clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) por 24 h e depois transferidos para álcool a
176 70%. O material foi desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol,
177 diafanizado em xilol, incluído em resina histológica e submetido à histotécnica para
178 coloração com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson para análise sob microscopia
179 óptica.

180

181 **Dosagens Hormonais**

182

183 Amostras de sangue foram coletadas com intervalos de 12 dias durante todo o
184 período do experimento, diretamente da veia jugular, em tubos à vácuo de 10 mL sem
185 heparina, (Vacutainer®) e centrifugados a 3500 RPM por 15 min para a separação do soro
186 (Centrífuga Fanen Exelsa Baby I, modelo 206). Posteriormente, o soro foi aliqotado em
187 duplicata e armazenados em microtubos de 2,0 mL (Axigen Scientific MCT – 200B), em

188 freezer a -20°C até a realização dos ensaios no Laboratório de Biotecnologia da
189 Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí -
190 UFPI. As dosagens de progesterona e estradiol foram através do método ELISA (Kit DRG
191 ELISA that perform[®]).

192

193 **Análise estatística**

194

195 O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente ao acaso com 12 repetições (número de
196 animais). Os dados quantitativos obtidos (folículos aspirados, oócitos recuperados, taxa de
197 recuperação de oócitos - porcentagem de oócitos recuperados por folículo aspirado) e
198 qualitativos (qualidade dos oócitos), foram analisados utilizando a análise de variância
199 (ANOVA) com o pacote estatístico *Statistical Analysis System (SAS[®])* for Windows versão
200 9.0. As médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ($P<0,05$) e as variáveis não
201 paramétricas foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ($P<0,05$).

202

203 **Resultados**

204

205 Os dados obtidos demonstram que houve diferença ($P<0,05$) na média de folículos
206 aspirados nas LOPU's (Tabela 1), com menor média na 3^a LOPU.

207 Em relação à média de oócitos recuperados, não observou-se diferença significativa
208 entre a 1^a e a 5^a LOPU ($P>0,05$), porém as médias dos folículos aspirados na 2^a, 3^a e 4^a
209 LOPU reduziram significativamente em relação a 1^a LOPU ($P<0,05$) (Tabela 1).

210 Avaliando a taxa de recuperação oocitária, através da razão entre folículos
211 aspirados e oócitos recuperados, houve uma redução na 3^a e 4^a LOPU em relação à 1^a e 2^a
212 LOPU ($P<0,05$) e na 5^a LOPU observou-se um aumento da recuperação oocitária em
213 relação à 3^a e 4^a LOPU ($P<0,05$) (Tabela 1).

214 Avaliando a influência de sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia sobre a
215 qualidade dos Complexos *Cumulus oophorus* (CCO's), classificados em graus de
216 qualidade oocitária (Figura 2), observou-se que nas LOPU's os oócitos de grau 1 e 3 não
217 apresentaram diferença estatística ($P>0,05$). Em relação aos CCO's de grau 2, reduziram
218 entre a 1^a e a 4^a LOPU e os oócitos de grau 4 aumentaram na 2^a, 4^a e 5^a LOPU em relação a
219 1^a e 3^a LOPU ($P<0,05$).

220

221 **Tabela 1** – Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação
 222 oocitária em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas
 223 caprinas SPRD

Variáveis	LOPU					Total
	1º	2º	3º	4º	5º	
Folículos aspirados	138	94	98	114	115	559
Média/Animal	11,5 ^a	10,4 ^{ab}	8,2 ^b	10,4 ^{ab}	9,6 ^{ab}	10,0
Oócitos recuperados	55	28	26	26	49	184
Média/Animal	4,6 ^a	2,5 ^b	2,2 ^b	2,2 ^b	4,1 ^{ab}	3,1
Taxa de recuperação (%)	39,8 ^a	29,8 ^{ab}	26,5 ^b	22,8 ^b	42,6 ^a	32,9

224 Médias com mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

225 Médias com mesma letra, para variável taxa de recuperação, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado a
 226 5% de probabilidade.

227

228 Houve uma redução ($P < 0,05$) de estruturas viáveis na 2ª e 4ª LOPU (46,4% e
 229 53,8% respectivamente), quando comparadas com a viabilidade da 3ª e 5ª LOPU (80,76%
 230 e 61,2% respectivamente) de acordo com a Figura 4.

231 As biópsias pré (LOPU 1) e pós cinco aspirações (LOPU 5) evidenciaram tecidos
 232 ovarianos morfológicamente normais (Figura 4A). As alterações observadas após a LOPU
 233 5 foram discretas no parênquima ovariano de dois caprinos, observando-se uma área focal
 234 de infiltrado inflamatório mononuclear com predominância de linfócitos (Figura 4B).

235 Foram observadas aderências no local do procedimento cirúrgico em quatro das
 236 doze cabras submetidas às sucessivas LOPU.

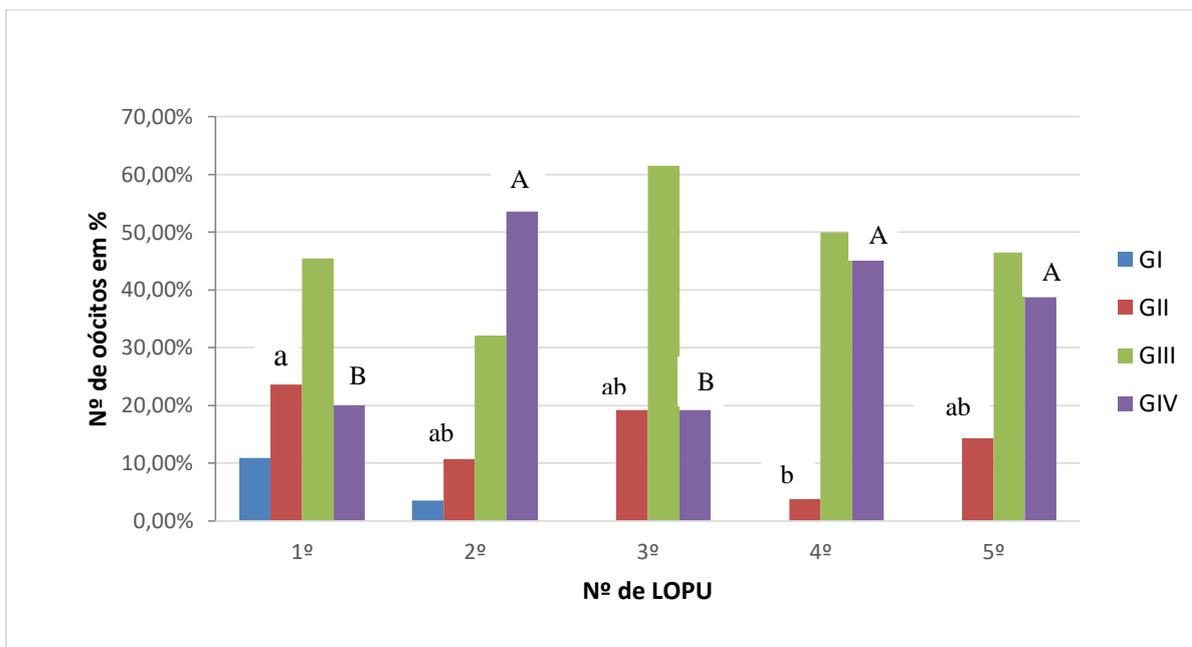
237

238

239

240

241 **Figura 2** – Grau de qualidade dos Complexos *Cumulus oophorus* (CCO's) colhidos em
 242 sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD

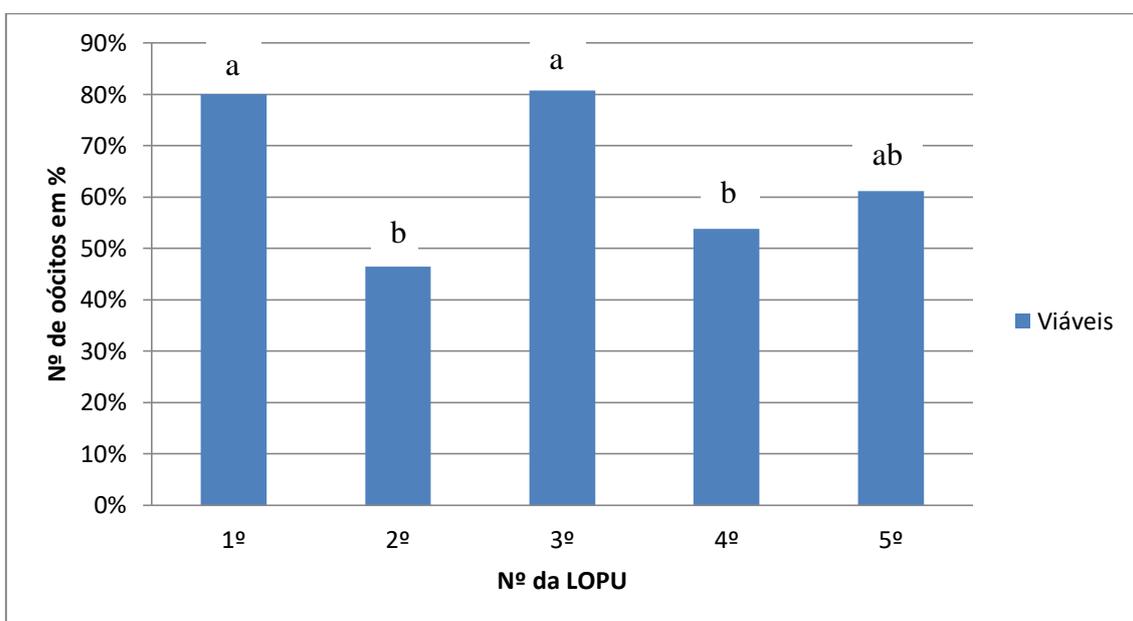


243

244 Médias com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste do Qui-quadrado a 5%. Médias com
 245 mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste do Qui-quadrado a 5%.

