

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

**EFEITO DA INJÚRIA TECIDUAL DECORRENTE PUNÇÃO
NA MOBILIZAÇÃO FOLICULAR E FERTILIDADE DE
CAMUNDONGOS C57BI6**

MESTRANDA: LUIZA APARECIDA ANSALONI CHAGAS PEREIRA

ORIENTADOR: PAULO HENRIQUE ALMEIDA CAMPOS-JÚNIOR

São João del Rei

2022

LUIZA APARECIDA ANSALONI CHAGAS PEREIRA

**EFEITO DA INJÚRIA TECIDUAL DECORRENTE DA PUNÇÃO NA MOBILIZAÇÃO
FOLICULAR E FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS C57B16**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Morfofuncionais como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais**

Área de concentração: Morfofisiologia

Orientador: Paulo Henrique Almeida Campos-Júnior

São João del Rei

2022

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADEÇO

Às agências de financiamento (CNPq e FAPEMIG) pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal de São João del Rei.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Almeida Campos- Júnior, pelo apoio e orientação ao longo deste trabalho.

À Professora Dr. Flávia Carmo Horta Pinto pela colaboração.

A todos os demais companheiros do Laboratório de Pesquisa em Reprodução.

À coordenação e aos professores do PPGCM.

Aos meus queridos amigos e colegas de turma Matheus Viana e Rafaela de Melo Barreto, que estiveram comigo e me auxiliaram durante este período.

À minha família, minha mãe Ana Lúcia Chagas Pereira, meu pai Júlio César Alves Pereira, minhas tias Maria de Fátima Chagas, Maria de Lourdes Chagas Amaral e ao meu companheiro de vida Thiago Massall de Oliveira Matoba, que sempre me apoiam e nunca me deixam desistir de correr atrás dos meus sonhos.

E à Deus, que guia todos os meus passos.

RESUMO

A demanda pelas técnicas de reprodução assistida têm sofrido considerável aumento na medicina humana e veterinária. Atualmente, a punção de folículos (ovum pick-up) tem sido amplamente utilizada, no entanto, ainda existem lacunas com relação aos seus efeitos na mobilização folicular ovariana e fertilidade. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi, além de padronizar um modelo murino para estudos de punção ovariana, investigar os efeitos da injúria tecidual decorrente do procedimento na foliculogênese e em aspectos da fertilidade de camundongos. Camundongos fêmeas foram divididas em três grupos (Controle, Sham e Punção). Os animais do grupo Punção foram submetidos ao procedimento de punção ovariana, os animais do grupo Sham passaram pelo procedimento de exposição ovariana, mas não foram submetidos à punção. Esses animais foram destinados a análises morfofuncionais. O ciclo estral não foi alterado pelo procedimento ($p > 0,05$). O grupo Punção apresentou maior densidade volumétrica de elementos patológicos. Ao longo do tempo, o processo inflamatório foi resolvido. Houve diferença com relação a quantidade de folículos primordiais ($p = 0,008$) e atrésicos ($p = 0,002$). Através de imunohistoquímica foi possível perceber que a diminuição de 72,7% na quantidade de folículos primordiais está relacionada à maior ativação da reserva folicular ovariana no grupo Punção ($p = 0,0082$) e que a maior taxa de atresia ($p = 0,027$) se relaciona a morte de folículos secundários e antrais ($p = 0,034$). O ensaio de superovulação apontou um menor número de oócitos coletados no grupo Punção ($p = 0,044$), mas a qualidade destes não foi afetada ($P > 0,05$). Por fim, não foram observadas diferenças significativas com relação aos aspectos de fertilidade dos animais ($p > 0,05$). De maneira geral, os resultados indicam que a punção afeta aspectos ovarianos capazes de alterar a mobilização folicular, assim como os aspectos inflamatórios decorrentes dos procedimentos cirúrgicos. No entanto, os animais foram capazes de resolver o processo inflamatório de forma eficaz, sendo que a gestação e os filhotes não foram afetados pela punção. O presente trabalho traz uma nova abordagem para estudos de punção ovariana, além de resultados inéditos relacionados à cinética inflamatória decorrente da punção e abre um grande campo para novas pesquisas.

Palavras-chave: punção ovariana, modelo murino, aspectos anatomopatológicos, mobilização folicular, fertilidade.

ABSTRACT

The demand for assisted reproduction techniques has increased considerably in human and veterinary medicine. Currently, ovarian puncture has been widely used, however, there are gaps in the literature related to the effects on ovarian follicular mobilization and fertility. In this scenario, the aim of the present study was, beyond standardizing a murine model for studies of ovarian puncture, to investigate the effects of tissue injury resulting from this procedure on ovarian follicular mobilization and on aspects of fertility in mice. Female mice were divided into three groups (Control, Sham and Puncture). The animals from the Puncture group were experimentally punctured, animals from the Sham group were to the ovarian exposure, without puncture. These animals were destined to morphofunctional analyses. The estrous cycle was not altered by the procedure ($p > 0.05$). The Puncture group had a higher volumetric density of pathological elements and, with time, the inflammatory process was resolved in both groups. There was a difference in the amount of primordial ($p = 0.008$) and atretic ($p = 0.002$) follicles. Through immunohistochemistry, it was possible to notice that the 72.7% decrease in the number of primordial follicles was related to greater activation of the ovarian follicular reserve in the Puncture group ($p = 0.0082$) and that the highest rate of atresia ($p = 0.027$) was related to the death of secondary and antral follicles ($p = 0.034$). The superovulation assay showed a smaller number of oocytes collected in the Puncture group ($p = 0.044$), but their quality was not affected ($P > 0.05$). Finally, no significant differences were observed regarding the fertility aspects of the animals ($p > 0.05$). In general, our results indicate that the ovarian puncture modifies the follicular mobilization, as well as the inflammatory aspects resulting from the surgical procedures. However, the animals were able to solve these aspects effectively, and the pregnancy and the offspring were not affected by the puncture. This study is of great scientific value, as in addition to bringing a new approach to ovarian puncture studies, it brings unprecedented results related to the inflammatory kinetics resulting from the puncture and opens a large field for new research.

Keywords: ovarian puncture, murine model, anatomopathological aspects, follicular mobilization, fertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	14
Figura 2	28
Figura 3	29
Figura 4	29
Figura 5	35
Figura 6	35
Figura 7	35
Figura 8	35
Figura 9	36
Figura 10	37
Figura 11	37
Figura 12	37
Figura 13	38
Figura 14	38
Figura 15	38
Figura 16	38
Figura 17	39
Figura 18	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	28
Tabela 2	28
Tabela 3	30
Tabela 4	35
Tabela 5	35

SUMÁRIO

Introdução	10
Revisão da Literatura	12
Ovários: caracterização morfofuncional	12
Foliculogênese	13
Controle hormonal e parácrino da foliculogênese	14
Ovário, inflamação e reparo	18
Punção ovariana em mulheres	20
Punção ovariana em animais	22
Objetivos	26
Objetivo geral	26
Objetivos específicos	26
Material e métodos	28
Padronização do modelo	28
Biometria	28
Dinâmica do ciclo estral	29
Cinética inflamatória	29
Imunofluorescência	30
População e mobilização folicular	30
Morfometria	31
Imunohistoquímica	31
Atresia	32
Superovulação e coleta de oócitos	32
Ensaio de fertilidade	33
Análises estatísticas	33
Resultados	35
Padronização do modelo	35
Biometria e ciclo estral	35
Cinética inflamatória	35
Efeito da punção na mobilização folicular	37
Efeito da punção da fertilidade	38
Discussão	41
Conclusão	50
Referências	52

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os ovários são órgãos altamente complexos e desempenham funções relacionadas a diferentes sistemas dentro do organismo. Sua formação e os processos reprodutivos associados, desde a ativação folicular até as fases de ovulação dependem de inúmeras vias metabólicas e fatores de transcrição diversos, que atuam de diferentes formas no intuito de proporcionar a fertilidade das fêmeas (LIU *et al.*, 2019; FORD *et al.*, 2020). A área da reprodução assistida, tanto em humanos quanto em animais, tem crescido exponencialmente ao longo dos anos. Tal fato se relaciona, respectivamente, ao adiamento da maternidade e ao crescimento do mercado da reprodução animal (CROWE *et al.*, 2021).

A punção ovariana tem sido amplamente utilizada no campo da reprodução assistida, tanto em humanos (D'ANGELO *et al.*, 2019) como em animais (SILVA *et al.*, 2019). De acordo com a literatura existente, esta técnica pode ser responsável por aumentar a contagem folicular e resultar em uma melhora na resposta em procedimentos posteriores de fertilização *in vitro*, principalmente em mulheres com síndrome do ovário policístico (PSOC); o que pode melhorar consideravelmente as taxas de nascidos vivos (HATIRNAZ *et al.*, 2019). Ainda existem lacunas sobre o real efeito da técnica previamente citada na mobilização ovariana e nos processos inflamatórios ovarianos associados ao procedimento. Não são conhecidos os fatores responsáveis pelo aumento do recrutamento/contagem oocitária pós-punção e também existem poucos trabalhos que relacionem o processo inflamatório causado pelo procedimento aos fenômenos relacionados à alteração da mobilização folicular, ovulação e fertilidade.

Tanto em humanos quanto em animais a técnica de "*ovum-pick-up*" é *amplamente* utilizada e oferece uma abordagem menos invasiva comparada às técnicas utilizadas anteriormente, mas pouca importância é dada aos seus potenciais efeitos deletérios (SILVA *et al.*, 2019). Camundongos não são utilizados para estudos dessa área devido ao pequeno

Introdução

tamanho e conseqüente dificuldade de manipulação (GOMEL, 2019). Por outro lado são de fácil manuseio e possuem rápida reprodução, além de ser o modelo abundantemente utilizado na pesquisa básica.

Nesse sentido, torna-se necessário estudar os efeitos da injúria tecidual no funcionamento do ovário, além de padronizar o modelo murino para estudos de punção ovariana. Dessa forma, a partir da hipótese de que a punção ovariana acarreta em adaptações morfofuncionais que alteram a mobilização folicular ovariana murina, o presente trabalho abre portas para a criação de novas abordagens terapêuticas nesse ramo da ciência.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Ovários: caracterização morfofuncional

Ao atingir a 4ª semana de gestação, a formação ovários tem início a partir do desenvolvimento das cristas gonadais, que começam a se formar a partir de um espessamento do epitélio celômico na região ventral do mesonefro, uma de cada lado do embrião. Tal evento requer a ação de diferentes fatores de transcrição, como *GATA binding protein 4* (GATA4), *Zinc Finger Protein FOG Family Member 2* (FOG2), *Wilms Tumor 1* (WT1), *Splicing factor 1* (SF1), *LIM Homeobox Protein 9* (LHX9) e *Empty Spiracles Homeobox 2* (EMX2), o que resulta além da proliferação, em modificações fenotípicas. Para permitir que as células germinativas primordiais (PGCs) - provenientes do saco vitelínico - e as células mesenquimais penetrem no epitélio em proliferação, a lâmina basal das células mesonéfricas passam por um processo de remodelamento, controlado principalmente, por GATA4. Além disso, há a necessidade de um suprimento vascular necessário para o desenvolvimento ovariano, o que torna o primórdio ovariano constituído por duas populações de células somáticas (LIU *et al.*, 2019).

A migração das PGCs ocorre por meio de alterações no citoesqueleto que promovem um movimento amebóide. Em humanos, tem início na 5ª semana de gestação e ocorre através do intestino primitivo em direção ao mesonefro (dorsal) e para as cristas gonadais (lateral) (NICHOLLS *et al.*, 2019). Ao longo da migração essas células se proliferam, e ao colonizar as cristas gonadais resultam na diferenciação sexual, sendo que a formação dos ovários se dá devido a expressão de *WNT family member 4* (WNT4), *Catenin Beta 1* (CTNNB1), *R-Spondin 1* (RSPO1), *Follistatin* (FST) e *Synaptonemal Complex Protein 3* (SYCP3). Ao atingir as cristas gonadais, as PGCs dão origem a oogônias, caracterizadas por uma taxa de proliferação muito mais intensa, dependente da expressão de *WNT Family member 1* (WNT1) pelas células somáticas (KANAMORI *em al.*, 2019).

Tendo ocorrido a formação da crista gonadal e a diferenciação da gônada bipotencial, o estroma mesonéfrico penetra o ovário primordial por meio da expressão do fator de transcrição *Nuclear Receptor subfamily 2, group*

F, member 1 (COUP-Tfil) e dá origem a regiões de estroma intercaladas às células germinativas denominadas cordões ovígeros. Esses cordões são separados do restante do estroma ovariano por uma lâmina basal composta principalmente por laminina e colágenos dos tipos IV e XVIII. A formação dos cordões ovígeros resulta na regionalização do ovário em córtex e medula através da expressão de *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP2), *LY6/PLAUR Domain Containing 6* (LYPD6) e *Membrane Associated Guanylate Kinase* (MAGI2) pelas células que irão compor a região cortical e WNT4 e FST pelas células medulares (MONNIAUX, 2018). A medula é formada por vasos linfáticos, vasos sanguíneos de maior calibre e tecido conjuntivo e a região cortical é composta pelos cordões ovígeros e um estroma vascularizado (WAGNER *et al.*, 2020). A meiose das células germinativas é desencadeada pela ação do ácido retinóico produzido no mesonefro (ISHIGURU *et al.*, 2020). Dessa forma, a maturação dos oócitos e formação dos folículos primordiais ocorre a partir da região mais basal dos cordões ovígeros (HUMMITZSCH *et al.*, 2013). Em camundongos, os precursores da gônada bipotencial expressam Wnt, para diferenciação ovariana, a partir do dia embrionário 11,5 (E 11,5), sendo que as PGCs começam a colonizar a gônada em E 12,5 através de duas ondas que se diferenciam pelos fatores de expressão Foxl2 e Lgr5, respectivamente (NIU & SPRADLING, 2020).

A reserva folicular ovariana é definida pela quantidade de folículos primordiais presentes nos ovários e é pré-definida ainda na vida intrauterina (RODRIGUES *et al.*, 2021). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento ovariano, as oogônias são altamente proliferativas e atingem aproximadamente a contagem de 6.800.000 em humanos até a 20^a semana de gestação (BAKER, 1963); 2.700.000 em vacas até do 110^o dia pós coito e 15.000 em camundongos até 20^o dia de gestação (ERICKSON, 1966). No entanto, devido a diminuição das taxas de proliferação e ao aumento da morte celular, a quantidade de células germinativas pode ser reduzida em até 90%. Em ratos e humanos ocorrem três ondas de morte celular, mediadas pela ação do regulador de apoptose BCL2. A primeira onda inclui oogônias que estão em processo de mitose, a segunda e a terceira onda incluem as células passando por processo meiótico, respectivamente em estágio de paquíteno e diplóteno (KIRILLOVA *et al.*, 2021).

2.2. Foliculogênese

Os folículos ovarianos representam a unidade funcional do sistema reprodutor feminino. Estes são compostos pelo oócito e células da granulosa, que crescem, se proliferam e sofrem modificações tanto morfológicas quanto fisiológicas ao longo do ciclo reprodutivo (RIMON-DAHARI *et al.*, 2016). A foliculogênese é um processo complexo e altamente coordenado, através do qual um folículo ovariano cresce e se desenvolve, promovendo a maturação do oócito até que seja ovulado e ocorra a formação do corpo lúteo. O processo é dependente de intensa comunicação entre as células somáticas e germinativas. Tal comunicação envolve fatores autócrinos, parácrinos e hormonais que agem desde o início da formação dos folículos e refletem em aspectos reprodutivos posteriores, como ovulação, fecundação e implantação; garantindo a fertilidade feminina (GERSHON & DEKEL, 2020).

Durante o ciclo reprodutivo os folículos crescem e se desenvolvem através de mecanismos que envolvem diferentes sistemas do organismo. Além da ação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrógeno e progesterona, o funcionamento adequado dos ovários e o desenvolvimento folicular dependem de uma gama de fatores de transcrição e crescimento, além de citocinas atuando de maneira autócrina e parácrina, como *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), hormônio anti-mülleriano (AMH), ativinas e inibinas. Estes são expressos no ovário, e desempenham funções essenciais relacionadas à foliculogênese. Atualmente, vários estudos têm demonstrado a importância da ação de diferentes tipos de BMPs produzidos localmente na formação das células germinativas e funções ovarianas (KHAN *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2017).

2.2.1. Controle hormonal e parácrino da foliculogênese

As fases da foliculogênese (Figura 1) se diferem devido aos mecanismos que as controlam: a fase pré-antral é controlada por fatores autócrinos e parácrinos enquanto a fase antral é controlada, além desses, por fatores endócrinos, devido principalmente ao início da expressão de receptores de gonadotrofinas e formação da vascularização que permitem a ação

hormonal (GERSHON & DEKEL, 2020).

Os folículos primordiais constituem a reserva folicular ovariana, que é conhecida por ser pré-determinada durante a embriogênese e é constituída pela quantidade e qualidade dos folículos primordiais (MOOLHUIJSEN & VISSER, 2020). Estes folículos são transcricionalmente quiescentes devido à ação do fator inibidor de maturação, que faz com que o oócito primário permaneça em prófase I e ao longo da vida da fêmea são ativados em grupos de 6 a 12. A ativação ou recrutamento de folículos primordiais necessita do funcionamento correto e coordenado de diferentes fatores de transcrição. Um dos maiores paradigmas da foliculogênese está no fato de apenas alguns folículos serem ativados e a ativação ocorrer em momentos específicos. O mecanismo que melhor explica o modo como os folículos primordiais são recrutados é a sinalização intracelular (STRACZYNSKA *et al.*, 2022).

A via PI3K/AKT regula o metabolismo celular, proliferação, crescimento e sobrevivência através da regulação da transcrição de genes e síntese proteica. Tal via funciona da seguinte forma: receptores de tirosina kinase (RTKs) transformam o peptídeo de membrana PIP3 em PI3K que, por sua vez, ancora fosfoinosítido dependente de quinase (PDK1) que ativa proteína quinase B (AKT). AKT atua em diferentes tipos de fatores de transcrição e repressão, como o *Forkhead Box O3* (FOXO3) (ZHANG & LIU, 2015). FOXO3 é um importante repressor transcricional que atua como um freio da ativação folicular e encontra-se tanto no núcleo como no citoplasma de folículos primordiais e primários, mas não nos folículos em estágios mais avançados do desenvolvimento (DING *et al.*, 2015). A via PTEN-AKT-FOXO3 tem se mostrado como um importante mecanismo associado à ativação folicular. Quando ocorre ativação de folículos primordiais (JOHN *et al.*, 2008), FOXO3 é translocado do núcleo para o citoplasma, dessa forma, a translocação desse fator de transcrição pode ser utilizada como marcador de ativação folicular. Estudos recentes avaliaram o efeito da curcumina com relação a ativação folicular e perceberam que ela é capaz de reduzir a taxa de ativação folicular através da redução da translocação de FOXO3 (LV *et al.*, 2021).

