

Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos

Development and applications of artificial ovary in goats

José Ricardo de *Figueiredo*^{1,3}, Fabrício Sousa *Martins*¹, Ana Paula Ribeiro *Rodrigues*¹,
José Roberto Viana da *Silva*²

¹LAMOFOPA (Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais), FAVET, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²NUBIS-Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³E-mail: jrfig@pesquisador.cnpq.br

Resumo

O presente artigo aborda de forma resumida as bases gerais da biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) com ênfase nos estudos relativos ao desenvolvimento de um ovário artificial na espécie caprina. A importância do ovário artificial para a elucidação da foliculogênese inicial, testes de drogas sobre a dinâmica folicular e a sua potencial utilização para a produção *in vitro* de embriões em larga escala respeitando-se o bem-estar animal é destacada.

Palavras-chave: caprinos, cultivo *in vitro*, folículos pré-antrais, ovário artificial.

Abstract

*The present paper summarizes the basic aspects of the biotechnology of manipulation of oocytes enclosed in ovarian preantral follicles emphasizing the studies to develop an artificial ovary in goat species. The importance of the artificial ovary for the understanding of early folliculogenesis, evaluation the effects of different drugs on follicular dynamics and its potential use for the *in vitro* production of embryos in large scale ensuring the animal welfare is highlighted.*

Keywords: artificial ovary, caprine, *in vitro* culture, preantral follicles.

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, a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso. Outras biotécnicas terão sua aplicabilidade prática em larga escala no futuro. Nesse grupo, pode-se incluir a clonagem e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA).

O detalhamento técnico relativo à MOIFOPA bem como as bases gerais da oogênese e foliculogênese são abordados em capítulo específico no livro “Biotécnicas aplicadas à reprodução animal” (Figueiredo *et al.* 2008), não sendo, portanto, apresentados no presente artigo.

No intuito de facilitar a compreensão da importância da biotécnica de MOIFOPA/ovário artificial, este artigo fará uma breve abordagem sobre os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), enfatizando a sua classificação e destino no interior dos ovários. Em seguida, será discutida a importância da MOIFOPA no desenvolvimento do ovário artificial e suas aplicações na pesquisa básica, indústria farmacêutica, tratamento de infertilidade em humanos, bem-estar e reprodução de animais em larga escala.

Contexto do ovário artificial

O ovário mamífero contém milhares de oócitos que são armazenados individualmente em estruturas denominadas de folículos ovarianos. Do ponto de vista evolutivo, os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grupos, a saber: folículos pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários. *In vivo*, apesar da existência de milhares de oócitos, cerca de 99,9% será eliminada por meio de um processo fisiológico conhecido por atresia folicular. Tendo em vista a grande perda folicular que ocorre naturalmente nos ovários, a biotécnica de MOIFOPA/ovário artificial visa criar artificialmente *in vitro* as condições necessárias para que pequenos oócitos inclusos em folículos pré-antrais recuperados dos ovários possam sobreviver, crescer, maturar e posteriormente serem fecundados *in vitro*, minimizando o impacto da perda folicular originada pelo processo de atresia que ocorre largamente nos ovários. A importância da biotécnica de MOIFOPA deve-se ao fato de que 90% dos oócitos presentes nos ovários estão armazenados nos folículos pré-antrais, ou seja, em folículos destituídos de antro. Além disso, a morte folicular por atresia ocorre predominantemente na fase antral.

Aplicações do ovário artificial

O ovário artificial tem importantes aplicações nas seguintes áreas, a saber:

1. Pesquisa fundamental ou básica - Possibilita o estudo *in vitro* do efeito de diferentes substâncias sobre os folículos pré-antrais visando elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da foliculogênese inicial, atualmente pouco compreendida. Além disso, este modelo de estudo é importante, pois apresenta-se como um alternativa ao uso de animais em experimentos;
2. Biologia molecular- Assegura as condições necessárias para identificar e quantificar, nos diferentes compartimentos foliculares, a expressão dos genes que são responsáveis pelo controle do crescimento de folículos pré-antrais e antrais;
3. Indústria farmacêutica - Permite a realização de testes *in vitro* da ação de fármacos (benéfica ou tóxica) sobre os folículos preliminarmente ao seu emprego em experimentos envolvendo animais e seres humanos;
4. Nanotecnologia - Oferece um importante modelo para testar a inocuidade de nanopartículas utilizadas no carreamento de drogas de interesse médico;
5. Biossegurança - Ferramenta importante para se avaliar o efeito da radioatividade sobre a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento folicular;
6. Formação de bancos genéticos (germoplasma) - Permite uma avaliação precisa da eficiência de protocolos de criopreservação de oócitos analisando a taxa de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de oócitos inclusos folículos pré-antrais previamente criopreservados. Esta estratégia é de fundamental importância para a constituição de bancos de germoplasma tanto na espécie humana como em animais de de interesse zootécnico ou em vias de extinção visando posterior produção *in vitro* de embriões ou xenotransplante;
7. Reprodução humana assistida (tratamento de infertilidade) - Representa uma alternativa futura para o aprimoramento de meios de cultura visando a maturação oocitária e conseqüentemente a produção de embriões humanos *in vitro*. Atualmente estes embriões são produzidos utilizando-se procedimentos de superovulação e colheita dos oócitos por punção gerando desconforto físico e emocional nas pacientes. Outra aplicação seria a preservação da fertilidade feminina nos casos de mulheres que se submeterão a tratamentos de radio ou quimioterapias (casos de câncer) e que necessitam ter seu ovários previamente removidos e criopreservados para posterior autotransplante ou cultivo *in vitro*;
8. Multiplicação de animais - No futuro possibilitará a produção *in vitro* de embriões em larga escala a partir de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, recuperados de ovários inteiros ou de fragmentos ovarianos (biopsia), que seriam submetidos aos procedimentos de crescimento, maturação e fecundação *in vitro*;
9. Bem-estar animal - Por se tratar de um modelo exclusivamente *in vitro* para a produção de embriões, a MOIFOPA contribuirá para o bem-estar animal (redução do estresse) pois representará uma alternativa aos procedimentos de superovulação, colheita de embriões, punção de oócitos por ultrassonografia bem como ao uso de animais em experimentos;
10. Desenvolvimento de vacinas - Modelo *in vitro* importante para avaliação da eficiência de anticorpos na destruição/eliminação folicular como etapa preliminar à realização de testes em animais vivos. Este procedimento minimiza o número de animais necessários nos experimentos. As referidas vacinas poderão ser utilizadas em procedimentos e imunoesterilização visando notadamente o controle populacional de caninos e felinos, por exemplo.

Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Em gatas (Jewgenow e Stolte, 1996), gambás (Butcher e Ullman, 1996) e macacas (Fortune *et al.*, 1998), já foi observado o crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies bovina (Gutierrez *et al.*, 2000; McCaffery *et al.*, 2000), ovina (Cecconi *et al.*, 1999), caprina (Huamin e Yong, 2000) e humana (Roy e Treacy, 1993), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (Hirao *et al.*, 1994), com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Wu *et al.*, 2001). Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. Eppig e O'Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Carroll *et al.* (1990) obtiveram também o nascimento de camundongos *in vitro* após congelamento e descongelamento, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos primários. Entretanto, o rendimento referente à produção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais é extremamente baixo e variáveis devido à inadequação dos meios de cultivo disponíveis.