246

247 **Figura 3** – Viabilidade dos Complexos *Cumulus oophorus* (CCO's) colhidos em
 248 sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD



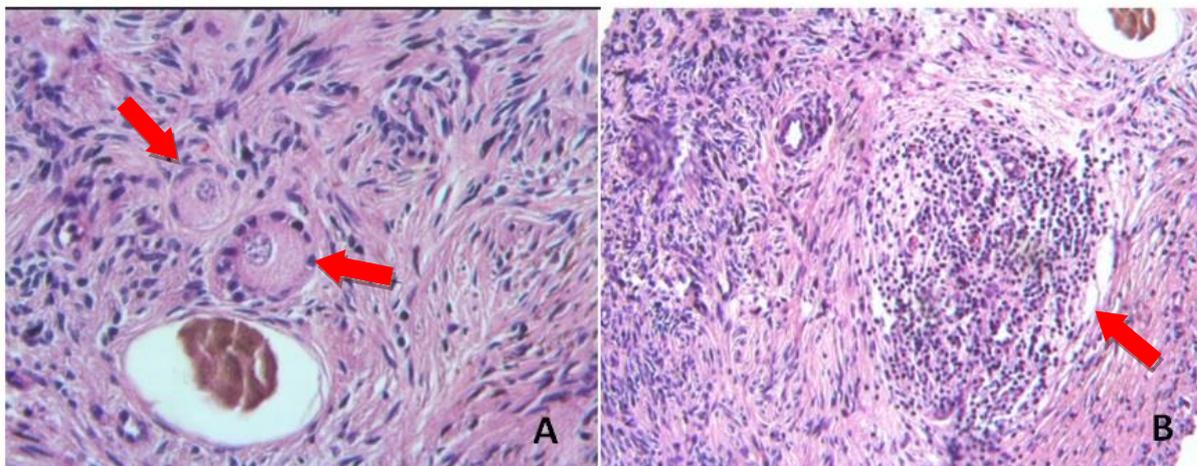
249

250 Médias com mesma letra não diferem entre si pelo Teste do Qui-quadrado a 5%.

251

252

253 **Figura 4** – Cortes histológicos de tecido ovariano caprino antes e após cinco aspirações
254 foliculares por laparoscopia em fêmeas caprinas SPRD



255 **A.** Folículos de transição normais (setas). H-E, aumento de 400x. **B.** Infiltrado inflamatório
256 mononuclear focal. H-E, aumento de 200x.

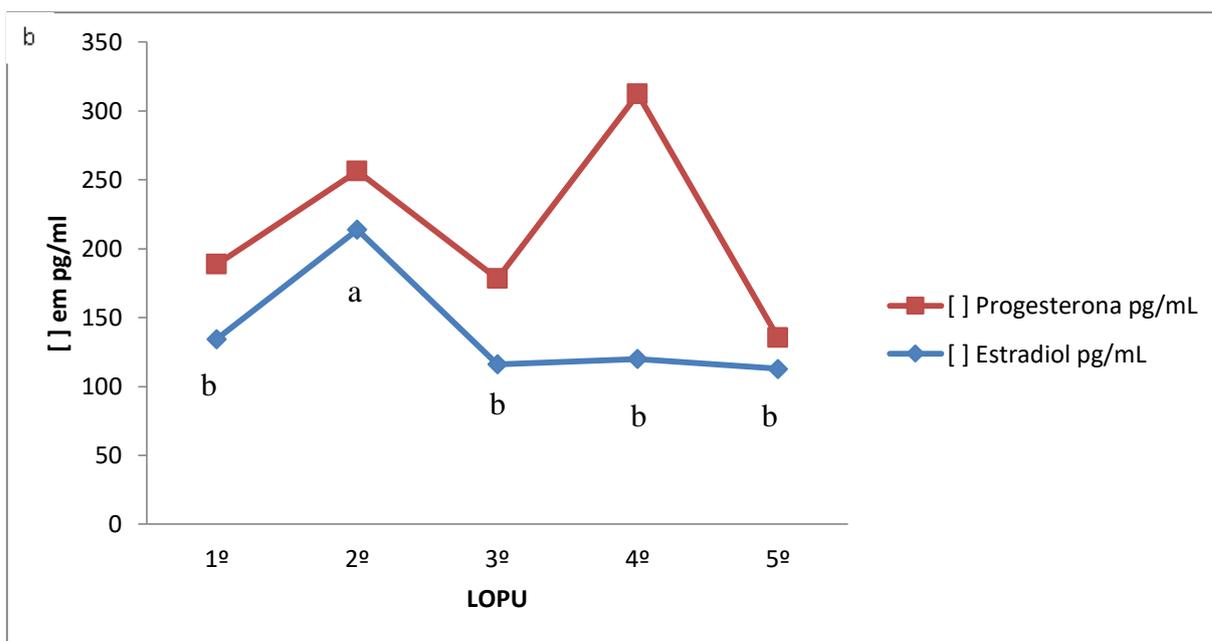
257

258 Não foram observados efeito das LOPUS ($P>0,05$) na concentração plasmática de
259 progesterona. De maneira geral, as concentrações permaneceram sem grandes variações
260 em todas as LOPUS (Figura 5).

261 Nas concentrações plasmáticas de Estrógeno foram observadas médias mais
262 elevadas na 2ª LOPU ($P<0,05$) em relação às demais LOPU's, conforme mostrado na
263 Figura 5.

264

265 **Figura 5** - Níveis de progesterona e estradiol de cabras submetidas a sucessivas aspirações
 266 foliculares por laparoscopia



267

268 Médias com mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

269

270 **Discussão**

271

272 Quando comparadas as médias de folículos, observou-se uma redução gradual
 273 significativa com posterior retomada numérica observando na última LOPU valores
 274 próximos e até superiores aos da primeira. Estudando sucessivas LOPU's, Morton et al.
 275 (2005) (ovinos) e Cordeiro et al. (2014) (caprinos) observaram diferenças significativas
 276 entre a primeira e a última aspiração, porém sem que fossem observadas uma retomada da
 277 quantidade dos folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação, observados
 278 com a evolução das LOPU's, como foi constatado neste experimento. Isso provavelmente
 279 por conta do intervalo de tempo entre as LOPU's empregada por Cordeiro et al. (2014),
 280 com duração de 7 dias, não havendo tempo suficiente para retomada do crescimento dos
 281 dados quantitativos e devido o reduzido número de LOPU realizados por Morton et al.
 282 (2005), que utilizou apenas três LOPU's em intervalos de 14 dias. Por tanto,
 283 provavelmente não foi o suficiente para uma provável adaptação dos animais aos
 284 procedimentos, como constatado neste experimento.

285

286

A hipótese de que a redução dos índices avaliados ao longo das sucessivas LOPU's
 seria o uso frequente de hormônio exógeno, o qual poderia estar induzindo a formação de

287 anticorpos anti-FSH e anti-eCG (Cordeiro et al., 2014; Bodin, et al., 1997; De Ruigh et al.,
288 2000) foi excluída, pois a retomada dos índices com as LOPU's consecutivas demonstram
289 que não há interferências nas quantidades e qualidade dos oócitos de LOPU.

290 Outros autores que trabalharam com aspirações foliculares em pequenos ruminantes
291 (Teixeira et al., 2011; Gibbons et al., 2007) não encontraram redução nas concentrações
292 quantitativas e qualitativas de oócitos após sucessivas LOPU's, resultados que contrapõem
293 ao observados. Tal fato demonstra as variações de resultados quanto à utilização de
294 sucessivas aspirações foliculares no mesmo animal e o impacto causado na reprodução dos
295 mesmos.

296 A qualidade dos oócitos apresentou variações significativas entre as LOPU's, com
297 momentos de queda e melhoria da qualidade no decorrer das sucessivas LOPU's. Essas
298 variações na qualidade oocitária podem ter sido em decorrência de ajuste de técnica, já que
299 variações podem ocorrer por vários fatores, como calibre da agulha, pressão e calibre do
300 sistema de aspiração e tamanho de folículos aspirados (Rodríguez et al., 2006; Fry et al.,
301 1997).

302 A maioria dos oócitos perde parte das células do *cumulus* no trânsito do folículo até
303 o tubo de coleta (Cordeiro et al., 2014). Uma forma de preservar as células do *cumulus*
304 seria por meio da adequação do vácuo trabalhando com folículos em estágio mais precoce
305 que por sua vez têm complexos *cumulus*-oócito mais compactos (Baldassarre et al., 1994).
306 O oócito caprino demonstra uma certa fragilidade à pressão do vácuo. Um leve aumento na
307 pressão no momento da desobstrução das agulhas com coágulos de sangue, levava ao
308 aparecimento de oócitos desnudos.