A importância da via PI3K/AKT na ativação folicular foi elucidada através da deleção de PTEN, um antagonista de RTKs, que desfosforila PIP3 e causa o desancoramento de PDK1, o que resulta na ativação de massa da reserva

folicular e consequente falência ovariana prematura (ZHANG *et al.*, 2018). A via mTOR é responsável por promover síntese proteica por meio da fosforilação das maquinarias de tradução *mammalian target of rapamycin complex* (mTORC1 e 2), atua principalmente em genes como o *Eukaryotic translation initiation factor 4E* (4E-BP1) e *ribosomal protein S6 kinase B1* (S6K1), os quais são utilizados como indicadores de ativação da via. A deleção de *Tuberous Sclerosis 1 Protein* TSC1 ou 2, por sua vez, provoca ativação global de folículos primordiais. Além disso, a ação de mTOR é positivamente regulada por PI3K/AKT através da inativação de seus inibidores TSC1 e TSC2 (CHEN *et al.*, 2015).

A diferenciação das células da granulosa é um fator importante tanto para a ativação como para a viabilidade folicular. Estas células sintetizam ligantes e sinais extracelulares que controlam e coordenam as cascatas intracelulares necessárias para o processo de recrutamento, como a via JAK/STAT3 (FROST *et al.*, 2020), a via mTOR que, dentro das células da granulosa, atua na manutenção da quiescência folicular, além de GATA4 e GATA6, importantes fatores de transcrição que atuam em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular (ZHANG e LIU, 2015). A partir da ativação folicular há um aumento da atividade mitótica das células da granulosa, fazendo com que elas adquiram um formato cuboidal e ocorre a deposição, pelo oócito, de uma matriz proteica dando origem a zona pelúcida, o que caracteriza o folículo primário (MONNIAUX *et al.*, 2014).

Logo após o recrutamento, os oócitos dos folículos primordiais passam a produzir *Growth Differentiation Factor 9* (GDF9) e BMP15, ligantes da família *Transforming Growth Factor* (TGF-B), cuja ação está associada à proliferação das células da granulosa (FROST *et al.*, 2020). A formação dessas novas camadas de células da granulosa é coordenada através de vias de sinalização e necessita ser minuciosamente regulada com a expansão do oócito e com a diferenciação das células da teca (GEBREMEDHN *et al.*, 2016). Dessa forma, os folículos secundários são morfologicamente caracterizados por apresentar duas ou mais camadas de células da granulosa, formadas devido a uma intensa multiplicação dessas células, que secretam três tipos de ligantes da família TGF-B (1-3), os quais atuam de maneira parácrina, além de activina e inibina, hormônios que regulam o feedback relacionado ao eixo

hipotálamo-hipofisário-gonadal a partir da liberação de FSH (GERSHON & DEKEL, 2020).

Os folículos secundários e antrais iniciais são caracterizados por um grande aumento da transcrição de receptores de FSH nas células da granulosa, o que torna estes folículos altamente responsivos ao hormônio folículo estimulante (GERSHON & DEKEL, 2020). É nesse momento que tem início a indução hormonal da foliculogênese, sob essa influência, o ciclo de divisão celular que duraria normalmente 7 dias passa a ser realizado em apenas 24 horas (SKORY *et al.*, 2015). Assim, os folículos continuam a crescer e pequenos acúmulos de fluido são formados entre as camadas de células da granulosa. Esses acúmulos crescem e se agregam, formando uma cavidade única, o antro folicular. Quando ocorre a formação do antro, o oócito aumenta ainda mais seu volume e, ainda sob ação do FSH, as células da granulosa sofrem modificações na expressão genética, o que torna os folículos responsivos ao LH e capazes de sair do bloqueio meiótico para que possam ser ovulados e posteriormente fertilizados (GERSHON & DEKEL, 2020).

Cerca de 99% dos folículos sofrem atresia e este evento é necessário para a manutenção da saúde reprodutiva (MENG *et al.*, 2018) e pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento folicular, sendo que os folículos em fases iniciais do desenvolvimento entram em apoptose e são reabsorvidos, enquanto os folículos secundários e antrais sofrem um processo de morte celular dependente de hormônios (ZHANG *et al.*, 2019).

A apoptose cessa o crescimento folicular a partir de sinais extracelulares e respostas intracelulares e depende do balanço entre fatores anti e pró-apoptóticos. Dentre os principais fatores associados à atresia dos folículos estão o *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α), expresso tanto no oócito quanto nas células da granulosa, esse fator de transcrição ativa enzimas esfingomielinase e resulta na formação de ceramida, um segundo mensageiro de base lipídica. A formação de ceramida pode ocorrer também por diferentes fatores de estresse externos, como a radiação, e induzir a apoptose (LUAN *et al.*, 2019).

Além de TRAIL (ligante indutor de apoptose associado a TNF- α) e proteínas da família BCL 2 (reguladores de apoptose), o receptor Fas é outra importante molécula que contém um domínio associado à morte celular (GONSIOROSK *et al.*, 2020). A ativação desse sistema desempenha papel

importante no início do processo apoptótico das células foliculares tanto somáticas como germinativas (ZHANG *et al.*, 2019). A interleucina 6 (IL-6), por sua vez, é produzida por células da granulosa e induz a fragmentação do DNA. Além disso, através de receptores hormonais específicos nas células da granulosa e da teca, o peptídeo regulador do GnRH é capaz de inibir a diferenciação celular e causar atresia (LI *et al.*, 2020). De maneira geral, todos esses sinais atuam na ativação de caspase 3 através de diferentes vias pró-apoptóticas, o que resulta em fragmentação do material genético (DA SILVA BITECOURT *et al.*, 2018). Os hormônios androgênicos, ao contrário dos estrógenos são capazes de promover atresia, sendo que folículos atrésicos apresentam uma redução da atividade da aromatase e conseqüente diminuição da produção de estrógeno e aumento da síntese androgênica, de forma que bloqueadores de receptores de andrógenos funcionam como inibidores de atresia (FRANKS & HARDY, 2018).

2.3. Ovário, inflamação e reparo

Ao longo da vida das fêmeas, à medida que os folículos vão sendo ovulados ocorre uma redução tanto da quantidade como da qualidade dos folículos remanescentes, o que caracteriza o envelhecimento ovariano (FOLEY *et al.*, 2021). Inflamação e fibrose são observadas em ovários de camundongos em idade reprodutiva avançada através do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1B e TNF-a e do aumento de fibras colágenas do tipo I e II. Estudos apontam que casos de aneuploidia e não disjunção meiótica podem estar associados a uma redução da qualidade oocitária, devido ao fato destes processos afetarem negativamente os gametas (BRILEY *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020).

De maneira geral, o processo inflamatório é caracterizado como uma resposta fisiológica dos tecidos vivos à lesão ou infecção e diferentemente da resposta imune, não possui memória. Ele depende da ação de diferentes mediadores biológicos, responsáveis por desencadear processos bioquímicos que irão recrutar células inflamatórias responsáveis pela remoção do agente causador da inflamação e o processo de reparo do tecido acometido. (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018). A inflamação é diferenciada em aguda e crônica com base no tempo e nos tipos celulares encontrados, sendo a inflamação

aguda caracterizada pela presença de células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos, permanece por mais de algumas semanas, passa a ser considerada crônica, e começa a apresentar linfócitos e monócitos (CASTANHEIRA & KUBES, 2019).

Citocinas são moléculas glicoproteicas de baixo peso molecular responsáveis pela comunicação celular autócrina e parácrina, agem de maneira aditiva, sinérgica ou inibitória e desempenham importante papel pró e anti-inflamatório. Assim como diferentes tipos celulares podem produzir uma mesma citocina, uma citocina pode desencadear diferentes respostas e citocinas diferentes podem possuir a mesma atividade. Além de também serem capazes de se unirem para gerar efeitos sinérgicos em uma mesma célula (ROWLEY *et al.*, 2020).

As células inflamatórias são recrutadas para o local da injúria através de um processo denominado quimiotaxia, cuja base está na diferença do gradiente de concentração das quimiocinas. Produzidas principalmente por leucócitos e células endoteliais existem cerca de 30 tipos de citocinas quimioatraentes, estas são divididas em C-C que atraem monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos e C-X-C, que atraem neutrófilos (ABDULKHALEQ *et al*, 2018).

O processo inflamatório pode ser dividido em etapas. Inicialmente ocorre a resposta vascular através de aminas vasoativas, serotonina e histamina as quais causam dilatação vascular e consequente hiperemia. Mais tardiamente ocorre a ação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos que também são substâncias vasodilatadoras. Além disso, durante o processo inflamatório ocorre uma modificação no citoesqueleto das células endoteliais dos vasos locais, o que resulta na perda de junções celulares, aumenta a permeabilidade vascular e permite a saída do exsudato inflamatório, líquido protéico existente em diferentes composições, responsável pela diluição e drenagem de toxinas bacterianas e por promover um meio fluido para a movimentação de citocinas e células inflamatórias (MEDZHITOV, 2021).

A resposta celular ocorre devido a um processo complexo denominado diapedese, passagem pelo epitélio vascular que depende de uma série de moléculas de adesão para que ocorra a interação entre as células endoteliais e inflamatórias, captura, rolamento, ligações fracas, ligações de alta afinidade e posterior transmigração (GAUDET *et al.*, 2019). Os leucócitos expressam

integrinas, proteínas transmembrana sintetizadas a partir da ação de citocinas quimio atrativas, já as células endoteliais, expressam selectinas (P, E e L) e ligantes de integrina através de cascatas intracelulares estimuladas pela ação de toxinas microbianas, citocinas (IL-1 e TNF- α) e histamina (SCHOPPMAYER & BUUL, 2021).

Para que o processo inflamatório seja concluído é necessário que ocorra o reparo, que atinge seu resultado ótimo quando ocorre a substituição do tecido lesado por células com a mesma anatomia e fisiologia das células do tecido saudável. A regeneração depende da presença de células tronco no tecido lesado, as quais possuem receptores de superfície de membrana capazes de responder a citocinas pró-inflamatórias e dar início à diferenciação e proliferação celular. No entanto, nem todos os tecidos são capazes de regeneração, dessa forma, pode ocorrer a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo através de uma resposta fibroproliferativa e deposição de colágeno. A cicatrização ocorre por meio da angiogênese pela ação de VEGF e angiopoetina; fibroplasia pela ação de diferentes fatores de crescimento como TGF- β ; IL-1 e TNF e remodelação, promovida por metaloproteinases (OISHI & MANABE, 2018).

A literatura relacionada à inflamação ovariana causada por punção associada à mobilização folicular ainda possui lacunas. Um trabalho recente demonstrou, em camundongos, o uso de células mesenquimais (MSCs) como tratamento para síndrome do ovário policístico (PCOS). Xie e colaboradores (2019) mostraram que tal técnica é responsável por diminuir os fatores pró-inflamatórios existentes no ovário policístico e aumentar fatores inibidores de inflamação, como a interleucina 10 (IL-10). Dessa forma, devido ao fato da inflamação representar papel importante na patogênese da síndrome, o tratamento pode promover uma melhora considerável no quadro da doença. Nesse sentido, podemos assumir a hipótese de que a injúria física causada pelo procedimento de punção ovariana acarreta em inflamação local, assim como relatado por Xie et al (2019) no modelo de PCOS. O que leva o sistema imune a produzir e direcionar maior número de fatores anti-inflamatórios para o órgão, os quais podem ser, direta ou indiretamente, responsáveis pelo aumento da contagem oocitária pós-punção.

2.4. Punção ovariana em mulheres

Os procedimentos de punção ovariana têm sido utilizados desde a década de 80 e foi uma alternativa viável, principalmente para mulheres com PCOS. Atualmente a recuperação oocitária através de aspiração guiada por ultrassom é uma das técnicas de preferências das clínicas de fertilização e são realizadas com baixo risco de complicação. Para a maturação de oócitos *in vitro* (MIV), gametas imaturos presentes em pequenos folículos antrais são puncionados. Dessa forma, a MIV pode ser realizada com exposição prévia a gonadotrofinas reduzida (WALLS & HART, 2018). A punção de folículos grandes é realizada de maneira semelhante no cotidiano da fertilização *in vitro*. Nesse caso é necessário que a mulher passe por um processo de estimulação ovariana com gonadotrofinas para crescimento e formação de folículos pré-ovulatórios. A partir do 4º dia de aplicação hormonal, já é possível observar o crescimento de 1 ou 2 folículos (com mais de 4 mm de diâmetro). A partir disso, sob sedação e guiada por ultrassom endovaginal, o fluido folicular pode ser aspirado através de uma bomba de vácuo acoplada a uma agulha de calibre 17. Acredita-se que, devido ao fato deste procedimento provocar a aspiração do fluido antral que é rico em hormônios esteróides, faz com que os níveis circulantes destes hormônios sejam reduzidos, o que interfere nos picos endógenos de LH e elimina a inibição de folículos menores por folículos dominantes. Isso afeta positivamente o desenvolvimento de folículos remanescentes e otimiza as taxas de maturação oocitária e gravidez em procedimentos posteriores (WANG *et al.*, 2019).

Devido ao fato de ser um procedimento pouco invasivo e de baixo risco, a punção ovariana pode ser realizada mais de uma vez em mulheres, enquanto houver reserva folicular (SHEN *et al.*, 2019). Um dos principais riscos associados ao procedimento repetitivo de punção de folículos grandes é o desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS), caracterizada por alterações da permeabilidade capilar, mediada principalmente por VEGF. No entanto, tal síndrome não está diretamente relacionada ao procedimento de punção ovariana em si, mas à estimulação hormonal associada (NAMAVAR *et al.*, 2018). Dentre outros riscos associados a punção, apesar de baixos, podem ser citados sangramento intra-abdominal,

hematoma de bexiga e infecções, que não devem deixar de ser reportados e devem ser levados em consideração devido ao fato de complicações associadas poderem levar a morte (D'ANGELO *et al.*, 2019).

Por outro lado, apesar de representar baixo risco à aquisição de OHSS, as taxas de nascidos vivos a partir da MIV ainda são muito baixas (ORTEGA-HREPICH *et al.*, 2018; HATIRNAZ *et al.*, 2019). Pouco se sabe sobre os efeitos da coleta oocitária através da punção folicular. A literatura existente aponta relação entre a punção folicular e os níveis de hormônio anti-mülleriano (AMH), melhor indicador de reserva folicular ovariana (MARSCHALEK *et al.*, 2019). Vários estudos relacionam cirurgias ovarianas invasivas com uma redução nos níveis circulantes de AMH (CHANG *et al.*, 2016 & IWASE *et al.*, 2010). Alguns autores relatam que tal diminuição depende da extensão dos danos causados pelo procedimento (IWASE *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2011) e outros que qualquer tipo de dano ovariano causa perda folicular e consequente diminuição de AMH (AMER *et al.*, 2017). Por outro lado, Marschalek e colaboradores (2019) não encontraram redução significativa nos níveis de AMH depois de repetidas punções em respondedoras normais com uma média de recuperação oocitária de 6 (4 a 10 óocitos). No entanto, os níveis de AMH foram reduzidos em mulheres com PCOS, o que pode estar relacionado a um maior dano ovariano devido a uma maior quantidade de punções a cada procedimento (HATIRNAZ *et al.*, 2019).

Há estudos que associam a recuperação oocitária repetida com uma maior quantidade de óocitos e embriões maduros em ciclos posteriores de MIV/FIV, o que pode ser explicado pela hipótese de que as punções foliculares podem ser capazes de melhorar características endócrinas de pacientes, principalmente com ovários policísticos (AGDI *et al.*, 2010; ORTEGA-HREPICH *et al.*, 2018). Segundo Farquhar e colaboradores (2012), a punção ovariana tem se mostrado uma promissora linha alternativa de tratamento para mulheres com PCOS no intuito de induzir a ovulação. Dessa maneira, é provável que as recuperações repetitivas de óocitos por punção tenham efeito semelhante na reserva folicular ovariana (MARSCHALEK *et al.*, 2019).

A hipótese é de que o mecanismo de ação da punção esteja relacionado às alterações endócrinas pós-cirúrgicas, associadas tanto ao dano físico associado à injúria tecidual quanto à aspiração do fluido folicular. Tais

alterações, por sua vez, resultam em modificações do microambiente no interior dos folículos dominantes e acabam por reaproximar as concentrações hormonais a níveis normais, melhorando distúrbios do mecanismo de retroalimentação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Dessa forma, o recrutamento folicular, a maturação e a subsequente ovulação ocorram devido a efeitos hormonais locais e sistêmicos.

2.5. Punção ovariana em animais

A punção ovariana transvaginal guiada por ultrassom ou “*ovum-pick-up*” teve início em 1983 e, atualmente, é realizada de maneira mais abundante em bovinos, devido ao fato de ser um mercado mundialmente muito importante. A técnica de punção guiada por ultrassom foi de grande inovação, devido à necessidade da criação de procedimentos menos invasivos e por possuir resultados tão positivos quanto ou até melhores que as técnicas previamente adotadas (ROWLEY *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2019). Em bovinos a punção ovariana é realizada através da utilização de um ultrassom intravaginal, utilizando agulhas de calibre 20 com 0,9mm x 50mm de diâmetro e uma bomba de vácuo e os folículos com diâmetro maior que 3mm são aspirados (VIANA *et al.*, 2010).

As consequências associadas ao procedimento repetitivo na grande maioria das vezes não é levada em consideração. Porém, estudos realizados apresentaram alterações na dinâmica e mobilização folicular significativa e correlacionada ao número de punções realizadas. Quando submetidas a sucessivas sessões de punção ovariana, ocorre modificação relacionada tanto ao número quanto aos estágios de desenvolvimento dos folículos antrais e intervalos curtos entre as aspirações resultam em uma grande recuperação oocitária e de boa qualidade (VIANA *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2010).

Com relação a ratos e camundongos, devido ao pequeno porte, não há um método para punção ovariana guiada por ultrassom. Para técnicas de reprodução assistida murina, os oócitos são coletados através de laparotomia após eutanásia dos animais. Para este procedimento os animais são posicionados em decúbito lateral, são tricotomizados e a limpeza asséptica é realizada. A partir da localização da região do flanco, é realizada uma incisão vertical de aproximadamente 3 cm de comprimento, com o auxílio de um

bisturi, para que o ovário possa ser exposto (BARROS *et al.*, 2014). A laparotomia ovariana para estudos reprodutivos em ratos e camundongos tem sido utilizada desde a década de 60 e até hoje não existem muitas técnicas inovadoras relacionadas ao aspecto murino (GOMEL, 2019). Como os camundongos representam um modelo de fácil manuseio e manutenção, além de rápida reprodução, o presente trabalho abre portas no campo de estudo da FIV, ao que se diz respeito ao desenvolvimento de novas técnicas para estudos reprodutivos nesses animais.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da injúria tecidual decorrente da punção na dinâmica folicular ovariana e em aspectos da fertilidade de camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- Padronizar um modelo que mimetize a punção ovariana em camundongos;
- Acompanhar parâmetros biométricos dos animais;
- Verificar o efeito da punção ovariana no ciclo estral murina;
- Realizar uma investigação anatomopatológica temporal nos ovários submetidos a esse procedimento;
- Analisar os efeitos da punção ovariana na população e mobilização folicular;
- Avaliar a influência da punção ovariana na resposta superovulatória de camundongos;
- Analisar o efeito da punção ovariana na fertilidade feminina murina.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Padronização do modelo

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 6 semanas de idade e machos de fertilidade conhecida (10 semanas de idade) provenientes do Núcleo de Criação de Animais de laboratório da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) foram obtidos e mantidos em fotoperíodo 12:12h em temperatura controlada (22 °C a 24°C) recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de São João del Rei (CEUA UFSJ), conforme o protocolo número 029/2019. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (Controle, SHAM e Punção). O número de animais por grupo referente a cada experimento encontra-se especificado nas tabelas 1 e 2.