Contribuição do LAMOFOPA nas pesquisas relativas ao ovário artificial caprino

A equipe do LAMOFOPA-FAVET-UECE vem desenvolvendo pesquisas em todas as áreas da



MOIFOPA incluindo isolamento folicular, conservação (resfriamento e criopreservação) e cultivo de FOPA *in vitro*, com ênfase na espécie caprina. Os resultados destas pesquisas resultaram na elaboração de diversos artigos científicos (ver grupo de pesquisa Manipulação de folículos ovarianos na plataforma Lattes do CNPq). Foram desenvolvidos protocolos eficientes para o isolamento (micromanipulação folicular), transporte de ovários (resfriamento) bem como criopreservação de FOPA. Intensos esforços tem sido dispensados no estudo da expressão gênica em folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo de grande importância para nortear testes de substâncias no cultivo de folículos pré-antrais caprinos. No tocante ao cultivo *in vitro*, estabeleceu-se com sucesso um protocolo de base para o cultivo de folículos *in situ* e na forma isolada. A nossa equipe tem obtido grande êxito na ativação de folículos primordiais *in vitro*, bem como no desenvolvimento folicular para estádios mais avançados (primários e secundários) após cultivo *in situ* (*meio de cultivo MFOPA 1*). Além disso, realizamos, com sucesso, o cultivo de folículos secundários isolados (*meio de cultivo MFOPA 2*), obtendo-se taxas formação de antro e sobrevivência folicular superiores a 70%. Um importante avanço realizado pela equipe do LAMOFOPA foi o crescimento de oócitos inclusos em FOPA caprinos até alcançar o tamanho para a retomada da meiose (>110µm), inclusive obtendo-se em alguns casos maturação nuclear completa (placa metafásica e extrusão do primeiro corpúsculo polar).

O sistema de cultivo desenvolvido (meios de cultivo MFOPA 1 e MFOPA 2) permitiu estabelecer o processo tecnológico do ovário artificial caprino, pois após desenvolvimento *in vitro*, conseguimos obter e manter viáveis no cultivo todos os tipos de folículos ovarianos. O referido sistema de cultivo está disponível para indústria farmacêutica visando avaliar em caráter pré-clínico o efeito de drogas sobre oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento (de folículos primordiais até folículos antrais) e constitui uma rotina no nosso laboratório. Além disso, os meios de cultivo desenvolvidos foram eficientes para demonstrar a eficiência de anticorpos anti-zona pelúcida suíno na eliminação de FOPA caninos constituindo-se na primeira etapa para o desenvolvimento de procedimento imunoesterilizante em fêmeas desta espécie.

Considerações finais e perspectivas

O domínio das técnicas de isolamento folicular no âmbito da MOIFOPA em caprinos tem permitido o estudo da expressão gênica de diferentes substâncias e seus receptores implicadas na regulação da foliculogênese inicial.

Ovários podem ser resgastados de locais distantes dos laboratórios de reprodução animal, conservados em meios apropriados durante o transporte, o que tem permitido sua congelação eficiente dos FOPA para a constituição de bancos de germoplasma animal. Entretanto, a transferência tecnológica da MOIFOPA (ovário artificial) para o setor produtivo depende da elaboração de meios de cultivo eficazes (meios dinâmicos) que permitam o crescimento, a maturação e a posterior fecundação dos oócitos oriundos de FOPA. Em caprinos, os resultados obtidos pela nossa equipe são bastante animadores e inéditos, uma vez que se desenvolveu condições *in vitro* para obtenção de oócitos maduros a partir de FOPA, caracterizando o ovário artificial. Entretanto, a taxa de maturação dos oócitos crescidos *in vitro* ainda é muito baixa o que dificulta a produção de embriões *in vitro*. Este fato tem exigido imensos esforços no teste de diversas substâncias isoladamente ou em associação visando elaborar meios específicos de desenvolvimento e maturação.

A utilização da ferramenta da biologia molecular, com intuito de se conhecer a expressão gênica de substâncias regularadoras da foliculogênese de folículos em diferentes períodos do cultivo, nos permitirá estabelecer estratégias para adição de componentes em momentos determinados do cultivo. Desta forma, no futuro, o estabelecimento de meios de cultivo dinâmicos e eficazes possibilitará a produção *in vitro* de embriões em larga escala a partir do desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de animais de interesse zootécnico ou via extinção.

Referências

- Butcher L, Ullmann SL.** Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.535-539, 1996.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG.** Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil*, v.90, p.321-327, 1990.
- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, v.54, p.197-207, 1996.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Org.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. v.1, p.303-327.
- Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V.** Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology*, v.49, p.441-449, 1998.



Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil*, v.100, p.333-339, 1994.

Huamin Z, Yong Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.

Jewgenow K, Stolte M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.183-193, 1996.

McCaffery FH, Leask R, Riley SC, Telfer EE. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biol Reprod*, v.63, p.267-273, 2000.

Roy SK, Treacy BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.

Wu J, Benjamin RE, Carrell DT. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, p.375-381, 2001.