309 Variações na qualidade de oócitos após sucessivas LOPU's também foram
310 encontradas por Cordeiro et al. (2014) que observou diminuição tanto quantitativa quanto
311 qualitativa dos oócitos recuperados por LOPU. Já Morton et al. (2005) observou uma
312 redução na quantidade de folículos e oócitos, mas não na qualidade dos oócitos
313 recuperados quando trabalhou com ovinos submetidos a sucessivas LOPU's.

314 A avaliação histológica não revelou presença de lesões que interferissem na
315 morfofuncionalidade dos ovários, apenas áreas de infiltrado inflamatório constatadas em
316 dois animais. Esses achados coincidem com os encontrados por Teixeira et al. (2011)
317 estudando a histologia de ovários de ovelhas submetidos a nove seções de LOPU com
318 intervalo de sete dias.

319 O fato da não observação de lesões ovarianas pode ter ocorrido em função das
320 punções ovarianas serem em locais específicos, que no caso, ocorre apenas nos folículos
321 (Teixeira et al., 2011). Sendo assim, já que os folículos ovarianos localizam-se na
322 superfície do ovário, na região cortical, o restante dos ovários permaneceu íntegro como
323 foi observado neste experimento através da histologia.

324 O comprimento da agulha utilizada nas LOPU's em pequenos ruminantes é menor
325 que a agulha utilizada em OPU guiada por ultrassom, com isso a agulha perfura somente o
326 folículo, sem que haja perfuração de outras partes do ovário evitando assim a ocorrência de
327 alterações histopatológicas como observado por Viana et al. (2003) quando avaliou lesões
328 no trato genital em vacas utilizadas como doadoras de oócitos.

329 As pequenas áreas de infiltrado inflamatório que foram observadas em duas cabras
330 deste experimento podem ter ocorrido por processos fisiológicos normais do corpo lúteo,
331 subsequente ao folículo que ovulou e que é totalmente eliminado por apoptose (Lucacin &
332 Pinto Neto, 2009), ou mesmo, pode ter ocorrido com os folículos que foram aspirados, por
333 isso a constatação dessas áreas de inflamação, porém sem comprometimento do
334 parênquima ovariano.

335 As dosagens de progesterona não apresentaram diferenças ($P > 0,05$), mostrando que
336 não houve interferência das LOPU's na produção da mesma. Em relação ao estradiol
337 houve um aumento ($P < 0,05$) na segunda LOPU provavelmente devido a presença de
338 folículos maiores já que no momento da divergência da onda ovulatória a taxa de
339 crescimento dos folículos, dois ou três dias depois da emergência da onda, o FSH sofre
340 rápido declínio (Mapletoft, 2000), com subsequente aumento da concentração de estradiol
341 no fluido folicular dos folículos maiores e no sistema circulatório (Kaneko et al., 1991;
342 Mihm et al., 1997; Evans et al., 1997).

343 Foram observadas aderências em quatro dos doze animais, em um total de 33,3%,
344 resultado semelhante foram mencionados por Menchaca et al. (2016). Também foram
345 observadas por Cordeiro et al. (2014) em estudos com cabras adultas e pré-púberes, que
346 15% dos animais tiveram aderência entre o ovário e as estruturas adjacentes,
347 predominantemente após a quarta intervenção, e 10% desenvolveu aderências entre o
348 omento e os locais de inserção dos trocartes após sucessivas LOPU's. Stangl et al. (1999)
349 também constataram aderências em ovelha submetidas às sessões de LOPU. Este fato está
350 relacionado à manipulação da intervenção cirúrgica, apesar de minimamente invasiva.

351

352 **Conclusão**

353

354 As cinco seções de aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) com intervalos de doze
355 dias entre elas não interferiram na quantidade e qualidade de oócitos recuperados e não
356 causam lesões suficientes para modificar a morfofuncionalidade ovariana.

357

358 **Agradecimentos**

359

360 Os autores gostariam de agradecer à CAPES e CNPq pelo financiamento necessário para
361 realização desse estudo.

362

363 **Conflito de interesse**

364

365 Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse a declarar.

366

367 **Referências**

368

369 Abdullah, R. B., Liow, S. L., Rahman, A. N. M. A., Chan, W. K., Wan-Khadajah, W. E., &
370 NIG, S. C. (2008). Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to
371 laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental
372 competence in goats. *Theriogenology*, **70**, 765–771.

373

374 Baldassarre, H., Matos, D. G., Furnus, C. C., Castro, T. E., & Cabrera Fischer, E. I. (1994).
375 Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis.
376 *Animal Reproduction Science*, **35**, 145-150.

377

378 Baldassarre, H., Fumus, C. C., Matos, D. G., & Pessi, H. (1996). In vitro production of
379 sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin
380 treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, **45**, 707-717.

381

382 Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., & Karatzas, C. N. (2002).
383 Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic

- 384 ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*, **57**, 276-
385 264.
- 386
- 387 Bodin, L., Drion, P. V., Remy, B., Brice, G., Cognie, Y., & Beckera, J. F. (1997). Anti-
388 PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization.
389 *Reproduction Nutrition Development*, **37**, 651-660.
- 390
- 391 Cordeiro, M. F., Teixeira, P. P. M., Oliveira, M. E. F., Di Filippo, P. A., Dias, D. P. M.,
392 Beretta, C. A. G., Dória, R. G. S., Feliciano, M. A. R., Coutinho, L. N., & Vicente, W.
393 R. R. (2014). Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to
394 repeated follicular aspiration. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,
395 **66**(1), 137-144.
- 396
- 397 Cox, J. F., & Alfaro, V. (2007). In vitro fertilization and development of OPU derived goat
398 and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**, 83-87.
- 399
- 400 De Ruigh, L., Mullaart, E., & Van Wagendonk-De Leeuw, A. M. (2000). The effect of
401 FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield. *Theriogenology*,
402 **53**(1), 429.
- 403
- 404 Evans, A. C. O., Komar, C. M., Wandji, S. A., & Fortune, J. E. (1997). Changes in
405 androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the
406 recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine
407 estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **57**, 394-401.
- 408
- 409 Fry, R. C., Niall, L. M., Simpson, T. L., Squires, T. J., & Reynolds, J. (1997). The
410 collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, **47**, 977-967.
- 411
- 412 Gibbons, A., Bonnet, F. P., Cueto, M. I., Catala, M., Salamone, D. F., Gonzalez-Bulnes,
413 A., & Pereyra-Bonnet, F. (2007). Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro
414 embryo production in small ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, **42**, 423-
415 426.
- 416

- 417 Gonçalves, P. B. D., Oliveira, M. A. L., Mezzalira, A., Montagner, M. M., Visitin, J. A., &
418 Costa, L. F. S. (2008). Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P. B. D.;
419 Figueiredo, J. R.; & Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed.
420 São Paulo: Roca. 261-291.
421
- 422 Kaneko, H., Terada, T., Taya, K., Watanabe, G., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., & Igarashi,
423 M. (1991). Ovarian follicular dynamics and concentrations of estradiol-17 β ,
424 progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the
425 periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reproduction and Fertility*
426 *Development*, **3**, 529-535.
427
- 428 Lucacin, E., & Pinto Neto, A. (2009). Mecanismos da luteólise: Revisão de literatura.
429 *Arquivo de Ciência Veterinária e Zoologia UNIPAR*, **12**(2), 187-190.
430
- 431 Machado, R., Corrêa, R. F., Barbosa, R. T., & Bergamaschi, M. A. C. M. (2008). Escore
432 da Condição Corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. *Circular*
433 *Técnica*, EMBRAPA. São Carlos, São Paulo. 1-16.
434
- 435 Mapletoft, R. J. (2000). Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 β on
436 ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Animal Reproduction*
437 *Science*, **59**, 141-157.
438
- 439 Menchaca, A., Barrera, N., Santos Neto, P. C., Cuadro, F., & Crispo, M. (2016). Advances
440 and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Animal*
441 *Reproduction*, **13**(3), 273-278.
442
- 443 Mihm, M., Good, T. E. M., Ireland, J. J., Knight, P., & Roche, J. (1997). Decline in serum
444 follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors
445 involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biology of Reproduction*, **57**,
446 1328-1337.
447