Os animais do grupo Punção foram anestesiados com anestesia inalatória conforme descrito previamente (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Em seguida, foram posicionados em decúbito lateral (direito e esquerdo) para tricotomia e limpeza asséptica da pele (com benedito e etanol 70%) imediatamente antes da cirurgia. Ambos os ovários foram expostos e foram realizadas 10 perfurações com agulha de acupuntura (calibre 0,25 mm). Posteriormente, os ovários foram retornados a sua posição anatômica. Os animais do grupo Sham também foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano (NASCIMENTO *et al.*, 2021), e foram posicionados em decúbito lateral (direito e esquerdo) para tricotomia e limpeza asséptica da pele (com benedito e etanol 70%) imediatamente antes da cirurgia. Ambos os ovários foram expostos e reposicionados. Por sua vez, os animais do grupo controle não foram expostos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico (Figura 2).

4.2. Biometria

Para análise dos parâmetros biométricos, os animais foram pesados através da utilização de uma balança analítica e fita métrica. Foi obtida a tara da balança com relação ao béquer no qual os animais foram inseridos.

4.3. Dinâmica do ciclo estral

A avaliação da dinâmica do ciclo estral foi realizada após o procedimento de punção por meio de esfregaços vaginais coletados através da utilização de um swab improvisado e embebido em solução salina fisiológica à temperatura ambiente. O palito com algodão foi inserido na vagina do camundongo contido e gentilmente girado contra a parede vaginal e posteriormente removido. As células obtidas foram transferidas para uma lâmina de vidro seca através do rolamento do palito com algodão sobre a lâmina e fixadas com 50 µL de metanol por 2 a 5 min até secar. Posteriormente, a lâmina foi embebida em corante Giemsa por 15 minutos. A lavagem das lâminas foi realizada com água da torneira através de três banhos consecutivos. Após 24h foram analisadas ao microscópio óptico em ampliação de 400x sob iluminação de campo claro. O estágio do ciclo estral foi determinado com base na presença ou ausência de leucócitos, células epiteliais cornificadas e células epiteliais nucleadas (Figura 3) de acordo com Byers et al (2012). A análise da duração do ciclo foi realizada através da observação e contagem do tempo que os animais demoraram entre um Proestro e o próximo antes e depois do procedimento cirúrgico. Para analisar a frequência de dias em cada fase foram contados quantos dias cada animal passou ou se manteve em cada uma das fases do ciclo estral antes e depois da punção ovariana.

4.4. Cinética Inflamatória

Os animais dos grupos Sham e Punção foram divididos em subgrupos de 3h, 24h, 48h e 96h a partir da cirurgia e os ovários foram submetidos à análise anatomopatológica (Figura 4). Os ovários coletados para este procedimento foram pesados e fixados em solução de Paraformaldeído 4%, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol, incluídos em Paraplast (*Sigma-Aldrich*) e seccionados em micrótomo (5 µm). Os cortes histológicos foram desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina-eosina. Após a montagem e secagem das lâminas, estas foram

analisadas em microscópio óptico utilizando objetivas de 4x, 10x e 40x. Posteriormente, as lâminas foram examinadas com o auxílio da patologista Profa. Dra. Flávia Carmo Horta Pinto, de acordo com os elementos descritos na Tabela 3.

4.4.1. Imunofluorescência

Para a realização da imunofluorescência F4/80 para marcação de macrófagos foram utilizados dois cortes do grupo Punção no tempo de 48h e dois cortes do grupo Controle, provenientes das lâminas utilizadas na análise anatomoatológica. Foi seguido o protocolo padrão de fixação, desidratação, diafinização, inclusão e secção. Primeiramente as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 30 minutos, seguidas do protocolo de hidratação e lavadas em água da torneira por 5 minutos. Os cortes foram circulados com caneta de tinta hidrofóbica e lavados em solução tampão (PBS+Tween a 1%) de 3 a 4x durante 5 minutos. Posteriormente, incubados com a solução Normal Horse Serum 2,5% por 20 minutos. Os anticorpos primários (na diluição de 1:100) foram incubados por 2h. As lâminas foram novamente lavadas em solução tampão, montadas e mantidas em uma caixa escura até a análise em microscópio invertido *axio zeiss* manual. As imagens foram obtidas em aumento de 40x.

4.5. População e mobilização folicular

As lâminas da análise anatomopatológica referentes ao tempo de 96h foram utilizadas para a quantificação folicular, estas foram analisadas em microscópio óptico utilizando objetiva de 100x para as classes foliculares em estágios mais avançados de crescimento e em 400x para os folículos primordiais e primários. A classificação e quantificação folicular foram realizadas conforme descrito por Pereira e colaboradores (2020). A partir dessas análises foram obtidos dados relacionados à população de folículos primordiais, primários, secundários, antrais e atrésicos, bem como as taxas de recrutamento e atresia folicular.

4.5.1. Morfometria

Material e Métodos

Para as análises morfométricas, dentre os 3 grupos (Controle, Sham e Punção) 30 imagens de cada uma das categorias de folículos (primordial, primário, secundário e antral) foram obtidas do grupo Controle e dos animais dos grupos Sham e Punção no tempo de 96h, salvas em formato *.jpg* e analisadas com o *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) para avaliação da razão do diâmetro oócito:folículo. Duas medidas de cada estrutura foram obtidas para obtenção do diâmetro médio.

4.5.2. Imunohistoquímica

Primeiramente, três animais dos grupos Sham e Punção no tempo de 96h foram submetidos a aplicação de 100mg/kg de BrdU (Abcam) por via intraperitoneal 1h antes da eutanásia na concentração de 10 mg/mL (VORONINA *et al.*, 2007). Quatro cortes de cada grupo (dois para BrdU e dois para caspase3 - Sham e Punção - 96h) foram utilizados para a realização de imunohistoquímica, seguindo o mesmo protocolo de fixação, desidratação, diafinização, inclusão e corte. Primeiramente as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 30 minutos, seguidas do protocolo padrão de hidratação e lavadas em água da torneira por 5 minutos. Os cortes foram circulados com caneta de tinta hidrofóbica e incubados em solução *Bloxall* por 20 minutos para inibir a atividade endógena da peroxidase. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em solução tampão (PBS+Tween a 1%) durante 5 minutos e incubadas com a solução *Normal Horse Serum 2,5%* por 20 minutos. Os anticorpos primários (anti-BrdU 1:200 e anti-caspase3 1:300) foram incubados por 2h, sendo que o controle negativo foi incubado com a solução de diluição de anticorpo (soro de cavalo a 10%) e novamente lavadas em solução tampão. A incubação com o anticorpo secundário biotilado foi realizada por 30 minutos, os cortes novamente foram lavados com solução tampão, incubados com *VECTASTAIN Elite ABC* por 30 minutos e novamente lavados. A revelação da marcação foi realizada com a solução *ImmPact DAB Eqn 1:1* preparada no momento da utilização por aproximadamente 1 minuto e 20 segundos para o BrdU e 7 minutos e 30 segundos para a caspase. Os cortes foram lavados em água da torneira por 5 minutos, contra corados com hematoxilina por 15 segundos e seguidos do protocolo normal de desidratação e montagem. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio

óptico e as imagens foram obtidas em aumento de 100x e 400x. A taxa de proliferação celular foi analisada no *software Image J*, através da contagem das células marcadas pelo BrdU e das células que não foram marcadas pelo anticorpo, a partir disso foi realizado o percentual das células BrdU positivas. A análise quantitativa relacionada a atresia folicular foi realizada por HE, de forma similar à taxa de proliferação, imagens de folículos em diferentes fases de crescimento foram obtidas e, no *software Image J*, foram contadas as células em processo de morte celular e as células saudáveis, a partir disso foi realizado o percentual de células em degeneração; enquanto a marcação com caspase 3 foi utilizada para análise qualitativa.

4.5.3. Atresia folicular

Para a análise de atresia folicular foram obtidas 60 imagens de cada classe de folículos, das lâminas coradas com HE, entre os três grupos (Sham e Punção - 96h), em aumento de 40x para os folículos maiores e 100x para os primordiais e primários em microscópio óptico, As fotos foram salvas em formato *jpg*. e analisadas no *software Image J*. Foram contadas as células saudáveis e as em degeneração, a partir disso foi obtido o percentual de células em degeneração dentro de cada folículo.

4.6. Superovulação e coleta de oócitos

Para avaliar o efeito da punção ovariana na resposta superovulatória, novos animais (n=10 para cada grupo - Controle, Sham e Punção), após terem passado pelos procedimentos de punção ovariana (grupo Punção) e exposição ovariana (grupo Sham), foram submetidos a aplicações intraperitoneais de gonadotrofinas exógenas: 20 ul de eCG (gonadotrofina coriônica equina) e após 48 hs 20 ul de hCG (gonadotrofina coriônica humana). Após 14 horas os camundongos fêmeas foram anestesiados e eutanasiados, as tubas uterinas foram coletadas e mantidas em solução de HSA (30% - *Sigma Aldrich*) (MARA *et al.*, 2020). Os oócitos foram coletados a partir da perfuração da ampola da tuba com o auxílio de agulhas de insulina (MARA *et al.*, 2020). Os oócitos foram coletados com o auxílio de uma pipeta e translocados para outra placa de Petri contendo uma gota de hialuronidase por 15 min a 37°C, no intuito de quebrar o ácido hialurônico que mantém as células do cumulus unidas. A

solução contendo os oócitos desnudos foi avaliada em microscópio estereoscópio e os oócitos obtidos foram quantificados e classificados (MARA *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2021).

4.7. Ensaio de fertilidade

Para a avaliação do efeito da aspiração na fertilidade, novas fêmeas (n=10 para cada grupo - Controle, Sham e Punção), após terem passado pelos procedimentos de punção ovariana (grupo Punção) e exposição ovariana (grupo Sham), foram mantidas com machos WT de fertilidade conhecida durante o período de acasalamento de três meses. A presença do *plug* vaginal também foi avaliada como indicativo de cópula. As fêmeas foram pesadas a cada dois dias após o início do período de acasalamento e aquelas que tiveram ganho mínimo de peso de 3g foram consideradas gestantes. Estas foram separadas dos machos durante a gestação, eutanasiadas e histerectomizadas antes do parto (no dia 19 pós coito). Sendo assim, obtido o tempo para detecção da prenhez - dias entre o dia de junção com o macho até o dia de ganho de 3g, o número de filhotes por ninhada e o número de fetos com alterações no desenvolvimento, sendo este último parâmetro definido pelo tamanho e pelo aspecto do próprio feto e da placenta (GONÇALVES *et al.*, 2021).

4.8. Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram testados quanto à normalidade pelos testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos, em comparações com 3 grupos ou mais (parâmetros associados à padronização do modelo, dados de biometria, análises do ciclo estral, quantificação folicular, morfometria, proliferação, atresia, dados de superovulação e do ensaio de fertilidade) foram submetidos à análise de variância seguida de teste Bartlett. As análises entre dois grupos foram realizadas pelo teste t de student (Análise anatomopatológica). Com relação aos dados não paramétricos, esses foram avaliados pelo teste de variância, não assumindo distribuição normal. Todas as análises foram realizadas com auxílio do GraphPad Prisma 8.0.

Material e Métodos

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo

Como pode ser observado na Figura 5 todos os passos do procedimento foram passíveis de serem realizados de maneira satisfatória. A Tabela 4 indica que o protocolo padronizado neste estudo obteve total sucesso, sendo que todos animais foram anestesiados e retornaram da anestesia com sucesso. Todos os animais se recuperaram do procedimento cirúrgico após 24h e retornaram à ciclicidade estral após 48h. Além disso, 100% dos animais submetidos ao procedimento foram capazes de ovular e engravidar.

5.2. Biometria e ciclo estral

Os resultados apontam que o procedimento de punção ovariana não afeta os parâmetros fisiológicos dos camundongos C57Bl6, sendo que não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) com relação ao peso dos animais entre os grupos (Figura 6). Da mesma forma, o ciclo estral desses animais não sofreu alterações após o procedimento, sendo que todos os animais dos diferentes grupos voltaram a ciclar após as cirurgias, passando por todas as fases do ciclo de maneira similar ao grupo controle (Figura 7A). Além disso, o percentual de dias em que os animais permaneceram em cada fase e a duração dos ciclos não foram diferentes ($p > 0,05$) entre os grupos (Controle, Sham e Punção; Figura 7B). Ademais, a punção ovariana também não foi capaz de alterar ($p > 0,05$) a duração do ciclo estral, quando foram comparados entre os grupos e nem nas comparações antes e depois do procedimento no mesmo grupo (Figura 7C).

5.3. Cinética Inflamatória

A análise da cinética inflamatória (Tabela 5 e Figura 8) apontou diferenças significativas principalmente com relação aos aspectos patológicos (células em degeneração e polimorfonucleares dentro e fora do folículo, hemorragia, necrose e edema). De maneira geral, foi observado que o grupo Punção obteve um processo inflamatório mais intenso comparado ao Sham, devido ao fato desse grupo ter apresentado um maior percentual de densidade volumétrica dos elementos associados à inflamação. A figura 8A demonstra

Resultados

que houve diferença entre o grupo Punção e Sham nos tempos de 24h ($p=0,0121$) e 48h ($p=0,0329$), sendo que o grupo Punção obteve uma maior densidade volumétrica de células em degeneração dentro do folículo com relação ao grupo Sham. As células em degeneração fora do folículo estão presentes em ambos os grupos apenas durante o tempo de 3h (Figura 8B). Na figura 8C, pode ser observado que a densidade de células polimorfonucleares dentro do folículo é maior no grupo Punção nos tempos 3h ($p=0,0102$), 48h ($p=0,0001$) e 96h ($p=0,0005$) comparado ao Sham. A Figura 8D indica que houve uma redução das células polimorfonucleares fora do folículo ao longo do tempo dentro dos grupos Sham e Punção, sendo que essas células estão em maior densidade no grupo Punção comparado ao Sham, principalmente nos tempos de 48h ($p=0,0412$) e 96h ($p=0,0480$). O gráfico apresentado na Figura 8E demonstra que a densidade volumétrica de focos de hemorragia é maior no grupo Punção nos tempos 3h ($p=0,0308$), 48h ($p=0,0097$) e 96h ($p<0,0001$) comparado ao Sham, sendo que dentro do grupo Punção é maior no tempo de 3h ($p=0,0024$) comparado aos demais tempos e no grupo Sham é maior em 24h ($p=0,0014$) comparado aos demais tempos. A Figura 8F representa a densidade volumétrica de edema, houve diferença entre os grupos nos tempos de 48h ($p<0,0001$) e 96h ($p<0,0001$), sendo que foi maior no grupo Punção comparado ao Sham. Finalmente, a densidade volumétrica de necrose diminuiu significativamente ao longo do tempo dentro do grupo Punção e é maior neste grupo comparado ao Sham nos tempos de 3h ($p=0,0114$) e 48h ($p=0,0003$) (Figura 8G).

A Figura 9, por sua vez, representa a histologia ovariana com relação aos aspectos patológicos estudados. Foi possível observar que nos tempos iniciais, tanto no grupo Punção quanto no Sham, os elementos inflamatórios indicados (células em processo de degeneração, focos de hemorragia, edema e necrose) aparecem com maior intensidade e vão sendo resolucioneados à medida que os tempos posteriores são alcançados. Além disso, o grupo Punção apresenta uma maior densidade desses elementos comparado ao Sham, sendo que no grupo Controle os elementos patológicos relacionados ao processo inflamatório não foram observados.

Apesar de terem sido observadas diferenças estatísticas associadas aos aspectos patológicos entre os grupos Sham e Punção, foi visto que ao longo do tempo ambos os grupos foram capazes de provocar a resolução dos aspectos indicativos de inflamação, de forma que foi observada uma diminuição da densidade volumétrica destes elementos. Para melhor entender o processo inflamatório provocado pelo processo de punção ovariana foi realizada a imunofluorescência com anticorpo F4/80 para marcação de macrófagos. Como pode ser observado na Figura 10, de maneira qualitativa, o grupo Punção apresentou uma maior marcação comparado ao grupo Controle.

5.4. Efeito da punção na mobilização folicular

Com relação à quantificação folicular foi observado que o grupo Punção obteve uma redução da contagem de folículos primordiais de 72,7772% ($p=0,0080$) (Figura 11A). Tal fato pode estar relacionado a dois fatores: (i) maior ativação da reserva folicular ovariana ou (ii) maior apoptose dos folículos primordiais resultantes do procedimento. Além disso, houve uma maior contagem de folículos atrésicos no grupo Punção comparado ao Sham e ao Controle ($p=0,0118$) (Figura 11 A). As micrografias histológicas (Figura 11B) ilustram estes resultados, onde pode ser observado um maior número de folículos primordiais no grupo controle em contraste a uma maior quantidade de folículos atrésicos no grupo Punção.

Conforme pode ser observado na Figura 12A, o percentual de folículos em crescimento é contrastado ao percentual de folículos primordiais, de modo que o grupo Punção apresenta uma menor porcentagem de folículos primordiais ($p=0,0080$) contrastado a um maior percentual de folículos em crescimento ($p=0,0070$) comparado ao grupo controle. Da mesma forma, a taxa de ativação folicular tende a ser maior no grupo Punção com relação aos demais, apesar de não ter havido diferença significativa (Figura 12 B), já a taxa de atresia folicular foi maior no grupo Punção comparada ao Sham ($p=0,0273$) e ao Controle ($p=0,0142$) (Figura 12 C).

Com o intuito de aprofundar nossas investigações, foi realizada a análise do diâmetro oocitário e folicular. A razão do diâmetro oócito:folículo demonstrou diferença, sendo maior em folículos primordiais do grupo punção comparado ao grupo Sham ($p=0,0013$) e ao Controle ($p=0,0034$) e com

relação aos folículos primários a mesma tendência foi observada, Sham ($p=0,0004$) e ao Controle ($p=0,0063$) (Figura 13).