- 448 Morton, K. M., Graaf, S. P., Campbell, A., Tomkins, L. M., Maxwell, W. M. C., & Evans,
449 G. (2005). Repeat Ovum Pick-up and In Vitro Embryo Production from Adult Ewes
450 with and without FSH treatment. *Reproduction in Domestic Animals*, **40**, 422-428.
451
- 452 Padilha, L. C. (2013). Produção *in vitro* de embriões. In: Oliveira, M. E. F., Teixeira, P. P.
453 M., & Vicente, W. R. R. *Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos*. 1. ed. São
454 Paulo: MedVet. 157-186.
455
- 456 Rodríguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Chamorro, C. A., & Paz, P.
457 (2006). Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices
458 for Optimal Oocyte Retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**, 106–113.
459
- 460 SAS. (2002). *SAS Software*. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
461
- 462 Stangl, M., Kuhholzer, B., Besenfelder, U., & Brem, G. (1999). Repeated endoscopic
463 ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, **52**(4), 709-716.
464
- 465 Teixeira, P. P. M., Padilha, L. C., Oliveira, M. E. F., Motheo, T. F., Silva, A. S. L.,
466 Barrosa, F. F. P. C., Coutinho, L. N., Flores, F. N., Lopes, M. C. S., Bandarra, M. B.,
467 Silva, M. A. M., Vasconcelos, R. O., Rodrigues, L. F. S., & Vicente, W. R. R. (2011).
468 Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary
469 and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, **127**, 169– 175.
470
- 471 Teixeira, P. P. M. *Aspiração folicular videolaparoscópica em ovelhas recém-desmamadas*
472 *submetidas à estimulação ovariana*. (2013). 58 f. Tese (Doutorado em Medicina
473 Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual
474 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
475
- 476 Viana, J. H. M., Nascimento, A. A., Pinheiro, N. L., Ferreira, A. M., Camargo, L. S. A.,
477 Sá, W. F., & Marques Júnior, A. P. (2003). Caracterização de sequelas subsequentes à
478 punção folicular em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **23**(3), 119-124.
479

480 Viana, J. H., Camargo, L. S. A., Ferreira, A. M., Sá, W. F., Fernandes, C. A. C., &
481 Marques Junior, A. P. (2004). Short intervals between ultrasonographically-guided
482 follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of
483 dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction*
484 *Science*, **84**(1-2), 1-12.

CAPÍTULO II

Efeito da infusão de células-tronco mesenquimais em ovários de cabras submetidas a aspirações foliculares por laparoscopia

1 **Efeito da infusão de células-tronco mesenquimais em ovários de cabras submetidas a**
2 **aspirações foliculares por laparoscopia**

3 Felipe Pereira da Silva Barçante^{a*}, Renata Patrícia Sousa^c, Lucilene dos Santos Silva^a, Camila
4 Ernanda Sousa de Carvalho^a, Napoleão Martins Argôlo Neto^c, Antônio de Sousa Junior^e,
5 Hermínio José da Rocha Neto^c, Maria Acelina Martins de Carvalho^c, Yndyra Nayan Teixeira
6 Carvalho Castelo Branco^a, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva^a, Micherlene da Silva
7 Carneiro Lustosa^a, José Adalmir Torres de Souza^b

8
9 ^aPós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

10 ^bLaboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

11 ^cNúcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

12 ^dUniversidade Estadual do Maranhão, São Luis, MA, Brasil.

13 ^eColégio Técnico de Teresina (CTT), CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

14

15 *Autor para Correspondência:

16 Felipe Pereira da Silva Barçante

17 E-mail: felipebarcantevet@gmail.com

18

19 **Resumo**

20

21 Os problemas ligados à diminuição do potencial produtivo dos ovários estão entre os
22 principais fatores limitantes à reprodução. Objetivou-se avaliar o efeito da infusão de células-
23 tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical de caprinos em ovários de cabras
24 submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU). Foram utilizadas 7
25 cabras SPRD, não lactantes, com idade média de 3 anos e escore da condição corporal (ECC)
26 variando de 3,0 a 4,0. As cabras foram divididas em dois tratamentos: T1-CTR (Controle – 3
27 animais); T2 - CTM (ovários tratados com células-tronco mesenquimais – 4 animais). Os
28 animais foram sincronizadas com o uso de esponjas intravaginais com acetato de
29 medroxiprogesterona e aplicações de d-cloprostenol e a estimulação ovariana constituiu-se na
30 administração de FSHp e eCG, em aplicações únicas, feita 36 horas anterior às LOPU's. As
31 fêmeas foram submetidas a 5 sessões/animal de LOPU com intervalos de 12 dias e a terapia
32 celular através de infusão ovariana com células tronco – CTM de cordão umbilical caprino, na

33 concentração de 1×10^6 cél/mL, nanomarcadas com Qtracker® e diluídas em 0,2 mL de
34 solução fisiológica (NaCl a 0,9%) em duas aplicações: na última LOPU e 70 dias após. A
35 avaliação quanto a funcionalidade ovariana/oocitária foi realizada 45 dias posterior a quinta
36 LOPU. Foram realizadas biopsias aspirativas no córtex ovariano antes da primeira LOPU, e
37 após a quinta LOPU. A avaliação histológica foi realizada após 115 dias da primeira infusão
38 de CTM, a partir do abate dos animais e coleta dos ovários. Todas as análises foram
39 executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2002). Com
40 isso, observou-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os folículos aspirados,
41 oócitos recuperados e taxa de recuperação em relação aos grupos controle e grupo de cabras
42 tratadas com CTMs. Quanto à qualidade dos CCO's não ocorreu diferença significativa
43 ($P>0,05$) entre as classificações qualitativas das estruturas oocitárias nas diversas LOPU's. Na
44 histologia, as alterações quando observadas, foram discretas, restritas ao parênquima
45 ovariano, sem comprometimento do mesmo. Com isso, a utilização de CTM não influenciou
46 nos parâmetros qualitativos e quantitativos de oócitos recuperados por LOPU.

47

48 **Palavras-chave:** Ovários, caprinos, laparoscopia, células-tronco

49

50 1. Introdução

51

52 Para obtenção dos oócitos, que é etapa fundamental para a realização da biotécnica de
53 produção *in vitro* de embriões (PIV) em animais domésticos, o procedimento *in vivo* mais
54 utilizado é a aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) (Abdullah et al., 2008). Ainda não
55 estão bem esclarecidas as consequências da utilização de sucessivas LOPU's na
56 morfofuncionalidade dos ovários e consequentes perdas reprodutivas.

57

Já foram constatadas alterações quanto a diminuição da quantidade e qualidade de
58 oócitos após múltiplas aspirações foliculares em caprinos (Cordeiro et al., 2014), como

59 também alterações histológicas com diminuição da atividade reprodutiva em bovinos
60 submetidos a várias punções ovarianas (Viana et al., 2003).

61 A lesão tecidual ocasionada por traumatismo ou agentes químicos e/ou infecciosos
62 pode resultar em perda anatômica e funcional da integridade dos tecidos (Monteiro et al.,
63 2010). Com isso, surge a possibilidade de reparação desses danos com a utilização de células-
64 tronco (Pan et al., 2017), pois a partir do início do século XXI, com o advento de novos
65 conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos
66 científicos que sugeriram a transdiferenciação direta ou indireta e diferenciação dessas
67 células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (Herzog et al., 2003;
68 Meirelles et al., 2006). A possibilidade de tratamento com células-tronco conquistou
69 notoriedade devido ao seu inigualável potencial terapêutico e tornou-se a principal alternativa
70 da terapia celular (Lai et al., 2007).

71 Células-tronco mesenquimais tem sido alvo de grandes pesquisas clínicas e
72 experimentais pelos seus efeitos benéficos com utilização neurológicas (Himes et al., 2006;
73 Park et al., 2006; Choi et al., 2010; Lee; Park, 2009), cardíacas (Ohnishi et al., 2007; Psaltis et
74 al., 2008; Ilárduya et al., 2009; Chin et al., 2010), hepáticas (Mohamadnejad et al., 2007),
75 renais (Morigi et al., 2008), pulmonares (Hackett et al., 2010), ortopédicas (Feitosa et al.,
76 2010), das glândulas mamárias (Costa et al., 2017), cicatrização (Del Carlo et al., 2008;
77 Argôlo Neto et al., 2012) e também na restauração reprodutiva com recuperação ovariana
78 (Pan et al., 2016; Terraciano et al., 2014; Su et al., 2016). Diante do exposto, objetivou-se
79 avaliar o efeito da infusão de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical de
80 caprinos em ovários de cabras submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia
81 (LOPU).

82

83 2. Material e Métodos

84

85 2.1. Comitê de Ética

86 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
87 Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo de 117/15.

88

89 2.2. Local e período de realização do experimento

90

91 O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
92 (LBRA) e no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) do
93 Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI) localizado no
94 município de Teresina – PI. Os animais experimentais foram oriundos do LBRA e as células-
95 tronco do NUPCelt. O experimento foi realizado entre os meses de outubro de 2016 e maio de
96 2017.

97

98 2.3. Seleção dos animais experimentais

99

100 Foram utilizadas 7 cabras SPRD, não lactantes, com idade média de 3 anos, com escore
101 da condição corporal variando de 3,0 a 4,0, em escala de 1 a 5, onde 1 corresponde ao animal
102 muito magro e 5 ao muito gordo. As fêmeas selecionadas foram mantidas em piquetes com
103 pastagem de *Andropogon (gayanus Kunth)*, com suplementação de 400 gramas de
104 concentrado por animal fornecidos ao cocho no período da tarde, com água e sal mineral *ad*
105 *libitum*. As cabras foram divididas em dois grupos sendo um com 3 animais (Grupo G1-
106 Controle) e outro com 4 animais (G2-CTM – ovários tratados com células tronco
107 mesenquimais).