Para complementar esses resultados foi realizada a análise de proliferação celular e atresia a partir da imunohistoquímica e marcação com BrdU e caspase-3, respectivamente. Foi observado que houve um maior percentual de células BrdU positivas no grupo Punção em relação ao controle nos folículos primários ($p=0,0082$) e antrais ($p=0,0031$) (Figura 14A), e esses achados podem ser observados através das micrografias (Figura 14B).

Já os dados obtidos através do percentual de células em atresia por classe folicular demonstram que as classes foliculares mais afetadas pela morte celular no grupo Punção são os secundários e os antrais, sendo que com relação aos folículos secundários o grupo punção apresentou um maior número de células em processo de morte celular comparado ao Sham ($p=0,0341$) e Controle ($p=0,0001$) e o Sham comparado ao Controle ($p=0,0023$) e com relação aos folículos antrais, o grupo Punção apresentou maior percentual destas células comparado ao grupo Sham ($p=0,0100$) e Controle ($p<0,0001$) (Figura 15). Tais resultados apontam que a maior taxa de atresia folicular do grupo Punção indicada pela quantificação folicular está relacionada à morte de folículos em estágios mais avançados da foliculogênese.

5.5. Efeito da punção na fertilidade

O ensaio de superovulação foi realizado para investigar se a punção era capaz de afetar a ovulação e resposta a gonadotropinas nos camundongos. De maneira geral, foi observada uma menor recuperação oocitária no grupo Punção comparado ao Controle ($p=0,0443$), apesar disso, a qualidade dos oócitos recuperados não foi afetada pelo procedimento (Figura 16 A). Da mesma forma, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) com relação ao número de corpos hemorrágicos e lúteos entre os grupos (Figura 16B). As imagens obtidas através de microscópio estereoscópio corroboram com os dados da análise estatística, apontando uma maior contagem de oócitos recuperados no grupo Controle (Figura 16C). Também não foram observadas diferenças significativas com relação ao número de corpos hemorrágicos (Figura 17A) e lúteos macro (Figura 17B) e microscópicamente (Figura 17 C).

Resultados

Ainda, a figura 17D ilustra macroscopicamente tais resultados, foram observados corpos hemorrágicos e lúteos apontados pelas setas verdes e vermelhas, respectivamente.

Finalmente, o ensaio de fertilidade foi realizado para que fosse avaliado além dos aspectos reprodutivos e inflamatórios, alterados pela punção ovariana, se o procedimento afeta a capacidade dos animais em emprenhar e prosseguir com a gestação. De maneira geral, foi observado que a punção não é capaz de afetar a capacidade dessas fêmeas em emprenhar, sendo que não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) com relação ao tempo (dias) para detecção da prenhez (Figura 18A), número de fetos por animal (Figura 18B) e número de fetos com alteração no desenvolvimento (Figura 18C). A figura 18D ilustra os úteros coletados das fêmeas submetidas ao ensaio de fertilidade um dia antes do parto. É possível observar que a quantidade de fetos não apresenta diferenças evidentes entre os grupos e as setas vermelhas apontam fetos com alterações no desenvolvimento, indicadas por menor desenvolvimento do feto e/ou alterações placentárias.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

De maneira geral pouco se sabe sobre como a punção ovariana reflete em aspectos relacionados à foliculogênese e a fertilidade e em como esses fatores refletem ou são refletidos pela cinética inflamatória decorrente deste procedimento. Nesse sentido, o presente estudo demonstrou que a punção acarreta em alterações morfofuncionais capazes de alterar a mobilização folicular. A padronização do protocolo obteve sucesso. Camundongos C57Bl6 podem ser utilizados como modelo para estudo de punção ovariana, a partir de anestesia inalatória e a perfuração do ovário com agulha de acupuntura. De maneira geral, os resultados apontam que apesar da punção ovariana afetar aspectos foliculares, ovulatórios e inflamatórios, o procedimento não alterou a capacidade dos animais em emprenhar. A punção não alterou os aspectos biométricos associados ao peso e o ciclo estral desses animais, demonstrando que, apesar de ser um procedimento invasivo, os camundongos foram capazes de se recuperar com facilidade e em um curto período de tempo, mantendo seus aspectos fisiológicos próximos aos do grupo Controle e retornando a ciclicidade normal, com duração de 4 a 5 dias entre um proestro e o próximo, logo após aos procedimentos cirúrgicos (AJAYI & AKHIGBE, 2020).

A análise da cinética inflamatória demonstrou que houve diferenças com relação a densidade volumétrica de células em processo de necrose dentro do folículo nos tempos de 24h e 48h, sendo que o grupo punção apresentou uma maior densidade volumétrica de células em processo de necrose comparado ao Sham. Em órgãos como o coração, é bem definido que a intensidade da lesão está diretamente relacionada à resposta inflamatória resultante. Dessa forma, podemos inferir que quanto maior ou mais intensa é a lesão, maior são os elementos associados ao processo inflamatório (HEO *et al.*, 2019). Tal resultado pode ser explicado devido ao fato do processo de punção ovariana, realizado no grupo Punção, ser muito mais intenso que apenas a exposição do ovário, realizada no grupo Sham que, por sua vez, não deixa de resultar em inflamação local. Dessa forma, o início do processo de morte celular ocorreu de maneira mais tardia no grupo Sham comparado ao Punção.

Com relação às células polimorfonucleares dentro do folículo, no grupo Sham ocorre um pico em 24h, que é o tempo esperado de chegada de

neutrófilos em processos clássicos de inflamação (KOLACZOWSKA & KUBES, 2013). No entanto, o grupo Punção apresenta tal pico no tempo de 3h com

posterior redução ao longo do tempo em ambos os grupos. A chegada de neutrófilos pode ocorrer de maneira mais inicial no processo inflamatório em diferentes tecidos e de maneira dependente da intensidade e agente causador da injúria/inflamação, nesse momento essas células agem iniciando o processo da inflamação aguda através da sua ação fagocítica, degranulação, formação de espécies reativas de oxigênio e redes de cromatina para capturar microorganismos (ROBB *et al.*, 2016; CASTANHEIRA & KUBES, 2019).

Ao longo do tempo, a resposta inflamatória passa a recrutar macrófagos através de agentes quimioatrativos. Os macrófagos M1 são quimicamente atraídos por IFN γ e TNF, enquanto os M2 respondem a M-CSF, IL-4, IL-10, IL-13 e TGF. Estes, ao alcançar o sítio de inflamação tornam-se responsáveis pela liberação de fatores anti-inflamatórios e de reparação (i.e.: IL-10, ON e PGE2) para que haja a fagocitose e início do processo de reparo (KOH & DiPIETRO, 2011; ROBB *et al.*, 2016). Nesse sentido, a ação dos macrófagos no tecido ovariano lesionado explica a redução da densidade volumétrica de células polimorfonucleares nos tempos mais tardios estudados tanto dentro quanto fora do folículo, devido ao início do processo de reparação tecidual, sendo que o grupo Punção apresentou maiores densidades volumétricas destas células comparado ao Sham, devido a intensidade da injúria causada no tecido.

Os focos hemorrágicos foram observados de maneira mais intensa no tempo de 3h em ambos os grupos, sendo estatisticamente maior no grupo Punção com posterior resolução, tal fato corrobora com o que foi citado por Rankin (2004), os focos de hemorragia são resultado da resposta inflamatória vascular, que ocorre antes da resposta celular, através da ação de agente vasodilatadores e permite a diapedese de células inflamatórias e a formação do exsudato inflamatório, que por sua vez, segue os padrões da resposta imune aguda clássica, apresentando um edema associado a neutrófilos, com início da drenagem após 48h, a partir da chegada dos macrófagos e corrobora nossos achados de imunofluorescência, a partir da marcação F4/80.

Os dados relacionados ao processo inflamatório corroboram o que foi observado por Viana e colaboradores (2003), onde após diferentes números de punções ovarianas em vacas da raça Gir foram observadas áreas de hemorragia e infiltrado inflamatório, além de fibrose associada ao trajeto da agulha no estroma ovariano. O processo inflamatório observado no presente estudo ocorre de maneira semelhante em outros órgãos. No pulmão, os neutrófilos são as células responsáveis por dar início ao processo inflamatório associado a lesão pulmonar aguda e os macrófagos agem posteriormente com função de fornecimento de citocinas e quimiocinas (ZHANG *et al.*, 2019). No coração, segundo Fan e colaboradores (2018), após lesão relacionada a infarto agudo do miocárdio, ocorre processo de necrose e os macrófagos são as células que mais atuam no processo de inflamação, ocorrendo uma primeira onda de macrófagos M1 com ação pró-inflamatória e uma segunda onda de macrófagos M2, com ação anti-inflamatória. De maneira geral, os aspectos inflamatórios aparecem com maior intensidade grupo Punção com relação ao Sham, mas são resolucioneados ao longo do tempo em ambos os grupos. Indicando a capacidade ovariana, já adaptada ao processo inflamatório fisiológico, em solucionar a resposta imune decorrente da punção (DUFFY *et al.*, 2019).

No presente trabalho foi observada uma redução da contagem de folículos primordiais induzido pela punção ovariana. A redução da contagem de folículos primordiais no grupo Punção, a qual pode ser relacionada tanto a uma maior ativação folicular quanto a um aumento da atresia destes folículos, demonstrou estar mais fortemente relacionada ao aumento da ativação da reserva folicular decorrente da punção. Tal fato pôde ser comprovado devido ao fato de ter sido observado um aumento do percentual de células da granulosa em proliferação (BrdU +) dos folículos primordiais e primários, como um indicativo de ativação e crescimento folicular (XU *et al.*, 2020). O ganho de volume pelo oócito é também um dos indicativos de ativação folicular, dessa forma, de maneira complementar, a razão do diâmetro oócito:folículo é indicativo de ativação dessas classes iniciais (BERTOLDO *et al.*, 2021). O que, novamente, aponta maior ativação da reserva folicular ovariana no grupo Punção com relação ao Sham e ao Controle.

Como a ativação folicular é o processo pelo qual os folículos primordiais tornam-se capazes de deixar a quiescência, e depende da ação de diferentes vias, como PI3K/AKT e mTOR e da interação entre elas (FORD *et al.*, 2020). Atualmente diferentes grupos de estudo buscam aprimorar técnicas para controlar a ativação folicular, devido ao fato dos agentes ativadores de mTOR e AKT serem de baixa eficácia. Zhang e colaboradores (2019) utilizaram sirtuína 1 (desacetilase dependente de NAD) e demonstraram desencadeamento da ativação de folículos primordiais através da sua ativação ou superexpressão, além de redução da ativação folicular quando sua expressão é suprimida. No entanto, estudos relacionados apontam SIRT1 como promotores de genes de AKT e mTOR, demonstrando que sua ação como desacetilase não está diretamente associada à ativação folicular (SUNDARESAN *et al.* 2011; SEIFERT *et al.*, 2012).

Maestre e colaboradores (2015) observaram que o inibidor de PTEN assim como a ativação de PI3K gera intensa ativação folicular em ovários humanos. Além disso, Suzuki e colaboradores (2015) foram capazes de gerar gestações em mulheres com PCOS a partir da utilização de PI3K e mTOR. No entanto, os efeitos a longo prazo dessa ativação induzida ainda não são bem esclarecidos. Dessa forma, a maior ativação de folículos primordiais observadas no grupo Punção pode ser causada devido à modificações das vias PI3K-Akt e mTOR causadas pelo procedimento de punção ovariana.

A atresia folicular é um processo ovariano fisiológico, ocorre em folículos em diferentes classes de crescimento e pode ser intensificado por fatores externos. Paralelamente à ativação folicular, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram uma maior taxa de células em processo de degeneração no grupo Punção relacionado aos folículos secundários e antrais. O que, além de indicar que a maior taxa de morte folicular observada a partir da quantificação estar relacionada à apoptose dos folículos em estágios mais avançados da foliculogênese, demonstra que a atresia é causada por fatores locais e inflamatórios, que como citado anteriormente, podem ser alterados pelo processo de punção ovariana (MATSUDA *et. al*, 2012).

Com relação ao processo inflamatório e a atresia folicular, estudos de Liu e colaboradores (2022) demonstraram a relação entre a resposta inflamatória e o processo de fibrose ovariana causada pela administração de

MC-LR (um agente toxicológico intracelular) e o aumento das taxa de atresia. A presença da toxina resultou em um aumento da produção de TNF- α pelas células da granulosa e consequente infiltrado inflamatório no ovário associado a um aumento da morte celular. Além disso, outros fatores como a obesidade estão associados a processos inflamatórios ovarianos e redução da qualidade oocitária (SNIDER & WOOD, 2019). Estudos com camundongos obesos demonstraram uma maior taxa de células da granulosa em apoptose comparado à animais saudáveis (WU *et al.*, 2015).

O transplante ovariano também associa-se diretamente a processos de ativação e morte folicular, sendo que estes podem ser intensificados pelo tipo de processamento, tipo de congelamento e pelo tamanho do enxerto (SILBER *et al.*, 2015). De maneira geral, os folículos primordiais parecem ser mais resistentes aos procedimentos de transplante, dessa forma, a massiva ativação folicular relaciona-se ao aumento da fosforilação da via PI3K-AKT devido à hipóxia. (SILBER *et al.*, 2015; GAVISH *et al.*, 2018). Com relação aos inibidores de mTOR, everolimus (EVE), análogo a rapamicina, é amplamente utilizado na prevenção da rejeição de transplante. Estudos de Goldman e colaboradores (2017) demonstraram que este inibidor foi capaz de prevenir a massiva ativação folicular pós-transplante em camundongos. Como foi observado no presente trabalho, a punção ovariana resultou em uma maior ativação de folículos, novos estudos podem ser realizados no intuito de verificar quais vias estão associadas a esta ativação e como elas podem ser inibidas para a preservação da reserva folicular ovariana.

É reconhecido no campo da reprodução que tanto a apoptose quanto a necrose e a autofagia são responsáveis pelo processo de atresia folicular (SUN *et al.*, 2017; KUTSCHER *et al.*, 2017). Corroborando com o que foi observado por Akogullari e colaboradores (2018), que utilizaram camundongos como modelo de falência ovariana prematura, nosso estudo demonstra a atividade de caspase 3 no processo de morte celular de células da granulosa que resulta em atresia folicular. Estudos demonstram, de maneira geral, que processos de morte celular mediados por necrose acontecem principalmente em folículos primordiais e primários, enquanto os folículos maiores (secundários, antrais e pré-ovulatórios) sofrem atresia em igual proporção por apoptose, necrose e autofagia (PAJOKH *et al.*, 2018). Dessa forma, a necrose observada no

presente estudo segue o padrão relacionado a inflamação aguda e aparece com mais intensidade nos períodos iniciais, além de ser significativamente maior no grupo Punção, é brevemente resoluciona em ambos os grupos (SUGIMOTO *et al.*, 2019). Nesse sentido, é possível sugerir que os momentos iniciais da inflamação resultam em atresia dos folículos primordiais, com breve resolução e os processos de atresia posteriores são respectivos a apoptose e autofagia de folículos em crescimento, o que corrobora com os dados apresentados anteriormente.

A fertilidade dos animais foi analisada a partir do ensaio de superovulação e do ensaio de fertilidade. De maneira geral, o ovário é um órgão adaptado ao processo inflamatório e diretamente associado à ovulação. O pico de LH promove o desencadeamento de vias de sinalização interconectadas responsáveis por provocar a ruptura do folículo e liberação do complexo cumulus-oócito. Em resposta ao LH, as células da granulosa e da teca produzem quimiocinas, prostaglandinas e esteroides, que além de atuar na modificação dos aspectos estruturais e funcionais das células ovarianas estromais também atuam como mediadores de resposta inflamatória. Nesse sentido, a ovulação pode ser vista como um evento semelhante a inflamação, sendo que esses mediadores recrutam tanto células inflamatórias residentes no ovário quanto de outros tecidos e geram as respostas vasculares e celulares necessárias ao processo de inflamação (DUFFY *et al.*, 2019).

A idade avançada dificulta o processo inflamatório e de remodelamento ovariano pós-ovulação, o que se relaciona diretamente a qualidade dos oócitos recuperados em camundongos (MARA *et al.*, 2020). Em vacas, foi observado que repetidas punções levam a modificações da parede folicular, infiltrado inflamatório e fibrose ovariano (VIANA *et al.*, 2003), o que pode estar relacionado com a redução da capacidade ovulatória nesses animais (FIGUEIREDO *et al.*, 2020). A redução do número de folículos também foi observada por Neglia e colaboradores (2011) em búfalas submetidas a repetidas punções.

Em humanos, a aspiração folicular tem sido associada ao aparecimento de abscessos inflamatórios, sendo que a injúria decorrente do procedimento pode resultar em deposição de fibrina, que provoca uma conexão permanente entre os tecidos e pode estar associada a uma dificuldade dos oócitos em

alcançar a ampola da tuba uterina, onde são comumente fertilizados (KELADA & GHANI, 2007). Além disso, a proliferação de fibroblastos e deposição de matriz fibrosa resultante do processo inflamatório associado à punção reduz a proporção de tecido ovariano e afeta diretamente o desenvolvimento de folículos pré-antrais (FIGUEIREDO *et al.*, 2020). No presente trabalho foi observado que apesar de ter havido uma redução da recuperação oocitária decorrente da punção, a qualidade dos oócitos recuperados não foi afetada pelo procedimento. Dessa forma, a inflamação decorrente da punção ovariana é resoluciona no órgão de forma semelhante ao que ocorre ao processo fisiológico da ovulação. Por outro lado, a punção foi realizada apenas uma vez neste trabalho, o que cria a perspectiva de que repetidos procedimentos de punção podem modificar os resultados apresentados até o momento.

A capacidade das fêmeas em emprenhar e prosseguir com a gestação também não foi afetada pelo procedimento, de forma que não foram observadas diferenças significativas com relação a detecção da prenhez e o número de fetos e fetos com alterações de desenvolvimento. Foi observado um processo compensatório da ovulação que se relaciona com a quantificação folicular, de forma que apesar da maior ativação folicular ter ocorrido no grupo Punção, os folículos não saudáveis entram em processo de atresia, e apenas são ovulados aqueles oócitos que são realmente saudáveis. Assim, estes serão fecundados de maneira desejada e darão origem a uma prole com aspectos fisiológicos de desenvolvimento iniciais semelhantes ao grupo Controle (BHATTACHARYA, 2013), o que corrobora com os dados obtidos por Viana 2010, onde punções repetidas aumentam a quantidade de oócitos saudáveis em procedimentos subsequentes de FIV. Por outro lado, Figueiredo e colaboradores 2020 observaram uma redução da capacidade de prenhez associada à redução da qualidade de oócito em vacas puncionadas repetidamente, o que novamente remete ao fato dos animais do presente estudo terem sido passado pelo procedimento de punção ovariana apenas uma vez.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo abre portas a novas abordagens relacionadas à punção ovariana, devido à padronização do modelo murino para o procedimento ter obtido sucesso total. De maneira geral, os resultados indicam que a punção ovariana modifica a dinâmica folicular e oocitária, assim como os aspectos inflamatórios decorrentes dos procedimentos cirúrgicos. No entanto, os animais foram capazes de resolver tais aspectos de forma eficaz, de forma que os resultados associados à fertilidade não apontaram diferenças estatisticamente significativas e a capacidade de gestação e a forma aparentemente saudável dos filhotes não foram afetados pela punção. Dessa forma, os dados indicam que, apesar de gerar uma resposta inflamatória aguda e modificar aspectos foliculares e ovulatórios, o processo inflamatório e as alterações da dinâmica folicular decorrentes da punção ovariana não foram capazes de afetar a fertilidade de camundongos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World*. 2018 May;11(5):627-635. doi: 10.14202/vetworld.2018.627-635. Epub 2018 May 15. PMID: 29915501; PMCID: PMC5993766.

Agdi M, Zarei A, Al-Sannan B, Tulandi T, Tan SL. Effects of ovarian puncture for in vitro maturation on subsequent in vitro fertilization cycle in women with polycystic ovaries. *Fertil Steril*. 2010 Jun;94(1):381-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.033. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20004390.

Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*. 2020 Mar 14;6:5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3. PMID: 32190339; PMCID: PMC7071652.

Akogullari, Uluer ET, Vatansever S. Investigation of the Relation between Follicular Atresia and Granulosa Cells in Terms of Cell Death Mechanisms in Premature Ovarian Failure Model. *Proceedings 2018*, 2, 1529; doi:10.3390/proceedings2251529.

Amer SA, Shamy TTE, James C, Yosef AH, Mohamed AA. The impact of laparoscopic ovarian drilling on AMH and ovarian reserve: a meta-analysis. *Reproduction*. 2017 Jul;154(1):R13-R21. doi: 10.1530/REP-17-0063. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28420801.

Baker TG. A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. *J Anat*. 1966 Oct;100(Pt 4):761-76. PMID: 4961727; PMCID: PMC1270824.

Barros PPM, Teixeira MAM, Silva ASL, Medeiros RM, Coelho CMM, Bandarra MB, Macedo MF, Bezerra MB, Vicente WRR. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.38, n.2, p.121-126, abr./jun. 2014. Disponível em www.cbpa.org.br

Bhattacharya K. Ovulation and rate of implantation following unilateral ovariectomy in mice. *J Hum Reprod Sci*. 2013 Jan;6(1):45-8. doi: 10.4103/0974-1208.112381. PMID: 23869151; PMCID: PMC3713577.

Bertoldo MJ, Rodriguez Paris V, Gook DA, Edwards MC, Wu K, Liang CJJ, Marinova MB, Wu LE, Walters KA, Gilchrist RB. Impact of nicotinamide mononucleotide on transplanted mouse ovarian tissue. *Reproduction*. 2021 Feb;161(2):215-226. doi: 10.1530/REP-20-0539. PMID: 33320829.

Briley SM, Jasti S, McCracken JM, Hornick JE, Fegley B, Pritchard MT, Duncan FE. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian

Referências

ovary. *Reproduction*. 2016 Sep;152(3):245-260. doi: 10.1530/REP-16-0129. PMID: 27491879; PMCID: PMC4979755.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 2012;7(4):e35538. doi: 10.1371/journal.pone.0035538. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22514749; PMCID: PMC3325956.

Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019 May 16;133(20):2178-2185. doi: 10.1182/blood-2018-11-844530. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30898862.

Chang HM, Qiao J, Leung PC. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update*. 2016 Dec;23(1):1-18. doi: 10.1093/humupd/dmw039. Epub 2016 Oct 26. PMID: 27797914; PMCID: PMC5155571.

Chen Z, Kang X, Wang L, Dong H, Wang C, Xiong Z, Zhao W, Jia C, Lin J, Zhang W, Yuan W, Zhong M, Du H, Bai X. Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *J Biol Chem*. 2015 Mar 6;290(10):6387-96. doi: 10.1074/jbc.M114.605261. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25564616; PMCID: PMC4358274.

Crowe AD, Lonergan P, Butler ST. Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds. *J Dairy Sci*. 2021 Dec;104(12):12189-12206. doi: 10.3168/jds.2021-20281. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34538485.

da Silva Bitecourt F, Horta COD, Lima KS, Godoi BB, Bello FLM, Rodrigues CM, Schetino LPL, Honorato-Sampaio K. Morphological study of apoptosis in granulosa cells and ovulation in a model of atresia in rat preovulatory follicles. *Zygote*. 2018 Aug;26(4):336-341. doi: 10.1017/S0967199418000291. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30277180.

D'Angelo A, Panayotidis C, Amso N, Marci R, Matorras R, Onofriescu M, Turp AB, Vandekerckhove F, Veleva Z, Vermeulen N, Vlasisavljevic V. Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up†. *Hum Reprod Open*. 2019 Dec 10;2019(4):hoz025. doi: 10.1093/hropen/hoz025. PMID: 31844683; PMCID: PMC6903452.

Ding Q, Chen Y, Zhang Q, Guo Y, Huang Z, Dai L, Cao S. 8-bromo-7-methoxychrysin induces apoptosis by regulating Akt/FOXO3a pathway in cisplatin-sensitive and resistant ovarian cancer cells. *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5100-8. doi: 10.3892/mmr.2015.4039. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26151347; PMCID: PMC4581817.

Referências

Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocr Rev.* 2019 Apr 1;40(2):369-416. doi: 10.1210/er.2018-00075. PMID: 30496379; PMCID: PMC6405411.

Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fert* 1966;10:97–105.

Fan EKY, Fan J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation. *Respir Res.* 2018 Mar 27;19(1):50. doi: 10.1186/s12931-018-0756-5. PMID: 29587748; PMCID: PMC5872399.

Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jun 13;(6):CD001122. doi: 10.1002/14651858.CD001122.pub4. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Feb 11;2:CD001122. PMID: 22696324.

Figueiredo CC, Bisinotto DZ, Brandão GVR, Umaña Sedó S, Bisinotto RS. Impact of assisted reproduction techniques on subsequent reproductive performance of dairy heifers and lactating cows. *Theriogenology.* 2020 Dec;158:97-104. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.09.011. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32947065.

Foley KG, Pritchard MT, Duncan FE. Macrophage-derived multinucleated giant cells: hallmarks of the aging ovary. *Reproduction.* 2021 Feb;161(2):V5-V9. doi: 10.1530/REP-20-0489. PMID: 33258461; PMCID: PMC7856073.

Ford EA, Beckett EL, Roman SD, McLaughlin EA, Sutherland JM. Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency. *Reproduction.* 2020 Jan;159(1):R15-R29. doi: 10.1530/REP-19-0201. PMID: 31376814.

Franks S, Hardy K. Androgen Action in the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 10;9:452. doi: 10.3389/fendo.2018.00452. PMID: 30147675; PMCID: PMC6097027.

Frost ER, Ford EA, Peters AE, Reed NL, McLaughlin EA, Baker MA, Lovell-Badge R, Sutherland JM. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 are expressed in the human ovary and have Janus kinase 1-independent functions in the COV434 human granulosa cell line. *Reprod Fert Dev.* 2020 Aug;32(12):1027-1039. doi: 10.1071/RD20098. PMID: 32758351; PMCID: PMC7116066.

Gaudet A, Portier L, Prin M, Copin MC, Tsicopoulos A, Mathieu D, Lassalle P, De Freitas Caires N. Endocan regulates acute lung inflammation through control of leukocyte diapedesis. *J Appl Physiol (1985).* 2019 Sep 1;127(3):668-678. doi: 10.1152/jappphysiol.00337.2019. Epub 2019 Jul 11.

Referências

PMID: 31295063.

Gavish Z, Spector I, Peer G, Schlatt S, Wistuba J, Roness H, Meirou D. Follicle activation is a significant and immediate cause of follicle loss after ovarian tissue transplantation. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Jan;35(1):61-69. doi: 10.1007/s10815-017-1079-z. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29098533; PMCID: PMC5758475.

Gebre-medhn S, Salilew-Wondim D, Hoelker M, Rings F, Neuhoff C, Tholen E, Schellander K, Tesfaye D. MicroRNA-183-96-182 Cluster Regulates Bovine Granulosa Cell Proliferation and Cell Cycle Transition by Coordinately Targeting FOXO1. *Biol Reprod.* 2016 Jun;94(6):127. doi: 10.1095/biolreprod.115.137539. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27122636; PMCID: PMC6702798.

Gershon E, Dekel N. Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 26;21(12):4565. doi: 10.3390/ijms21124565. PMID: 32604954; PMCID: PMC7349727.

Goldman KN, Chenette D, Arju R, Duncan FE, Keefe DL, Grifo JA, Schneider RJ. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Mar 21;114(12):3186-3191. doi: 10.1073/pnas.1617233114. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28270607; PMCID: PMC5373380.

Gomel V. From laparotomy to laparoscopy to in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2019 Aug;112(2):183-196. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.06.028. PMID: 31352957.

Gonçalves JP, Magalhães BA, Campos-Junior PHA. Contrasting effects of the Toll-like receptor 4 in determining ovarian follicle endowment and fertility in female adult mice. *Zygote.* 2022 Apr;30(2):227-233. doi: 10.1017/S096719942100054X. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34405787.

Gonsioroski A, Meling DD, Gao L, Plewa MJ, Flaws JA. Iodoacetic acid inhibits follicle growth and alters expression of genes that regulate apoptosis, the cell cycle, estrogen receptors, and ovarian steroidogenesis in mouse ovarian follicles. *Reprod Toxicol.* 2020 Jan;91:101-108. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.10.005. Epub 2019 Nov 3. PMID: 31693920; PMCID: PMC6980769.

Hatırnaz Ş, Tan SL, Hatırnaz E, Çelik Ö, Kanat-Pektaş M, Dahan MH. Vaginal ultrasound-guided ovarian needle puncture compared to laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2019 May;299(5):1475-1480. doi: 10.1007/s00404-019-05067-2. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30729291.

Referências

Heo GS, Kopecky B, Sultan D, Ou M, Feng G, Bajpai G, Zhang X, Luehmann H, Detering L, Su Y, Leuschner F, Combadière C, Kreisel D, Gropler RJ, Brody SL, Liu Y, Lavine KJ. Molecular Imaging Visualizes Recruitment of Inflammatory Monocytes and Macrophages to the Injured Heart. *Circ Res*. 2019 Mar 15;124(6):881-890. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314030. PMID: 30661445; PMCID: PMC6435034.

Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Sado Y, Ninomiya Y, Wilhelm D, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*. 2013;8(2):e55578. doi: 10.1371/journal.pone.0055578. Epub 2013 Feb 7. PMID: 23409002; PMCID: PMC3567121.

Ishiguro KI, Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko MSH, Araki K, Niwa H. MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells. *Dev Cell*. 2020 Feb 24;52(4):429-445.e10. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.010. Epub 2020 Feb 6. PMID: 32032549.

Iwase A, Nakamura T, Osuka S, Takikawa S, Goto M, Kikkawa F. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve: What have we learned, and what should we know? *Reprod Med Biol*. 2015 Nov 23;15(3):127-136. doi: 10.1007/s12522-015-0227-3. PMID: 29259429; PMCID: PMC5715856.

John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol*. 2008 Sep 1;321(1):197-204. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.017. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18601916; PMCID: PMC2548299.

Kanamori M, Oikawa K, Tanemura K, Hara K. Mammalian germ cell migration during development, growth, and homeostasis. *Reprod Med Biol*. 2019 Jun 9;18(3):247-255. doi: 10.1002/rmb2.12283. PMID: 31312103; PMCID: PMC6613016.

Kelada E, Ghani R. Bilateral ovarian abscesses following transvaginal oocyte retrieval for IVF: a case report and review of literature. *J Assist Reprod Genet*. 2007 Apr;24(4):143-5. doi: 10.1007/s10815-006-9090-9. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17450435; PMCID: PMC3455067.

Khan DR, Fournier É, Dufort I, Richard FJ, Singh J, Sirard MA. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis. *Reproduction*. 2016 Jun;151(6):R103-10. doi: 10.1530/REP-15-0594. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26980808.

Referências

- Kirilova A, Martazanova B, Mishieva N, Semenova M. Follicular waves in ontogenesis and female fertility. *Biosystems*. 2021 Dec;210:104558. doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104558. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34619293.
- Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med*. 2011 Jul 11;13:e23. doi: 10.1017/S1462399411001943. PMID: 21740602; PMCID: PMC3596046.
- Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399. PMID: 23435331.
- Kutscher LM, Shaham S. Non-apoptotic cell death in animal development. *Cell Death Differ*. 2017 Aug;24(8):1326-1336. doi: 10.1038/cdd.2017.20. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28211869; PMCID: PMC5520451.
- Li L, Zhu J, Ye F, Duan Z, Zhou J, Huang Z, Wang L. Upregulation of the lncRNA SRLR in polycystic ovary syndrome regulates cell apoptosis and IL-6 expression. *Cell Biochem Funct*. 2020 Oct;38(7):880-885. doi: 10.1002/cbf.3507. Epub 2020 Jan 30. PMID: 31999854; PMCID: PMC7586972.
- Liu YX, Zhang Y, Li YY, Liu XM, Wang XX, Zhang CL, Hao CF, Deng SL. Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Mar 1;24(5):983-993. doi: 10.2741/4763. PMID: 30844725.
- Liu K, Zhao X, Guo M, Zhu J, Li D, Ding J, Han X, Wu J. Microcystin-leucine arginine (MC-LR) induces mouse ovarian inflammation by promoting granulosa cells to produce inflammatory cytokine via activation of cGAS-STING signaling. *Toxicol Lett*. 2022 Jan 12;358:6-16. doi: 10.1016/j.toxlet.2022.01.003. Epub ahead of print. PMID: 35032610.
- Luan Y, Edmonds ME, Woodruff TK, Kim SY. Inhibitors of apoptosis protect the ovarian reserve from cyclophosphamide. *J Endocrinol*. 2019 Feb 1;240(2):243-256. doi: 10.1530/JOE-18-0370. PMID: 30530902; PMCID: PMC6540791.
- Lv Y, Cao RC, Liu HB, Su XW, Lu G, Ma JL, Chan WY. Single-Oocyte Gene Expression Suggests That Curcumin Can Protect the Ovarian Reserve by Regulating the PTEN-AKT-FOXO3a Pathway. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 18;22(12):6570. doi: 10.3390/ijms22126570. PMID: 34207376; PMCID: PMC8235657.
- Mara JN, Zhou LT, Larmore M, Johnson B, Ayiku R, Amargant F, Pritchard MT, Duncan FE. Ovulation and ovarian wound healing are impaired with advanced reproductive age. *Aging (Albany NY)*. 2020 May 14;12(10):9686-9713. doi:

Referências

10.18632/aging.103237. Epub 2020 May 14. PMID: 32407290; PMCID: PMC7288922.

Marschalek J, Nouri K, Singhartinger FX, Hager M, Marschalek ML, Walch K, Ott J. The LH/AMH ratio as a predictive value for the outcome of assisted reproductive techniques. *European Gynecology and Obstetrics*. 2019 Jun;(1):43-47. https://www.esgynecology.org/wp-content/uploads/EGO-Journal-1_2019.pdf#page=45

Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*. 2012;58(1):44-50. doi: 10.1262/jrd.2011-012. PMID: 22450284.

Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science*. 2021 Nov 26;374(6571):1070-1075. doi: 10.1126/science.abi5200. Epub 2021 Nov 25. PMID: 34822279.

Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijzer J, Teerds KJ. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol Reprod*. 2018 Oct 1;99(4):853-863. doi: 10.1093/biolre/i0y116. PMID: 29767707.

Mohamed ML, Nouh AA, El-Behery MM, Mansour SA. Effect on ovarian reserve of laparoscopic bipolar electrocoagulation versus laparotomic hemostatic sutures during unilateral ovarian cystectomy. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011 Jul;114(1):69-72. doi: 10.1016/j.ijgo.2011.01.010. Epub 2011 Apr 6. PMID: 21474134.

Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, Monget P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? *Biol Reprod*. 2014 Apr 25;90(4):85. doi: 10.1095/biolreprod.113.117077. PMID: 24599291.

MONNIAUX D. Factors influencing establishment of the ovarian reserve and their effects on fertility. 10. *International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS)*, Foz do Iguacu, Brazil. 2018.

Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Nov 1;105(11):3361–73. doi: 10.1210/clinem/dgaa513. PMID: 32770239; PMCID: PMC7486884.

Referências

Namavar Jahromi B MD, Parsanezhad ME MD, Shomali Z MD, Bakhshai P MD, Alborzi M MD, Moin Vaziri N MD PhD, Anvar Z PhD. Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Narrative Review of Its Pathophysiology, Risk Factors, Prevention, Classification, and Management. *Iran J Med Sci.* 2018 May;43(3):248-260. PMID: 29892142; PMCID: PMC5993897.

Nascimento BR, Lopes GAG, Freitas DS, Campos-Junior PHA. Ectopic autologous transplantation of ovarian tissue as a feasible technique to assess ovarian morphophysiology. *Zygote.* 2021 Sep 29:1-3. doi: 10.1017/S0967199421000757. Epub ahead of print. PMID: 34583802.

Neglia G, Gasparini B, Vecchio D, Boccia L, Varricchio E, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. *Anim Reprod Sci.* 2011 Feb;123(3-4):180-6. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.01.011. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21306842.

Nicholls PK, Schorle H, Naqvi S, Hu YC, Fan Y, Carmell MA, Dobrinski I, Watson AL, Carlson DF, Fahrenkrug SC, Page DC. Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Dec 17;116(51):25677-25687. doi: 10.1073/pnas.1910733116. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31754036; PMCID: PMC6925976.

Niu W, Spradling AC. Two distinct pathways of pregranulosa cell differentiation support follicle formation in the mouse ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Aug 18;117(33):20015-20026. doi: 10.1073/pnas.2005570117. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32759216; PMCID: PMC7443898.

Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 2018 Oct 29;30(11):511-528. doi: 10.1093/intimm/dxy054. PMID: 30165385.

Ortega-Hrepich C, Polyzos NP, Anckaert E, Guzman L, Tournaye H, Smitz J, De Vos M. The effect of ovarian puncture on the endocrine profile of PCOS patients who undergo IVF. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Feb 24;12:18. doi: 10.1186/1477-7827-12-18. PMID: 24564914; PMCID: PMC3936928.

Pajokh M, Mesbah F, Bordbar H, Talaei-Khozani T. Different cell death types determination in juvenile mice ovarian follicles. *Iran J Vet Res.* 2018 Fall;19(4):298-303. PMID: 30774671; PMCID: PMC6361600.