108

109 2.4. Sincronização e estimulação ovariana

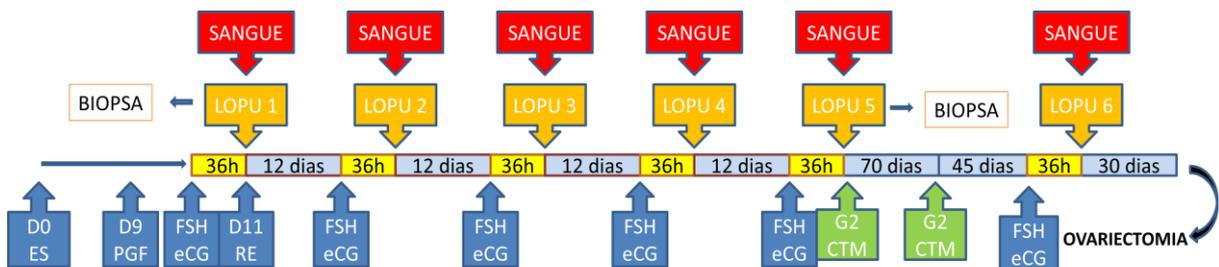
110

111 Os animais foram sincronizados com o uso de esponjas intravaginais impregnadas com
 112 60 mg de acetato de medroxiprogesterona no (D0) por um período de 11 dias, sendo que no
 113 nono dia (D9) foi administrado por via intramuscular, 75 µg de d-cloprostenol. A estimulação
 114 ovariana constituiu na administração de 80 mg de FSHp e 300 UI de eCG, ambas em
 115 aplicação única, por via intramuscular, feita 36 horas anterior às LOPU's.

116

117 **Figura 1** - Esquema de tratamento hormonal, punções foliculares, coletas sanguíneas,
 118 biopsias ovarianas, infusão com células-tronco mesenquimais e ovariectomia em cabras
 119 durante o período experimental

120



121

D0- dia zero (início do tratamento com progestágeno)

ES- colocação da esponja

D9- nono dia do tratamento progestágeno e PGF2α- aplicação de 70µg de cloprostenol – intramuscular

D11- décimo primeiro dia(RE- retirada das esponjas final do tratamento progestágeno)

FSH + eCG	Aplicação de 80 mg de FSHp e de 300 UI de eCG- estimulação ovariana
12 dias	Intervalos entre LOPUS
36h	36 horas antes das laparoscopias(LOPUS)
LOPU	Punção Folicular por Laparoscopia
SANGUE	Coleta de sangue para dosagem hormonal
BIOPSIA	Biopsia dos ovários das cabras experimentais destinados a histologia
G2 CTM	Tratamento com células-troncos mesenquimais

122

123

124 *2.5. Aspirações foliculares e infusão de células tronco*

125

126 As fêmeas dos grupos G1 e G2 foram submetidas a 5 sessões/animal de LOPU com
127 intervalos de doze dias e uma LOPU após 115 dias do início do tratamento com células
128 tronco. A terapia celular foi realizada na LOPU 5 e uma outra infusão após 70 dias. Foram
129 utilizadas CTM do cordão umbilical de caprinos na concentração de 1×10^6 cél/mL, as quais
130 foram infundidas com o nanomarcador Qtracker® e diluídas em 0,2 mL de PBS estéril.

131

132 *2.6. Preparo dos animais e protocolo anestésico*

133

134 Antes de cada aspiração, as fêmeas passaram por jejum alimentar 36h, e líquido de
135 24h, os animais receberam como medicação pré-anestésica, 0,05 mg/Kg/IM de cloridrato de
136 xilazina a 2% por via intramuscular e, após 10 minutos, foi aplicado cloridrato de cetamina a
137 10% para indução na dose de 5 mg/Kg/IV. Em seguida a fêmea foi colocada em maca
138 cirúrgica apropriada, onde o animal foi entubado com uma sonda endotraqueal de 7,5mm com
139 balonete insuflável, com o auxílio de um laringoscópio de lâmina reta. A sonda foi fixada no
140 chanfro do animal com tiras de gaze, evitando assim aspiração do conteúdo ruminal. Em
141 seguida, a sonda foi acoplada ao aparelho de anestesia inalatória para permitir o fornecimento
142 de oxigênio medicinal, sob ventilação assistida, facilitando a troca gasosa, e Isoflurano como
143 anestesia inalatória. No campo cirúrgico, região do abdome cranial ao úbere, foi realizada a
144 tricotomia e antissepsia com álcool iodado 2%.

145

146

147

148

149 2.7. *Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU)*

150

151 As LOPU's iniciaram com o posicionamento da fêmea em Trendelenburg, e a agulha
152 de Veress foi introduzida cerca de 10 cm cranial ao úbere e cinco centímetros à direita da
153 linha média, para inflar a cavidade com CO₂, e com o auxílio de um bisturi, realizado um
154 orifício para inserir trocarter de 7 mm a qual foi introduzido o laparoscópio.

155 O endoscópio rígido foi conectado a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o
156 interior da cavidade e a imagem resultante foi visualizada. Uma vez obtida a visão interna da
157 cavidade, foi realizada uma pequena incisão na pele para a introdução do trocarte de 10 mm,
158 para a passagem da pinça fenestrada de apreensão com cremalheira para manipulação do
159 útero, tubas e bursas ováricas, a fim de visualizar os ovários. Antes de iniciar a aspiração, os
160 ovários foram examinados e o número de folículos visíveis (três a oito mm) na superfície de
161 cada um foi registrado. O ovário foi imobilizado pela apreensão próxima ao seu ligamento,
162 evitando ao máximo danificar as estruturas das tubas e do pedículo. Em seguida, a agulha de
163 aspiração foi introduzida na cavidade próxima ao local onde se encontrará o ovário.

164 Os folículos foram puncionados pela movimentação dos ovários em diferentes
165 posições com a pinça de apreensão. A pressão do vácuo foi ajustado 35 mmHg em um sistema
166 de aspiração composto de uma agulha de 20G, conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de
167 comprimento presa a rolha de silicone conectada no tubo de colheita (50 mL). No interior do
168 sistema de aspiração por onde passarão complexos *cúmulus oophorus* foi feita uma lavagem
169 prévia com o meio de colheita deixando aproximadamente 2 mL deste líquido, no fundo do
170 tubo, para receber os oócitos.

171 A fim de minimizar a formação de possíveis aderências, os ovários, ao final da
172 laparoscopia, foram banhados com 20 mL de solução fisiológica com 5% de glicerina
173 aquecido a 37°C e, logo após, o líquido da lavagem foi aspirado da cavidade. Ao final da

174 laparoscopia, as feridas cirúrgicas foram suturadas com e colocado antibiótico tópico sobre
175 cada incisão na pele. Ao redor das feridas cirúrgicas foi utilizada pomada
176 repelente/cicatrizante. Nas intervenções subsequentes, as incisões foram realizadas no mesmo
177 local à incisão anterior. Após serem retiradas da maca cirúrgica as fêmeas foram colocadas
178 em local limpo até o seu completo restabelecimento.

179

180 *2.8. Lavagem, rastreamento e seleção dos Complexos Cumulus Oophorus (CCO)*

181

182 O material aspirado foi transferido para um filtro de coleta de embriões e lavado com
183 PBS a 37°C. O conteúdo aspirado foi depositado em placas de Petri de 100 x 20mm para a
184 pesquisa de estruturas sob lupa estereomicroscópica. Os CCO's foram transferidos para placas
185 de 30 x 15mm contendo TCM 199 (com Sais de Hanks), e classificados de acordo com a
186 qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Viana et al., 2004).

187

188 *2.9. Obtenção, isolamento e cultivo de Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical* 189 *(CTCU)*

190

191 As células-tronco do cordão umbilical de caprinos foram adquiridas junto ao
192 Laboratório de Cultivo de Células-Tronco (LABCELT) do Núcleo Integrado de Morfologia e
193 Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), de acordo com preconizado por (Silva, 2016)

194

195 *2.10. Marcação, transplante e rastreamento das células-tronco mesenquimais*

196

197 As CTM foram marcadas com Qtracker® (Molecular Probes by life Technologies,
198 EUA), para rastreamento de tecido *ex-vivo*. Ao atingir 80% da confluência em cultivo *in vitro*,

199 as células-tronco do cordão umbilical foram tripsinizadas e centrifugadas a 462G por 10
200 minutos. 1×10^6 de CTM foram marcadas Qtracker® - emissão (655nm) e excitação (405 –
201 615nm). Os correspondentes A e B do Qtracker® foram homogeneizados e adicionados às
202 CTM's, incubados em estufa de CO₂ a 37°C por 50 minutos e agitadas no vórtex a cada 10
203 minutos. Em seguida, foi acrescido 1 mL de meio Alfa-MEM e centrifugadas duas vezes,
204 462G durante cinco minutos, e o pellet foi ressuspendido em 0,2 mL de solução fisiológica
205 (NaCl a 0,9%) e realizada infusão no parênquima ovariano das cabras tratadas. As cabras
206 controle receberam solução fisiológica (NaCl a 0,9%) no mesmo volume.