Pereira LAAC, Nascimento BR, Jorge EC, Segatelli TM, Coutinho LL, Viana JHM, Campos-Junior PHA. Vitrification leads to transcriptomic modifications of mice ovaries that do not affect folliculogenesis progression. *Reprod Biol.* 2020 Jun;20(2):264-272. doi: 10.1016/j.repbio.2020.02.001. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32044207.

Rankin JA. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues.* 2004

Referências

Jan-Mar;15(1):3-17. doi: 10.1097/00044067-200401000-00002. PMID: 14767362.

Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016;58:167-90. doi: 10.1007/978-3-319-31973-5_7. PMID: 27300179.

Robb CT, Regan KH, Dorward DA, Rossi AG. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin Immunopathol.* 2016 Jul;38(4):425-48. doi: 10.1007/s00281-016-0560-6. Epub 2016 Apr 27. PMID: 27116944; PMCID: PMC4896979.

Rodrigues P, Limback D, McGinnis L, Marques M, Aibar J, Plancha CE. Germ-Somatic Cell Interactions Are Involved in Establishing the Follicle Reserve in Mammals. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 14;9:674137. doi: 10.3389/fcell.2021.674137. PMID: 34195191; PMCID: PMC8236641.

Rossi RO, Costa JJ, Silva AW, Saraiva MV, Van den Hurk R, Silva JR. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. *Zygote.* 2016 Feb;24(1):1-17. doi: 10.1017/S096719941400077X. Epub 2015 Jan 23. PMID: 25613521.

Rowley JE, Amargant F, Zhou LT, Galligos A, Simon LE, Pritchard MT, Duncan FE. Low Molecular Weight Hyaluronan Induces an Inflammatory Response in Ovarian Stromal Cells and Impairs Gamete Development In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 4;21(3):1036. doi: 10.3390/ijms21031036. PMID: 32033185; PMCID: PMC7036885.

Schoppmeyer R, Buul DJ. The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. *Current Opinion in Physiology*, 2021. Volume 19, February 2021, Pages 1-9 <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.06.003>

Seifert EL, Caron AZ, Morin K, Coulombe J, He XH, Jardine K, Dewar-Darch D, Boekelheide K, Harper ME, McBurney MW. SirT1 catalytic activity is required for male fertility and metabolic homeostasis in mice. *FASEB J.* 2012 Feb;26(2):555-66. doi: 10.1096/fj.11-193979. Epub 2011 Oct 17. PMID: 22006156.

Shen X, Long H, Guo W, Gao H, Cai R, Jin W, Yan Z, Zhang S, Wang Y, Lyu Q, Wang L, Kuang Y. Optimal Ovulation Trigger-Oocyte Pickup Interval in Progesterone-Primed Ovarian Stimulation Protocol: A Retrospective Study Using Propensity Score Matching. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Oct 15;10:694. doi: 10.3389/fendo.2019.00694. PMID: 31681169; PMCID: PMC6803448.

Silber S, Pineda J, Lenahan K, DeRosa M, Melnick J. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. *Reprod Biomed Online.*

Referências

2015 Jun;30(6):643-50. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.02.010. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25892498.

Silva BLM, Adona PR, Guemra S, Monzani S, Miranda MS. Ovum Pick Up: Cows Treated With Single Doses of Follicle Stimulating Hormone. *Journal of Agricultural Science*. 2019 Apr v. 11(10), p. 231-239, 2019. doi: 10.5539/jas.v11n10p231 URL: <https://doi.org/10.5539/jas.v11n10p231>.

Skory RM, Xu Y, Shea LD, Woodruff TK. Engineering the ovarian cycle using in vitro follicle culture. *Hum Reprod*. 2015 Jun;30(6):1386-95. doi: 10.1093/humrep/dev052. Epub 2015 Mar 16. PMID: 25784584; PMCID: PMC4447886.

Snider AP, Wood JR. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction*. 2019 Sep;158(3):R79-R90. doi: 10.1530/REP-18-0583. PMID: 30999278.

Strączyńska P, Papis K, Morawiec E, Czerwiński M, Gajewski Z, Olejek A, Bednarska-Czerwińska A. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Feb 24;20(1):37. doi: 10.1186/s12958-022-00906-5. PMID: 35209923; PMCID: PMC8867761.

Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends Immunol*. 2019 Mar;40(3):212-227. doi: 10.1016/j.it.2019.01.007. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30772190.

Sun YC, Sun XF, Dyce PW, Shen W, Chen H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci*. 2017 Mar 11;13(4):449-457. doi: 10.7150/ijbs.18836. PMID: 28529453; PMCID: PMC5436565.

Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, Samant S, Vasudevan P, Parekh V, Raghuraman H, Cunningham JM, Gupta M, Gupta MP. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal*. 2011 Jul 19;4(182):ra46. doi: 10.1126/scisignal.2001465. PMID: 21775285.

Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y, Kawamura K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):608-15. doi: 10.1093/humrep/deu353. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25567618.

Viana JHM, Nascimento AA, Pinheiro NL, Ferreira AM, Camargo LSA, Sá WF, Marques JÚNIOR AP. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. 2003.

Referências

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000300004P>

Viana JH, Palhao MP, Siqueira LG, Fonseca JF, Camargo LS. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*. 2010 Apr 15;73(7):966-72. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.025. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20071017.

Voronina E, Lovasco LA, Gyuris A, Baumgartner RA, Parlow AF, Freiman RN. Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit TAF4b. *Dev Biol*. 2007 Mar 15;303(2):715-26. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.011. Epub 2006 Dec 9. PMID: 17207475; PMCID: PMC1950739.

Walls ML, Hart RJ. In vitro maturation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Nov;53:60-72. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.06.004. Epub 2018 Jun 28. PMID: 30056110.

Wagner M, Yoshihara M, Douagi I, Damdimopoulos A, Panula S, Petropoulos S, Lu H, Pettersson K, Palm K, Katayama S, Hovatta O, Kere J, Lanner F, Damdimopoulou P. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. *Nat Commun*. 2020 Mar 2;11(1):1147. doi: 10.1038/s41467-020-14936-3. PMID: 32123174; PMCID: PMC7052271.

Wang X, Wang W, Qu Q, Zhang N, Hao C, Ma D. Effect of large follicle puncture on IVF-ET outcome in patients with unsynchronized follicle maturation. *Can J Int Med Res*. 2019 May;47(5):2056-2066. doi: 10.1177/0300060519831178. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30898000; PMCID: PMC6567766.

Wu LL, Russell DL, Wong SL, Chen M, Tsai TS, St John JC, Norman RJ, Febbraio MA, Carroll J, Robker RL. Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development*. 2015 Feb 15;142(4):681-91. doi: 10.1242/dev.114850. PMID: 25670793.

Xie Q, Xiong X, Xiao N, He K, Chen M, Peng J, Su X, Mei H, Dai Y, Wei D, Lin G, Cheng L. Mesenchymal Stem Cells Alleviate DHEA-Induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by Inhibiting Inflammation in Mice. *Stem Cells Int*. 2019 Sep 12;2019:9782373. doi: 10.1155/2019/9782373. PMID: 31611920; PMCID: PMC6757294.

Referências

Xu F, Lawson MS, Campbell SP, Tkachenko OY, Park BS, Bishop CV, Xu J. Stage-dependent actions of antimüllerian hormone in regulating granulosa cell proliferation and follicular function in the primate ovary. *F S Sci*. 2020 Nov;1(2):161-171. doi: 10.1016/j.xfss.2020.10.005. Epub 2020 Oct 13. PMID: 34355206; PMCID: PMC8329754.

Zhang H, Liu K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Hum Reprod Update*. 2015 Nov-Dec;21(6):779-86. doi: 10.1093/humupd/dmv037. Epub 2015 Jul 30. PMID: 26231759.

Zhang Y, Yan Z, Qin Q, Nisenblat V, Chang HM, Yu Y, Wang T, Lu C, Yang M, Yang S, Yao Y, Zhu X, Xia X, Dang Y, Ren Y, Yuan P, Li R, Liu P, Guo H, Han J, He H, Zhang K, Wang Y, Wu Y, Li M, Qiao J, Yan J, Yan L. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. *Mol Cell*. 2018 Dec 20;72(6):1021-1034.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.029. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30472193.

Zhang J, Xu Y, Liu H, Pan Z. MicroRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Jan 10;17(1):9. doi: 10.1186/s12958-018-0450-y. PMID: 30630485; PMCID: PMC6329178.

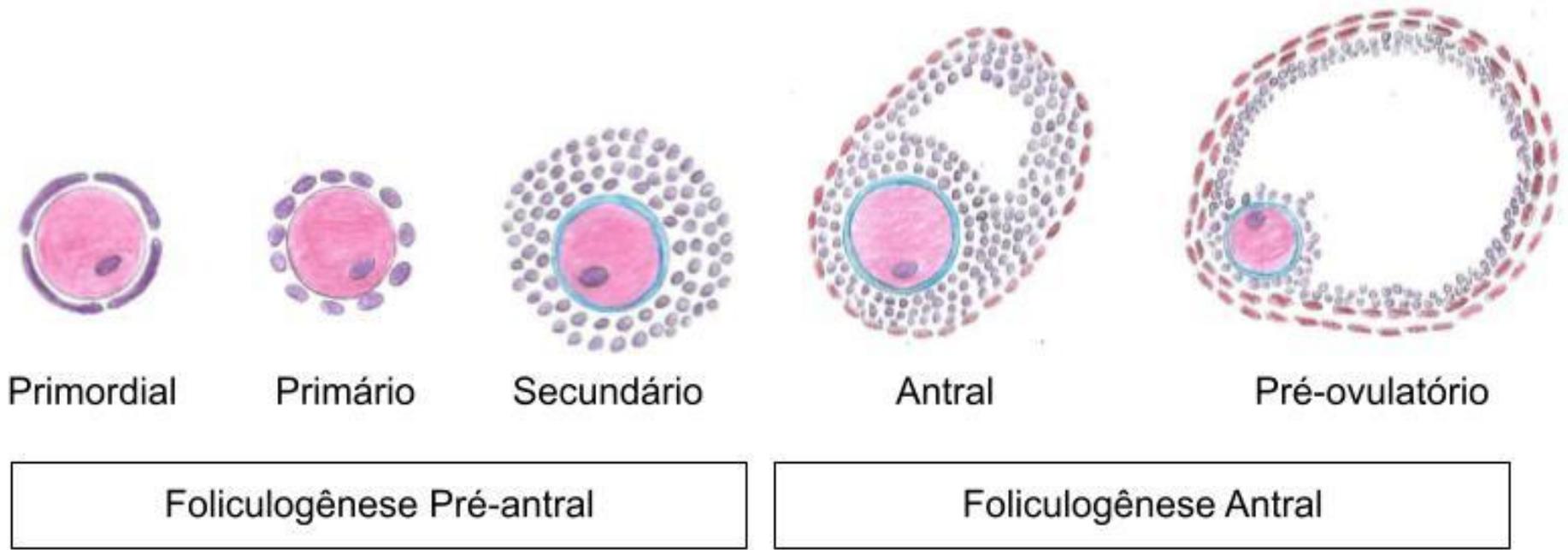


Figura 1. Representação esquemática dos estágios do crescimento folicular murino.

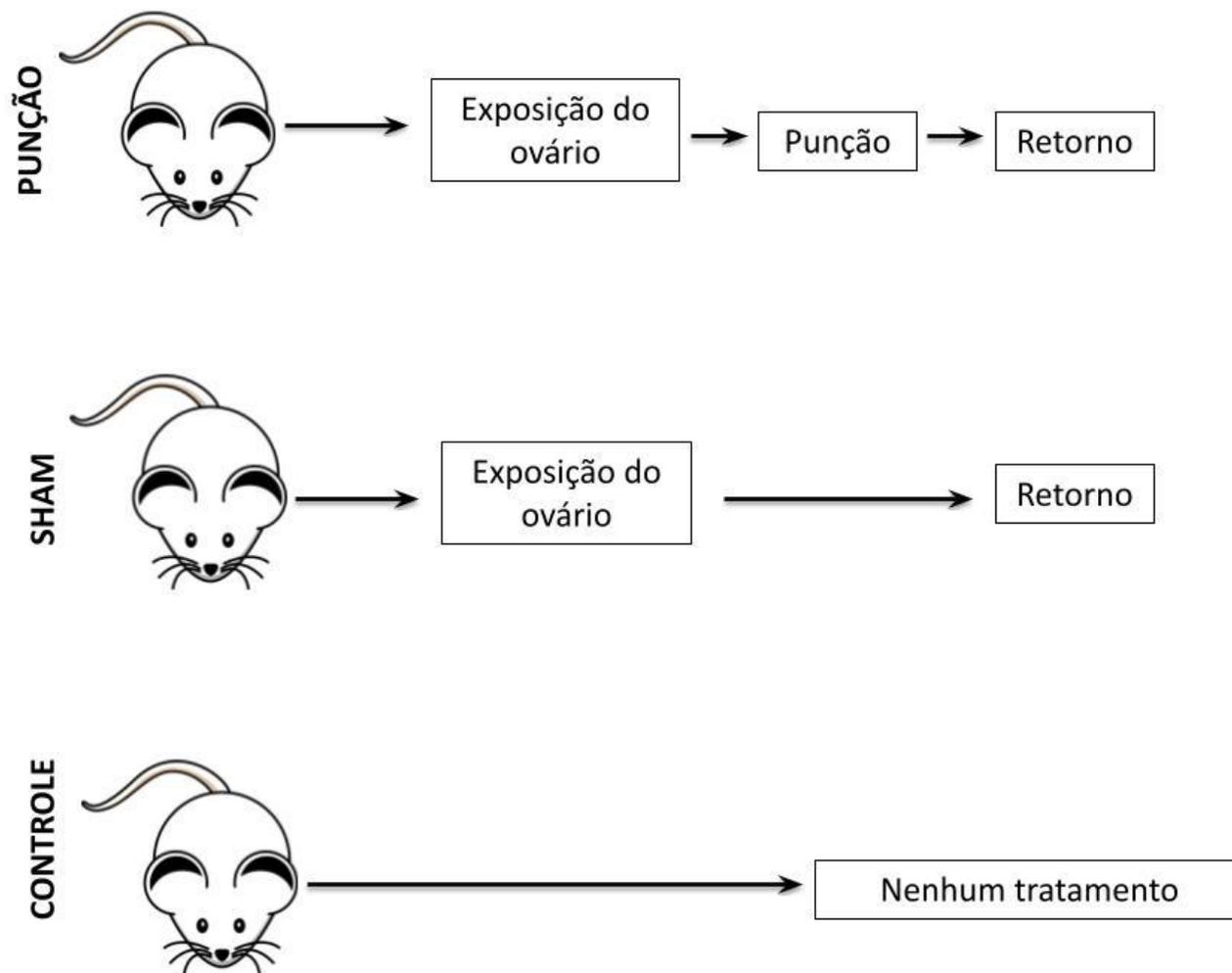
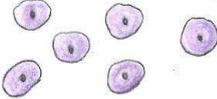


Figura 2. Delineamento experimental dos procedimentos realizados nos animais dos grupos Controle, Sham e Punção.

Fase	Características	
Proestro	+CN	
Estro	+CEC - CN	
Metaestro	+CEC e L	
Diestro	++ L	

-  Célula nucleada (CN)
-  Célula epitelial cornificada (CEC)
-  Leucócito (L)

Figura 3. Representação esquemática dos critérios utilizados para avaliação da dinâmica do ciclo estral, indicando os tipos celulares presentes em cada fase do ciclo estral e suas proporções.

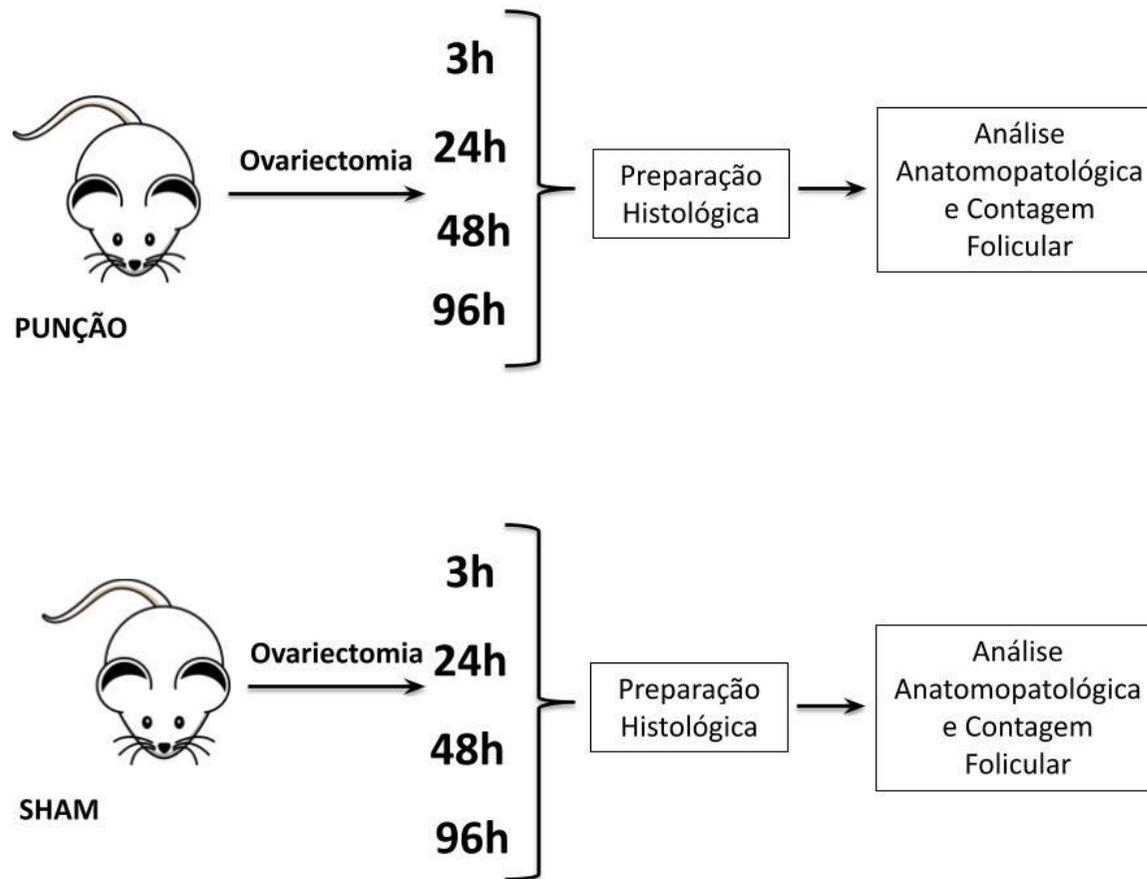


Figura 4. Delineamento experimental da análise anatomopatológica realizada nos grupos Sham e Tratado, indicando o tempo em horas que os ovários foram coletados.