207

208 *2.11. Biópsias e cortes histológicos dos ovários*

209

210 Foram realizadas duas biopsias na região cortical do ovário com agulha/cânula para
211 biópsia semi automática de tecidos moles 14G antes da primeira LOPU e ao final (LOPU 5).
212 Ao final da sexta LOPU foram realizadas as ovariectomias e o material obtido nas biópsias e
213 das ovariectomias foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% de
214 ácido acético glacial) por 24 h e depois transferidos para álcool a 70%. O material foi
215 desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol, diafanizado em xilol, incluído
216 em resina histológica e submetido à histotécnica para coloração com hematoxilina-eosina e
217 tricrômio de Masson para análise sob microscopia óptica e de epifluorescência.

218

219 *2.12. Análise estatística*

220

221 O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente ao acaso com 7 repetições
222 (número de animais). Os dados quantitativos obtidos (folículos aspirados, oócitos
223 recuperados, taxa de recuperação de oócitos - porcentagem de oócitos recuperados por

224 folículo aspirado) e qualitativos (qualidade dos oócitos), foram analisados utilizando a
225 ANOVA com o pacote estatístico *Statistical Analysis System (SAS®)* for Windows versão
226 9.0. As médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ($P < 0,05$).

227 Para os estudos com terapia celular com células-tronco, as variáveis foram submetidas
228 à ANOVA. Quando um efeito do tratamento foi detectado, realizou-se o teste de comparação
229 de médias de SNK e Duncan, de acordo com o Coeficiente de Variação observado. Quando as
230 variáveis quantitativas não apresentem distribuição normal, juntamente com as semi-
231 quantitativas, estas foram submetidas às análises não paramétricas de Qui-quadrado. Foi
232 adotado um nível de rejeição da hipótese de nulidade de 5% ($P \leq 0,05$) para ambas as análises.

233

234 3. Resultados

235

236 Os números de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação
237 oocitária em sucessivas LOPU's em fêmeas caprinas SPRD tratadas e não tratadas com
238 células-tronco mesenquimais (CTM), são apresentados na Tabela 1.

239 De acordo com os resultados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os
240 folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação em relação aos grupos controle
241 e grupo de cabras tratadas com CTM's (Tabela 1).

242 Avaliando a influência da infusão de CTM no ovário de cabras após sucessivas
243 aspirações foliculares por laparoscopia, sobre a qualidade dos Complexos *Cumulus oophorus*
244 (CCO's), classificados em graus de qualidade oocitária (Figura 2) e sobre a viabilidade das
245 estruturas (Figura 3), não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) entre as classificações
246 qualitativas das estruturas oocitárias nas diversas LOPU's.

247

248 **Tabela 1** - Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação
 249 oocitária em sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas
 250 SPRD tratadas e não tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)

Variável	Controle	CTM
Folículos aspirados	11,00±3,00	9,00±2,45
Oócitos recuperados	6,66±0,57	4,66±1,53
Taxa de Recuperação	64,00±20,47	51,83±3,18

251 Foi utilizado o teste de SNK a 5% de probabilidade ($P>0,05$).

252

253 Na biópsia realizada na LOPU 5, o tecido ovariano apresentou características
 254 compatíveis com a normalidade, em cinco dos sete caprinos. As alterações quando
 255 observadas, foram discretas, restritas ao parênquima ovariano, observando-se uma área focal
 256 de infiltrado inflamatório mononuclear com predominância de linfócitos (Figura 04 D).

257 Na histologia dos ovários pós ovariectomia, também demonstrou tecido ovariano
 258 normal na maioria das amostras, com evidência de folículos primordiais a antrais, corpos
 259 *albicans* e pequenos e grandes vasos sanguíneos (Figura 4 A, B e C). As alterações
 260 histopatológicas observadas foram leves e focais: área focal contendo quantidades moderada
 261 de pigmentos de hemossiderina (Figura 4 F), hemorragia focal leve na região cortical (Figura
 262 4 E) e infiltrado inflamatório mononuclear focal leve, com predomínio de linfócitos em dois
 263 animais controle (D) e um animal do grupo CTM.

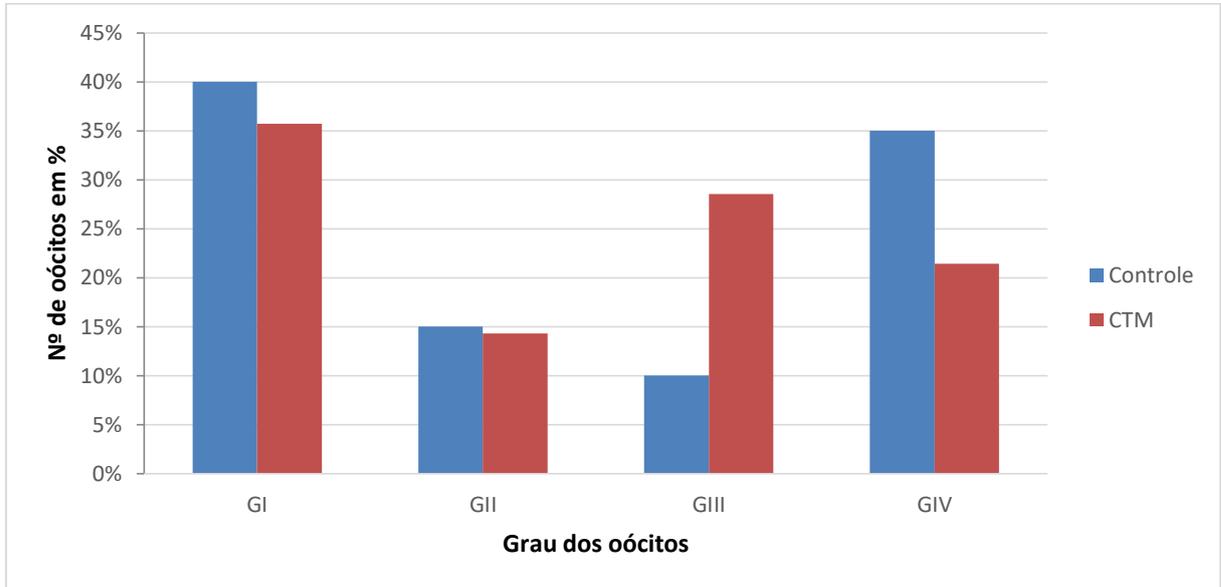
264

265

266

267

268 **Figura 2** - Grau de qualidade dos Complexos *Cumulus oophorus* (CCO's) colhidos em
 269 sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD tratadas
 270 e não tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)