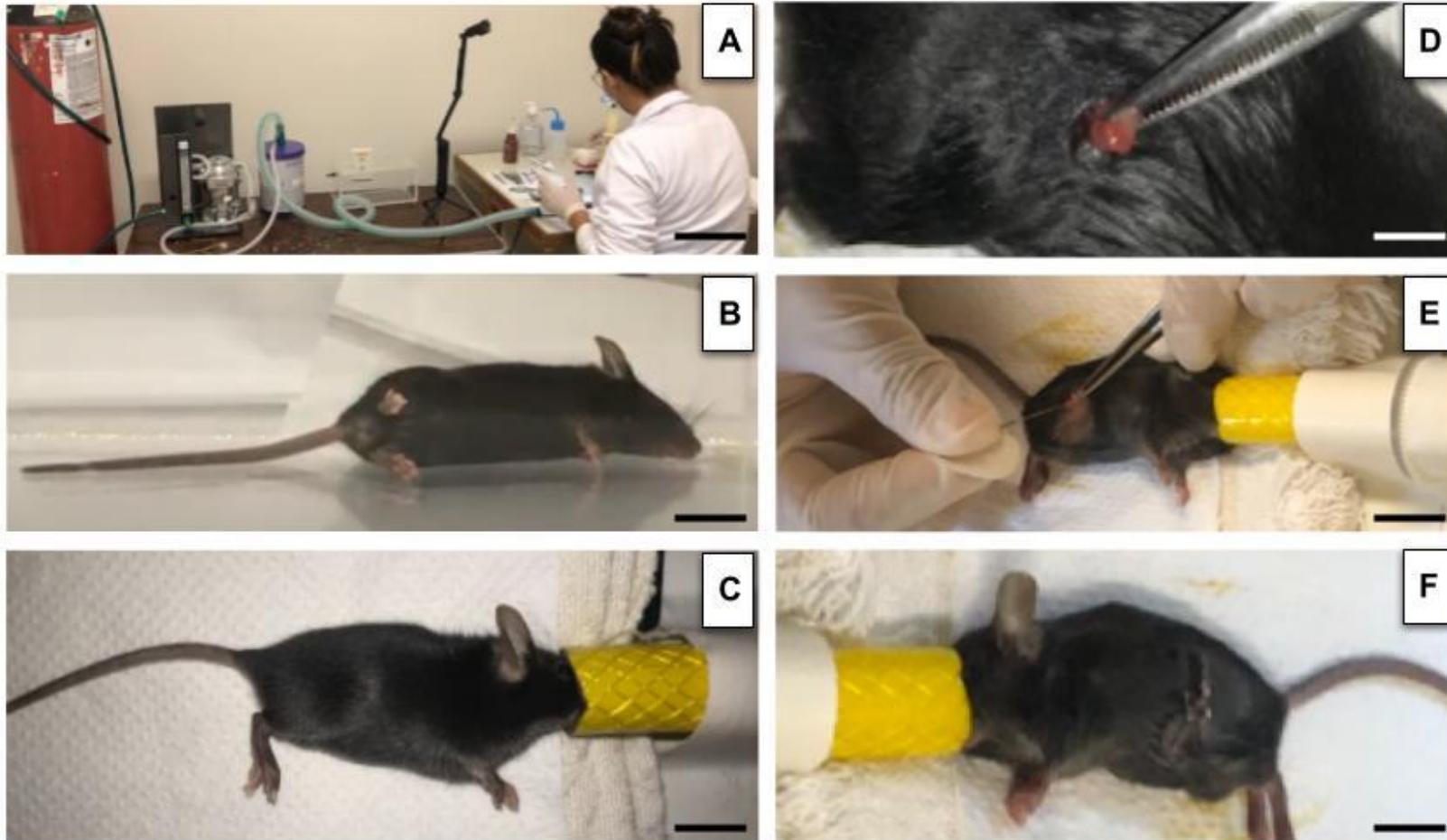


Figura 5. Representação das principais etapas do procedimento experimental de punção ovariana em camundongos. Em A é possível observar o aparato utilizado para anestesia inalatória. (B) Camundongo anestesiado. (C) Animal no aparato de manutenção da anestesia. (D) Ovário exposto. (E) Punção ovariana, seta vermelha aponta agulha de acupuntura (0,25 mm) utilizada para perfuração. (F) Animal suturado e com clip cirúrgico. Barras: A= 20 cm, B= 3 cm, C = 2,9 cm, D = 1 cm, E= 3,8 cm e F= 2,8 cm.

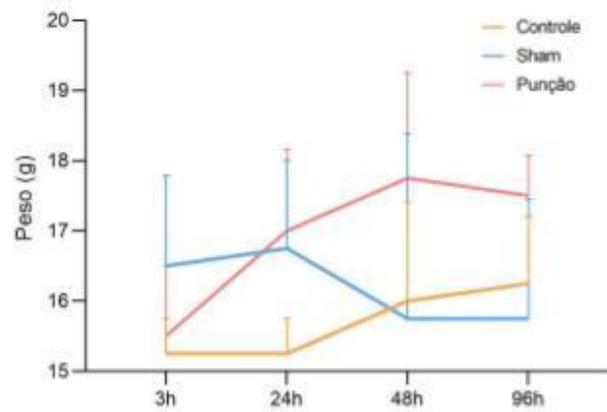


Figura 6. O procedimento experimental de punção ovariana não alterou parâmetros biométricos de camundongos. Não foram identificadas diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos Punção, Sham e Controle com relação ao peso corporal (C).

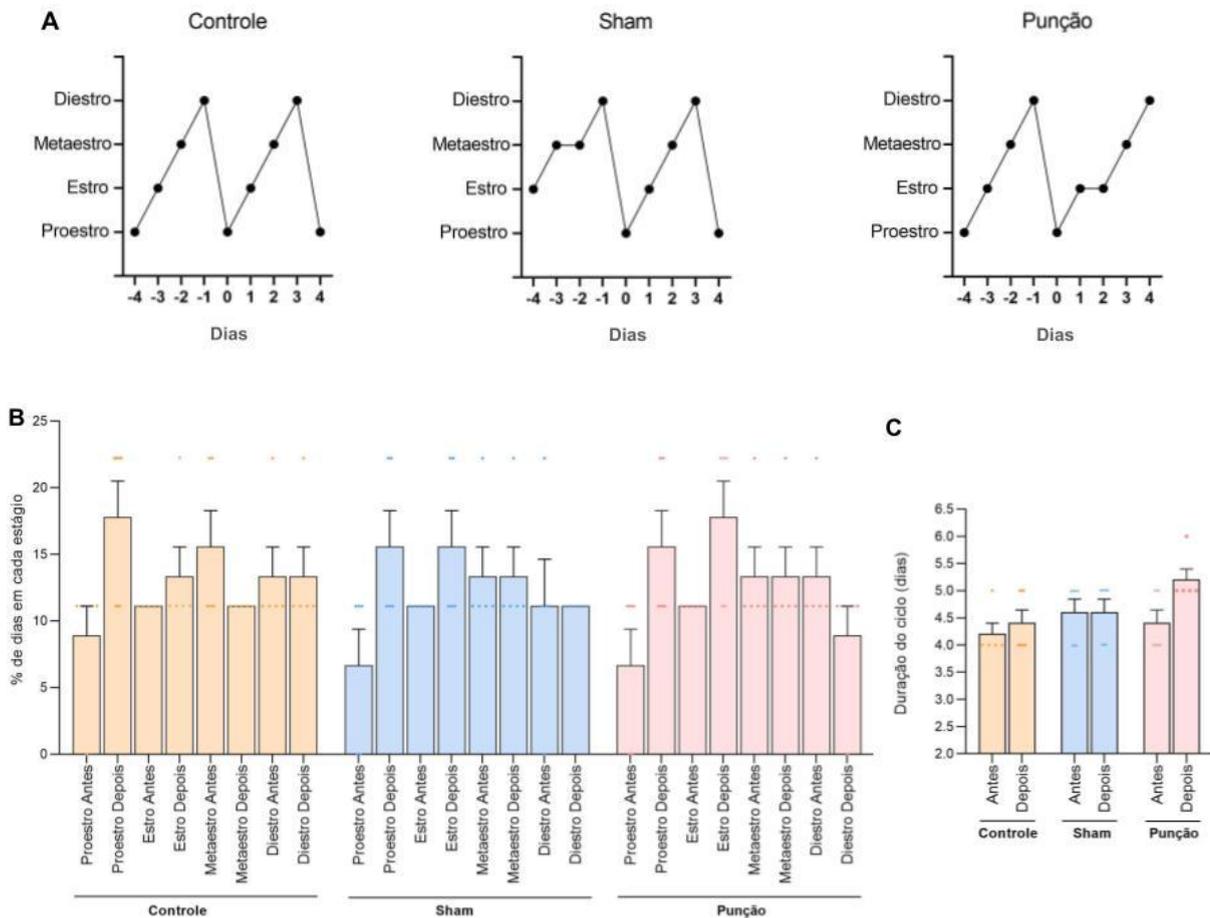


Figura 7. Resultados obtidos através da análise da dinâmica do ciclo estral, de maneira geral a punção não afetou parâmetros associados a ciclicidade dos animais. Em A pode ser observado que os animais de todos os grupos (C - Controle, S - Sham e P - Punção) mantiveram a sua ciclicidade após o procedimento (D0). Em B é possível observar que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) com relação ao percentual de dias em cada estágio do ciclo entre os grupos antes e depois do tratamento e entre os grupos. O gráfico C representa que não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos antes e depois do tratamento com relação à duração do ciclo estral.

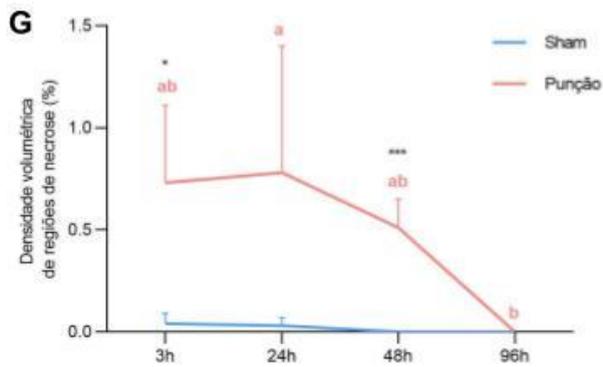
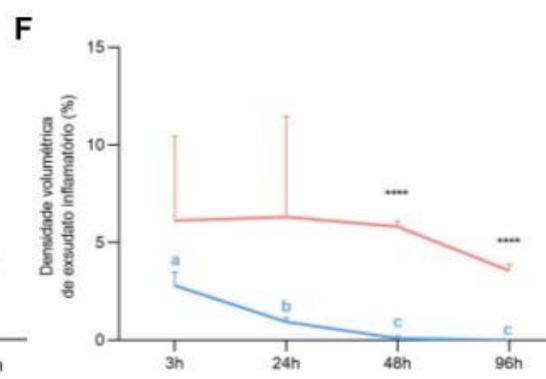
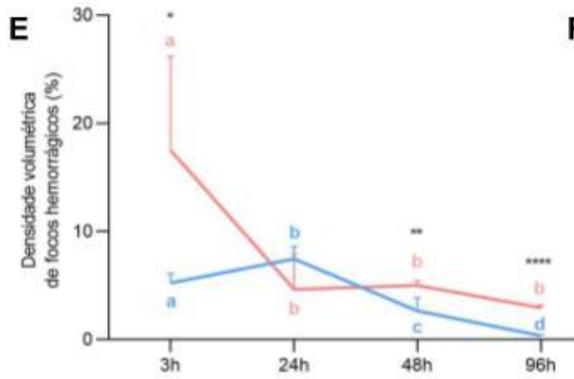
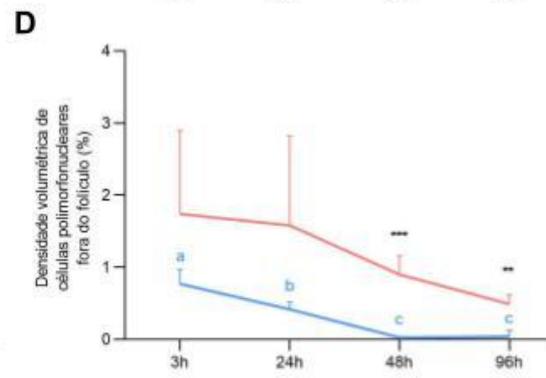
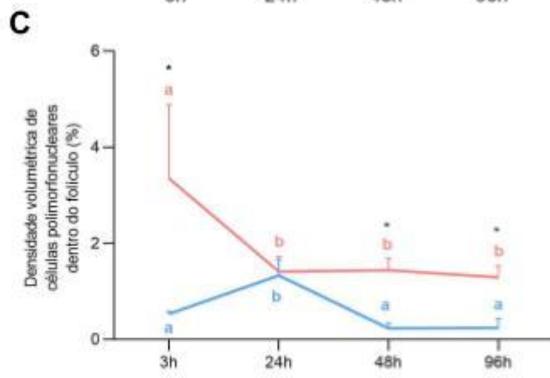
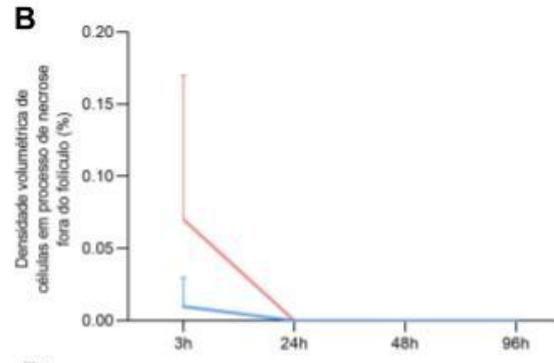
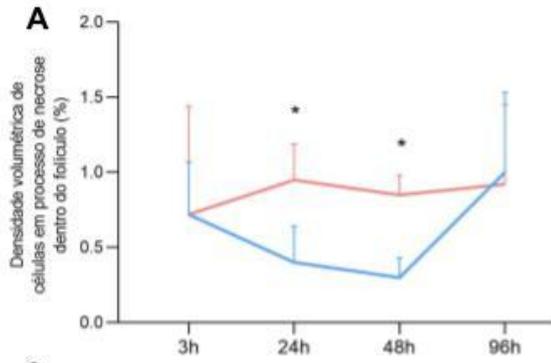


Figura 8. Os gráficos representam os resultados da análise de variância entre os diferentes tempos dentro do mesmo grupo (diferença estatística indicada por letras) Sham e Punção e do teste t entre os diferentes grupos dentro do mesmo tempo (diferença estatística indicada por *). Em A houve diferença estatística entre o grupo Punção e Sham nos tempos de 24h ($p= 0,0121$) e 48h ($p= 0,0329$), sendo que o grupo Punção obteve uma maior densidade volumétrica de células em degeneração dentro do folículo com relação ao grupo Sham. B demonstra que as células em degeneração fora do folículo estão presentes em ambos os grupos no tempo de 3h. Em C, a densidade de células polimorfonucleares dentro do folículo é maior no grupo Punção nos tempos 3h ($p= 0,0102$), 48h ($p= 0,0001$) e 96h ($p= 0,0005$) comparado ao Sham, sendo que dentro do grupo Punção é maior no tempo de 3h ($p= 0,0024$) comparado aos demais tempos e no grupo Sham é maior em 24h ($p= 0,0014$) comparado aos demais tempos. Em D há uma redução das células polimorfonucleares fora do folículo ao longo do tempo dentro dos grupos Sham e Punção, sendo que essas células estão em maior densidade no grupo Punção comparado ao Sham, principalmente nos tempos de 48h ($p= 0,0412$) e 96h ($p= 0,0480$). O gráfico E representa os dados relacionados a densidade volumétrica de hemorragia, observa-se que é maior no grupo Punção nos tempos 3h ($p= 0,0308$), 48h ($p= 0,0097$) e 96h ($p= 0,0001$) comparado ao Sham, sendo que dentro do grupo Punção é maior no tempo de 3h comparado aos demais tempos e no grupo Sham é maior em 24h comparado aos demais tempos. F representa a densidade volumétrica de edema, houve diferença entre os grupos nos tempos de 48h ($p= 0,0001$) e 96h ($p= 0,0001$), sendo que foi maior no grupo Punção comparado ao Sham. G demonstra que a densidade volumétrica de necrose diminui significativamente ao longo do tempo dentro do grupo Punção e é maior neste grupo comparado ao Sham nos tempos de 3h ($p= 0,0114$) e 48h ($p= 0,0003$).

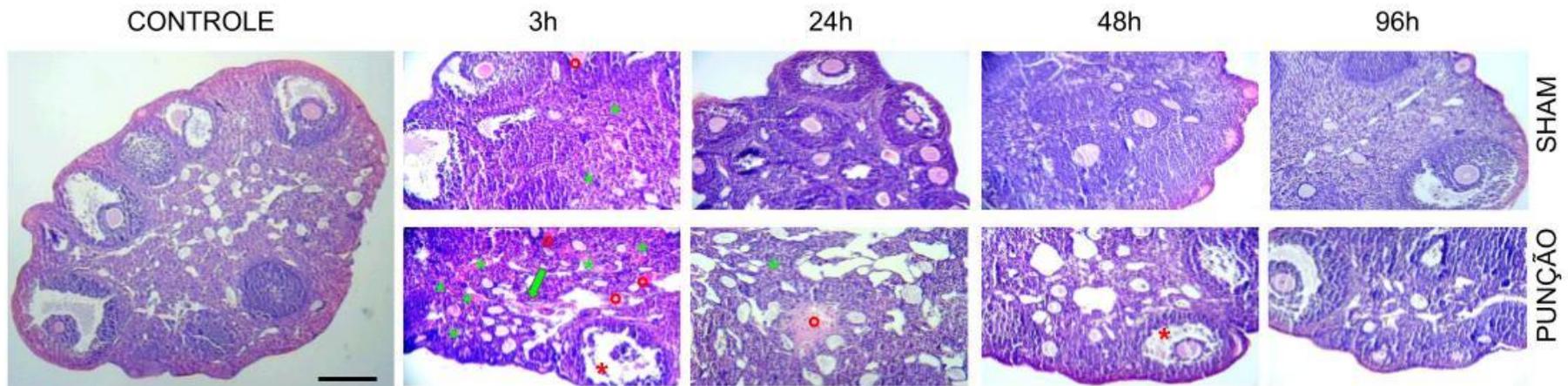


Figura 9. Representação da histologia ovariana relacionada à análise anatomopatológica (Controle 10x; Sham e Punção 40x). Observa-se uma maior densidade de elementos associados ao processo inflamatório no grupo Punção. Os asteriscos vermelhos apontam as regiões com células em processo de morte celular, os asteriscos verdes indicam regiões com focos hemorrágicos, os círculos vermelhos indicam regiões de exsudato inflamatório com infiltrado de células polimorfonucleares e a seta verde aponta região de necrose. Barra= 250 um.