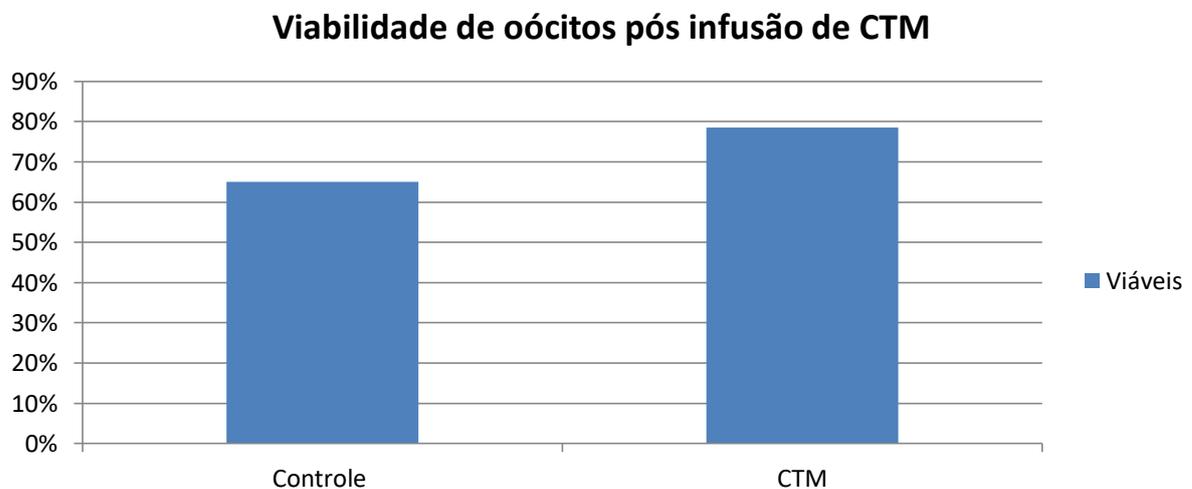


271

272 Foi utilizado o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($P > 0,05$).

273

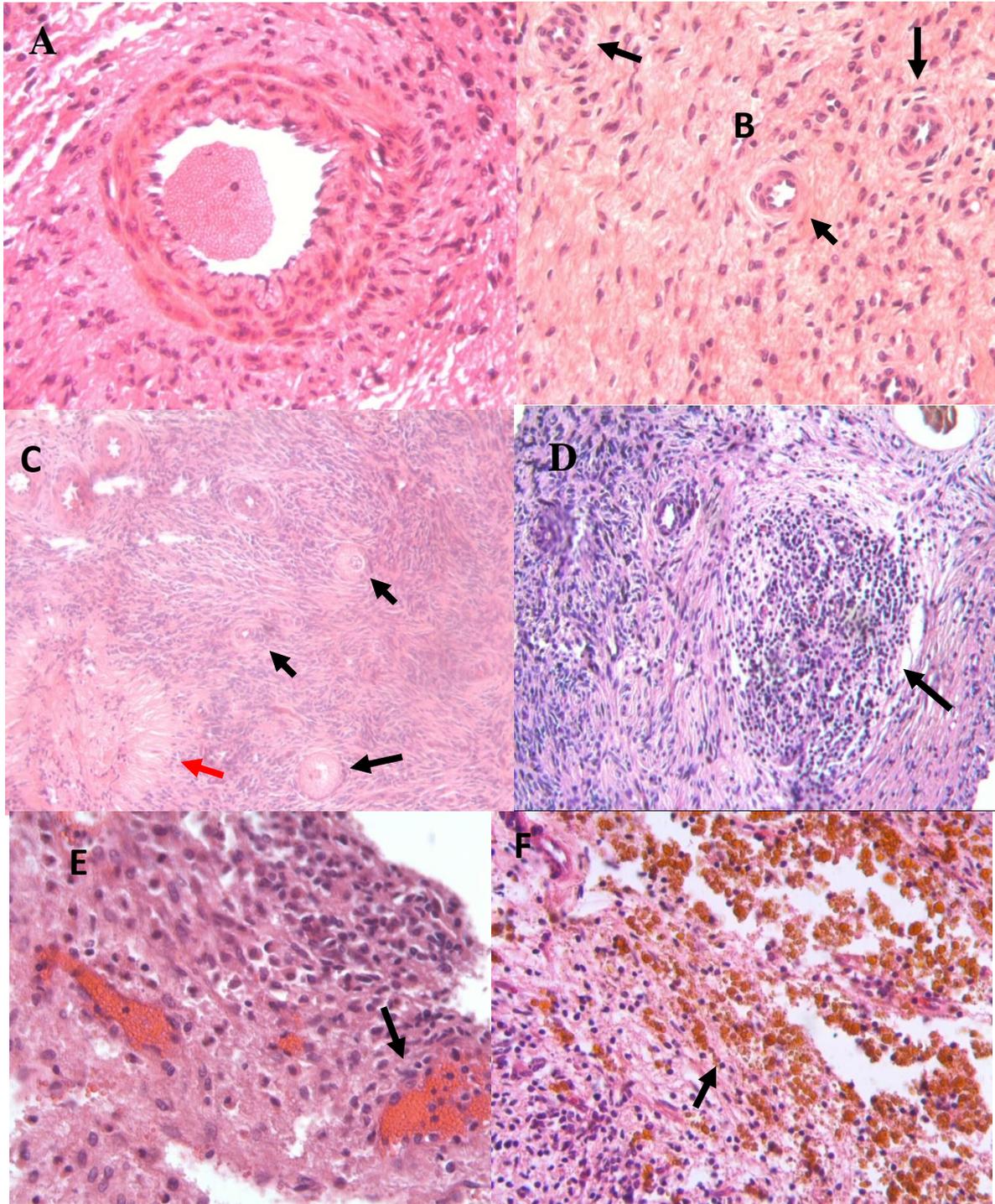
274 **Figura 3** - Viabilidade dos Complexos *Cumulus oophorus* (CCO's) colhidos em sucessivas
 275 aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) em fêmeas caprinas SPRD tratadas e não
 276 tratadas com células-tronco mesenquimais (CTM)



277

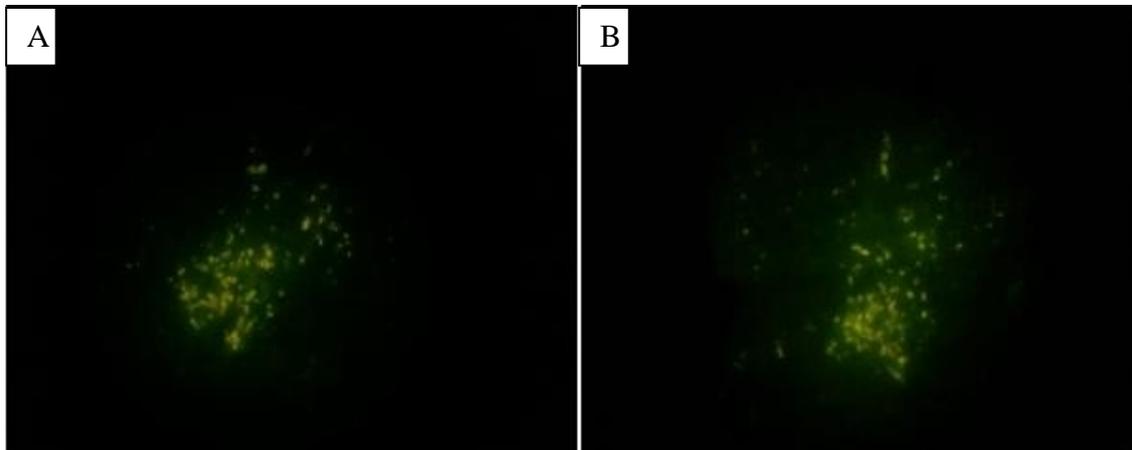
278 Foi utilizado o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($P > 0,05$).

279 **Figura 4** - Cortes histológicos de ovários caprinos. Folículo terciário (A). Parênquima
280 ovariano normal: vasos (seta) (B), Folículos primordiais (seta preta) e corpo *albicans* (seta
281 vermelha) (C) Área de infiltrado inflamatório mononuclear focal (D). Hemorragia focal (E) e
282 Pigmentos de hemossiderina (F), H-E, aumento de
283 200x



285

286 **Figura 5** - Fotomicrografia de fluorescência de CTM's marcadas com Qtracker® em cortes
287 parafinados de tecido ovariano de cabras após 115 dias de infusão celular, ovário direito (A),
288 ovário esquerdo (B)



289

290

291 Na avaliação histológica, para o rastreamento das células-tronco em microscopia de
292 fluorescência, o marcador Qtracker® nanocristais foi visualizado após processamento de
293 inclusão em parafina, mesmo após 115 de infusão das CTM's no parênquima ovariano
294 (Figura 05).

295

296 4. Discussão

297

298 As células-tronco têm a capacidade de regenerar tecidos lesionados (Teramura;
299 Frampton, 2013), além de promover o reestabelecimento da capacidade funcional, como
300 observado por Terraciano et al. (2014). Su et al. (2016) avaliando o efeito potencial de
301 andaimes de colágeno sobre a retenção de células-tronco do tecido adiposo infundidos no
302 ovário e seu efeito restaurador sobre a função ovariana em um modelo de insuficiência
303 prematura ovariana em ratos, demonstrou restauração a longo prazo da função ovariana
304 incluindo ciclos estrais, níveis de estradiol, desenvolvimento de folículos e fertilidade. Por

305 outro lado, este experimento não observou diferença entre os aspectos quantitativos e
306 qualitativos dos oócitos puncionados de ovários de cabras tratadas e não tratadas com células-
307 tronco mesenquimais, provavelmente por não terem sido observadas lesões ovarianas que
308 comprometessem sua função após as sucessivas aspirações foliculares.

309 Segundo Terraciano et al. (2014), a imunohistoquímica para o rastreamento de células-
310 tronco encontrou as mesmas distribuídas pela camada da teca, que indica que as células
311 infundidas nos ovários podem não se diferenciar diretamente em oócitos e células da
312 granulosa, mas sobreviver no interstício, desempenhando papéis importantes no
313 microambiente que envolve os oócitos no córtex ovariano. Isso seria um fato importante para
314 explicar o porquê da quantidade de oócitos e folículos não aumentarem pós-tratamento com as
315 CTM's.

316 Lesões ovarianas após sucessivas aspirações foliculares foram sugeridas por Cordeiro
317 et al. (2014) que observaram diminuição qualitativa e quantitativa dos oócitos de cabras após
318 seis punções foliculares com intervalo de sete dias entre elas, e constatado por Viana et al.
319 (2003) quando observaram correlação positiva entre quantidade de oócitos recuperados e
320 fibrose ovariana em vacas submetidas a múltiplas aspirações foliculares. Na histologia dos
321 ovários, Viana et al. (2003) constataram a presença de tecido cicatricial, infiltrados de células
322 inflamatórias e presença de tecido luteal disperso no estroma ovariano.

323 Avaliando as modificações biológicas e biomecânicas das disfunções ovarianas
324 causadas por quimioterapia induzida (CIOD) em ratos após a intervenção com células-tronco
325 mesenquimais do cordão umbilical humano (UCMSCs) e células tronco mesenquimais do
326 líquido amniótico humano (h-AMSCs), Pan et al. (2016) conseguiram restaurar a morfologia,
327 elasticidade e dureza ovariana danificadas para padrões anteriores, e as funções ovarianas
328 mostraram alguma recuperação, proporcionando assim a base biológica e biomecânica para
329 tratamentos clínicos.

330 As lesões contatadas, ao final das sucessivas LOPU's, observadas neste experimento,
331 foram mínimas e não comprometeram a capacidade dos ovários de produção oocitaria e
332 qualidade dos mesmos. Isso pode ser explicado pelo fato dos processos fisiológicos normais,
333 com o corpo lúteo, subsequente ao folículo que ovulou, é totalmente eliminado por apoptose
334 (Lucacin; Pinto-Neto, 2009), este fato também pode ter ocorrido com os folículos que foram
335 aspirados, por isso a constatação de lesões leves e sem comprometimento do parênquima
336 ovariano.

337 O fato de terem sido visualizadas durante a avaliação histológica as células-tronco
338 marcadas com nanocristais Qtracker®, mesmo após 115 de infusão das CTM's no
339 parênquima ovariano demonstra a eficácia da técnica de infusão e de marcação das células,
340 demonstrando assim um modelo animal de infusão ovariana de células-tronco do cordão
341 umbilical de caprinos em ovários de cabras, assim como descrito por Costa et al. (2017) em
342 modelo de terapia celular na recuperação da glândula mamaria de cabras com mastite.

343

344 **5. Conclusão**

345

346 As células-tronco Mesenquimais (CTM) não maximizam a quantidade e qualidade de
347 oócitos recuperados após sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia em cabras SPRD.

348

349 **Conflito de interesse**

350

351 Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse a declarar.

352

353

354

355

356 **Referências**

357

358 Abdullah, R. B., Liow, S. L., Rahman, A. N. M. A., Chan, W. K., Wan-Khadijah, W. E., Nig,
359 S. C., 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum
360 pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats.
361 **Theriogenology**. 70, 765–771.

362

363 Argôlo Neto, N. M., Del Carlo, R. J., Monteiro, B. S., Nardi, N. B. Chagastelles, P. C.,
364 BRITO A. F. S., REIS, A. M. S., 2012. Role of autologous mesenchymal stem cells
365 associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice.
366 **Clin. Exp. Dermatol.** 37, 544–553.

367

368 Chin, M. H., Pellegrini, M., Plath, K., Lowry, W. E., 2010. Molecular analyses of human
369 induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**. 7, 263-269.

370

371 Choi, M. R., Kim, H. Y., Park, J. Y., Lee, T. Y., Baik, C. S., Chai, Y. G., Jung, K. H., Park,
372 K. S., Roh, W., Kim, K. S., Kim, S. H., 2010. Selection of optimal passage of bone
373 marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with
374 amyotrophic lateral sclerosis. **Neurosci. Lett.** 472, 94-98.

375

376 Cordeiro, M. F., Teixeira, P. P. M., Oliveira, M. E. F., Di Filippo, P. A., Dias, D. P. M.,
377 Beretta, C. A. G., Dória, R. G. S., Feliciano, M. A. R., Coutinho, L. N., Vicente, W. R.
378 R., 2014. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated
379 follicular aspiration. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 66(1), 137-144.

380

- 381 Costa, C. R. M., Feitosa, M. L. T., Bezerra, D. O., Carvalho, Y. K. P., Olivindo, R. F. G.,
382 Fernando, P. B., Silva, G. C., Silva, M. L. G., Ambrósio, C. E., Conde Júnior, A. M.,
383 Argôlo Neto, N. M., Silva, L. M. C., Carvalho, M. A. M., 2017. Labeling of adipose-
384 derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for
385 ex vivo cell tracking. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.** 53, 363–370.
- 386
- 387 Del Carlo, R. J., Monteiro, B. S., Argôlo Neto, N., 2008. Células-tronco e fatores de
388 crescimento na reparação tecidual. **Ci. Vet. Tróp.** 11, 167-169.
- 389
- 390 Feitosa, M. L. T., Fadel, L., Beltrão-Braga, P. C. B., Wenceslau, C. V., Kerkis, I., Kerkis, A.,
391 Birgel Júnior, E. H., Martins, J. F. P., Martins, D. S., Miglino, M. A., Ambrósio, C. E.,
392 2010. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the
393 ovine femoral head. Preliminary results. **Act. Cir. Bras.** 25(5), 416-422.
- 394
- 395 Hackett, T. L., Knight, D. A., Sin, D. D., 2010. Potential role of stem cells in management of
396 COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 7(5), 81-88.
- 397
- 398 Herzog, E. L., Chai, L., Krause, D. S., 2003. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood.**
399 102, 3483- 3493.
- 400
- 401 Himes, B. T., Neuhuber, B., Coleman, C., Kushner, R., Swanger, S. A., Kopen, G. C.,
402 Wagner, J., Shumsky, J. S., Fisher, I., 2006. Recovery of function following grafting of
403 human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil.*
404 **Neural. Repair.** 20(2), 278-296.
- 405

- 406 Ilárduya, O. M., Barreiro, J. B., Moscoso, I., Añón, P., Fraga, M., Centeno, A., López, E.,
407 Doménech, N., 2009. Gene Expression Profiles in a Porcine Model of Infarction:
408 Differential Expression After Intracoronary Injection of Heterologous Bone Marrow
409 Mesenchymal Cells. **Transplant. Proc.** 41, 2276 -2278.
- 410
- 411 Lai, Y., Drobinskaya, I., Kolossov, E., Chen, C., Linn, T., 2008. Genetic modification of cells
412 for transplantation. **Adv. Drug. Deliv. Ver.** 60(2), 146-59.
- 413
- 414 Lee, P. H., Park, H. J., 2009. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a
415 candidate disease-modifying strategy in Parkinson's disease and multiple system atrophy.
416 **J. Clin. Neurosci.** 5(1), 1-10.
- 417
- 418 Meirelles, L. S., Chagastelles, P. C., Nardi, N. B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in
419 virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell. Sci.** 119, 2204-2213.
- 420
- 421 Mohamadnejad, M., Alimoghaddam, K., Mohyeddin-Bonab, M., Bagheri, M., Bashtar, M.,
422 Ghanaati, H., Baharvand, H., Ghavamzadeh, A., Malekzadeh, R., 2007. Phase 1 trial of
423 autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with
424 decompensated liver cirrhosis. **Arch. Iran. Med.** 10(4), 459-66.
- 425
- 426 MONTEIRO, B. S., ARGOLO NETO, N. M., DEL CARLO, R. J., 2010. Células-tronco
427 mesenquimais. **Ciência Rural.** 40, 238-245.
- 428
- 429 Morigi, M., Introna, M., Imberti, B., Corna, D., Abbate, M., Rota, C., Rottoli, D., Benigni,
430 A., Perico, N., Zoja, C., Rambaldi, A., Remuzzi, A., Remuzzi, G., 2008. Human Bone

- 431 Marrow Mesenchymal Stem Cells Accelerate Recovery of Acute Renal Injury and
432 Prolong Survival in Mice. **Stem Cells**. 26(8), 2075.
433
- 434 Ohnishi, S., Yasuda, T., Kitamura, S., Nagaya, N., 2007. Effect of hypoxia on gene
435 expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells.
436 **Stem Cells**. 25(5), 1166-77.
437
- 438 Pan, Y., Zhang, L., Zhang, X., Hu, C., Liu, R., 2017. Biological and biomechanical analysis
439 of two types of mesenchymal stem cells for intervention in chemotherapy-induced
440 ovarian dysfunction. **Arch. Gynecol. Obstet**. 295, 247–252.
441
- 442 Park, H. J., Lee, P. H., Bang, O. Y., Lee, G., Ahn, Y. H., 2008. Mesenchymal stem cells
443 therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson’s disease. **J.**
444 **Neurochem**. 107, 141–151.
445
- 446 Psaltis, P. J., Zannettino, A. C.W., Worthley, S. G., Gronthos, S., 2008. Concise Review:
447 Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Cardiovascular Repair. **Stem Cells**. 26, 2201-
448 2210.
449
- 450 SAS. 2002. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
451
- 452 Silva, G. C. **Células tronco da geléia de wharton do cordão umbilical de caprinos (*Capra***
453 ***hircus*): Protocolos de isolamento e caracterização**. 2016. 49f. Dissertação (Mestrado
454 em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade
455 Federal do Piauí, Teresina, 2016.

456

457 Su, J., Ding, L., Cheng, J., Yang, J., Li, X., Yan, G., Sun, H., Dai, J., HU, Y., 2016.

458 Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagens scaffolds restores

459 ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. **Hum. Reprod.** 31(5),

460 1075–1086.

461

462 Terraciano, P., Garcez, T., Ayres, L., Durli, I., Baggio, M., Kuhl, C. P., Laurino, C., Passos,

463 E., Paz, A. H., Cirne-Lima, E., 2014. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian

464 Failure in Mice. **Stem Cells Int.** 1-8.

465

466 Viana, J. H. M., Nascimento, A. A., Pinheiro, N. L., Ferreira, A. M., Camargo, L. S. A., Sá,

467 W. F., Marques Júnior, A. P., 2003. Caracterização de sequelas subsequentes à punção

468 folicular em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 23(3), 119-124.

469

470 Viana, J. H. Camargo, L. S. A., Ferreira, A. M., Sá, W. F., Fernandes, C. A. C., Marques

471 Junior, A. P., 2004. Short intervals between ultrasonographically-guided follicle

472 aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles

473 in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 84, 1-12.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sucessivas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU) não influenciaram na morfofuncionalidade de ovários de cabras SPRD.

A infusão de células-tronco mesenquimais (CTM) em ovários caprinos não influenciou na qualidade e quantidade de oócitos recuperados por LOPU.

As sucessivas LOPU não interferem nas concentrações hormonais de estradiol e progesterona em caprinos.

Novos estudos poderão contribuir para o desenvolvimento de outros protocolos a fim de estabelecer padrões de modelos experimentais de incremento na funcionalidade de ovários caprinos.