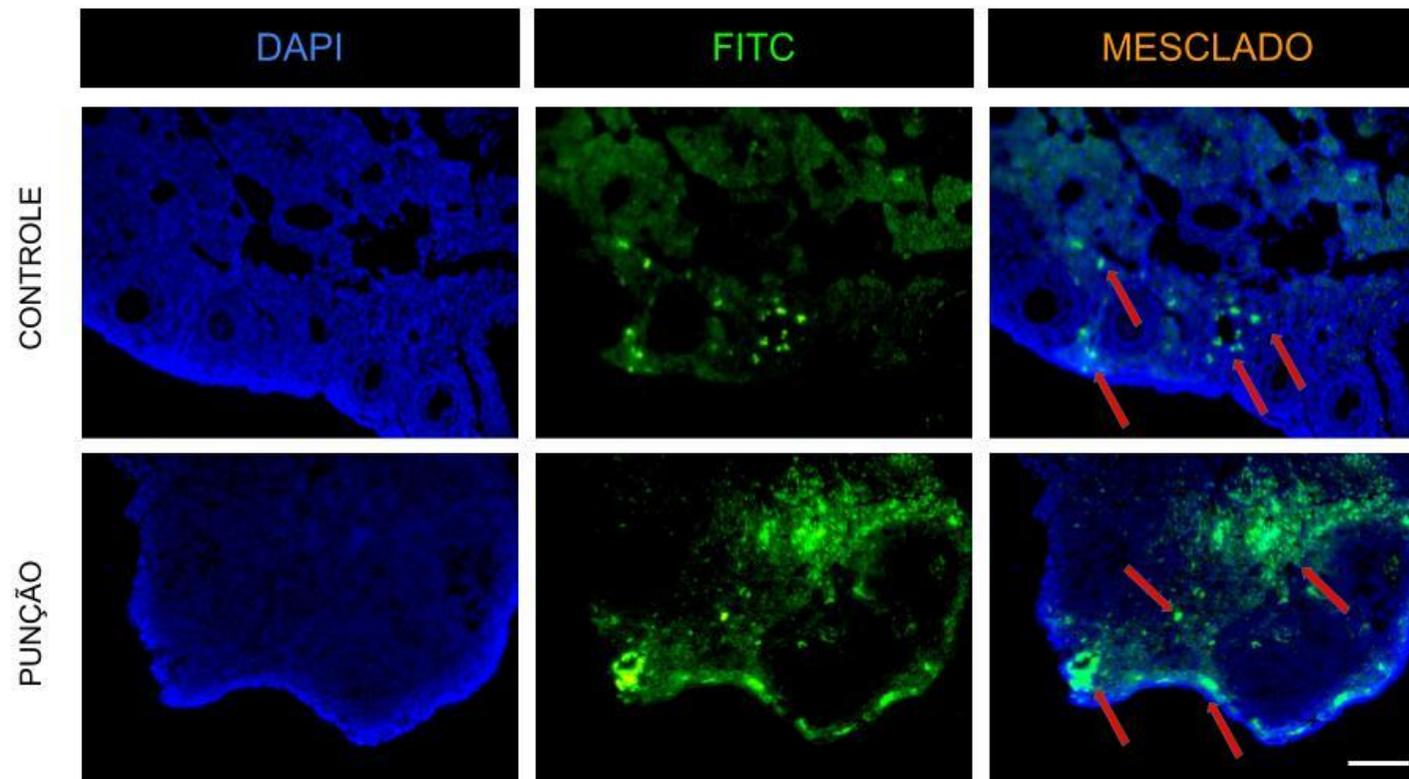


Figura 10. Imunofluorescência F480 (40x). Foi possível observar que, qualitativamente, o grupo punção apresentou uma maior quantidade de células marcadas pelo anticorpo. As imagens demonstram diferença qualitativa entre os grupos Punção e Controle com relação à marcação de macrófagos, sendo que o grupo Punção apresentou, qualitativamente, uma maior marcação para este tipo celular. As setas vermelhas apontam populações de macrófagos. Barra= 250 um.

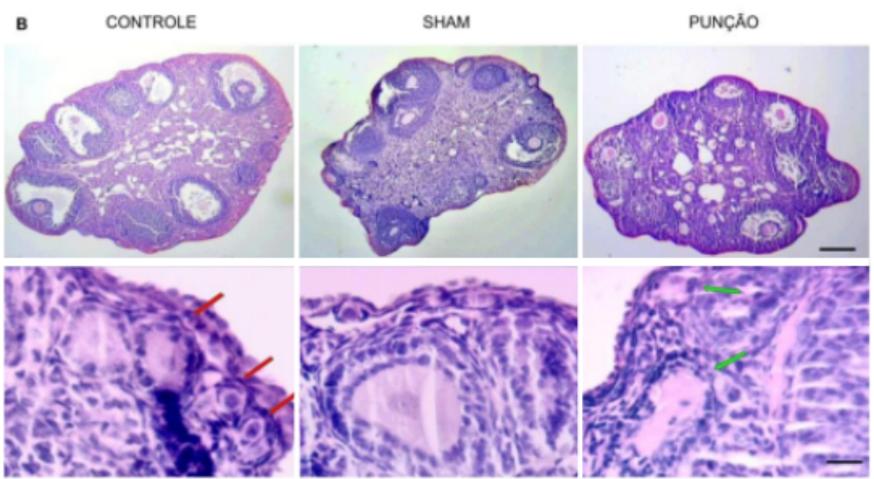
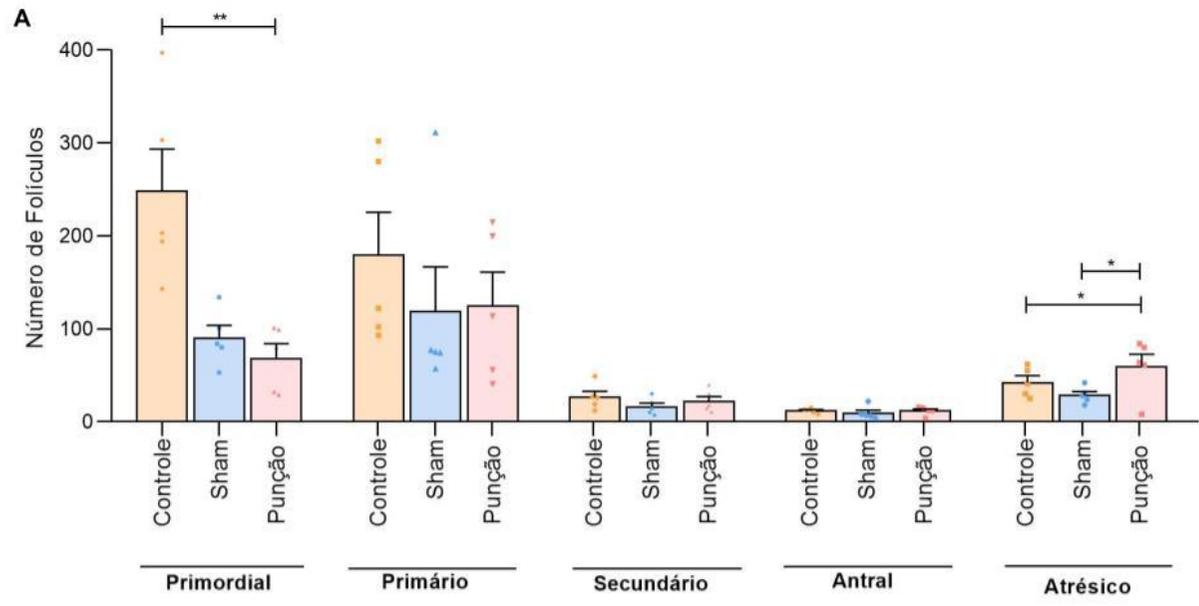


Figura 11. Os dados obtidos através da contagem folicular demonstram que o procedimento afetou aspectos foliculares dos animais, principalmente com relação aos folículos primordiais e atrésicos. A mostra que houve diferença estatística com relação aos folículos primordiais, sendo que houve uma menor contagem no grupo Punção comparado ao Controle ($p=0,0080$). Houve diferença estatística com relação aos folículos atrésicos, sendo que houve uma maior contagem no grupo Punção comparado ao Sham e ao Controle ($p=0,0118$). A imagem B demonstra a histologia ovariana, as setas vermelhas apontam folículos primordiais (em maior quantidade no grupo Controle) e as setas verdes apontam folículos atrésicos (em maior quantidade no grupo punção). Barra superior= 250um, Barra inferior= 80um.

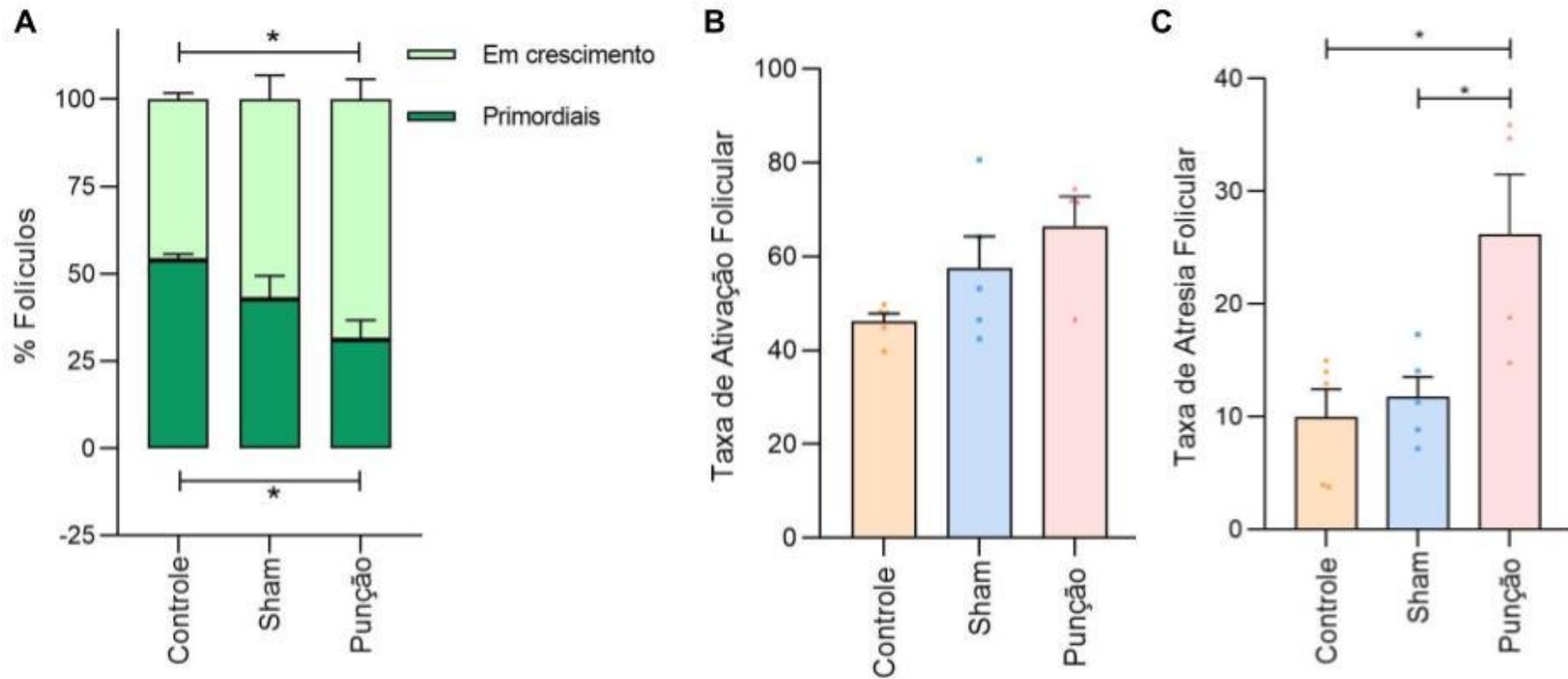


Figura 12. Os dados demonstram que o procedimento afeta parâmetros relacionado à ativação e atresia folicular. O gráfico A representa o percentual de folículos primordiais e em crescimento entre os grupos, de maneira complementar foi observada diferença significativa entre os grupos Punção e Controle, sendo que o grupo Punção obteve um menor percentual de folículos primordiais ($p= 0,0080$) e um maior percentual de folículos em crescimento ($p= 0,0070$). B representa a taxa de ativação folicular. O gráfico C representa a taxa de atresia folicular, que de maneira complementar apresenta diferença significativa entre os grupos, sendo que o grupo Punção obteve uma maior taxa de atresia comparado ao Sham ($p= 0,0273$) e ao Controle ($p= 0,0142$).

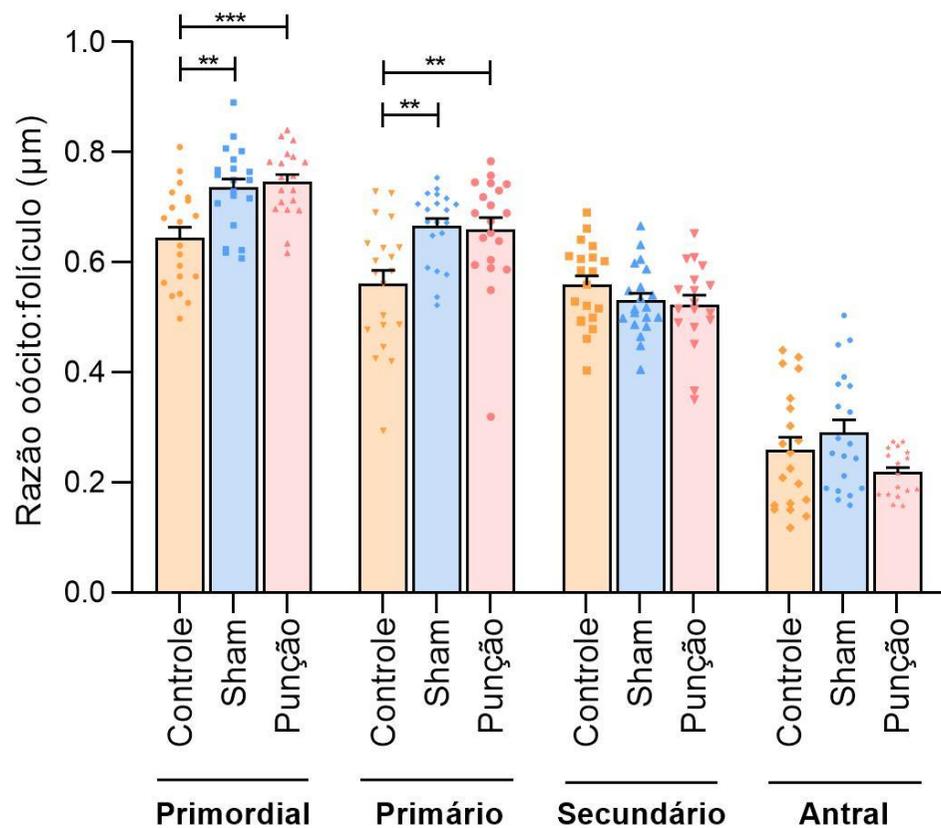


Figura 13. Resultados obtidos a partir da análise do diâmetro folicular, foi observado que a morfometria dos folículos primários e primários foi modificada pela punção ovariana. A razão oócito: folículo obteve diferença significativa com relação aos folículos primordiais e primários, sendo que em ambos o grupo Punção apresentou uma maior razão comparado aos grupos Sham ($p= 0,0013$ e $0,0034$) e Controle ($p= 0,0004$ e $0,0063$).

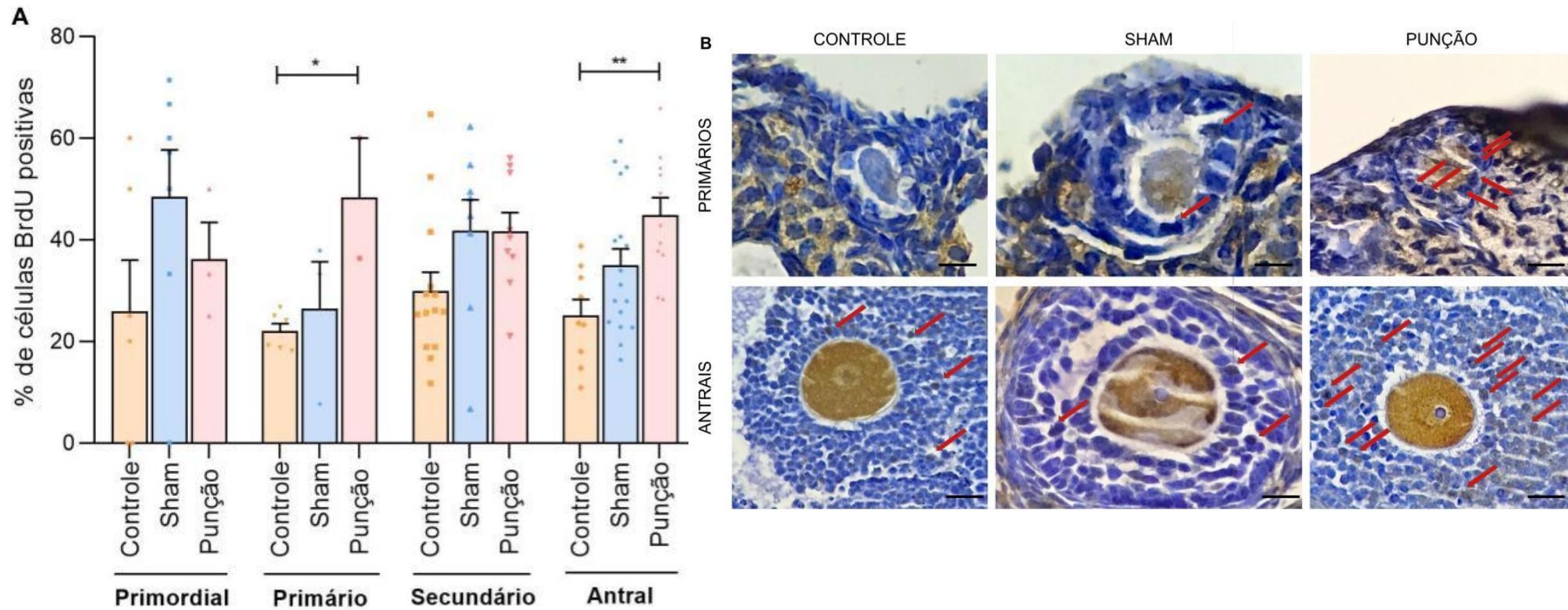


Figura 14. O gráfico A representa os resultados obtidos através da análise de variância do percentual de células BrdU positivas entre os grupos Controle, Sham e Punção com relação às diferentes classes de folículos. Foi observada diferença significativa com relação aos folículos primários ($p=0,0082$) e antrais ($p=0,0031$), sendo que o grupo Punção obteve uma maior porcentagem dessas células comparado ao Controle. B representa a histologia associada aos

folículos primários (100x) e antrais (40x), as setas apontam as células marcadas pelo anticorpo. Foi observada uma maior marcação de células BrdU positivas no grupo Punção. Barras superiores= 120um, Barras inferiores= 20um, 50um e 20um.

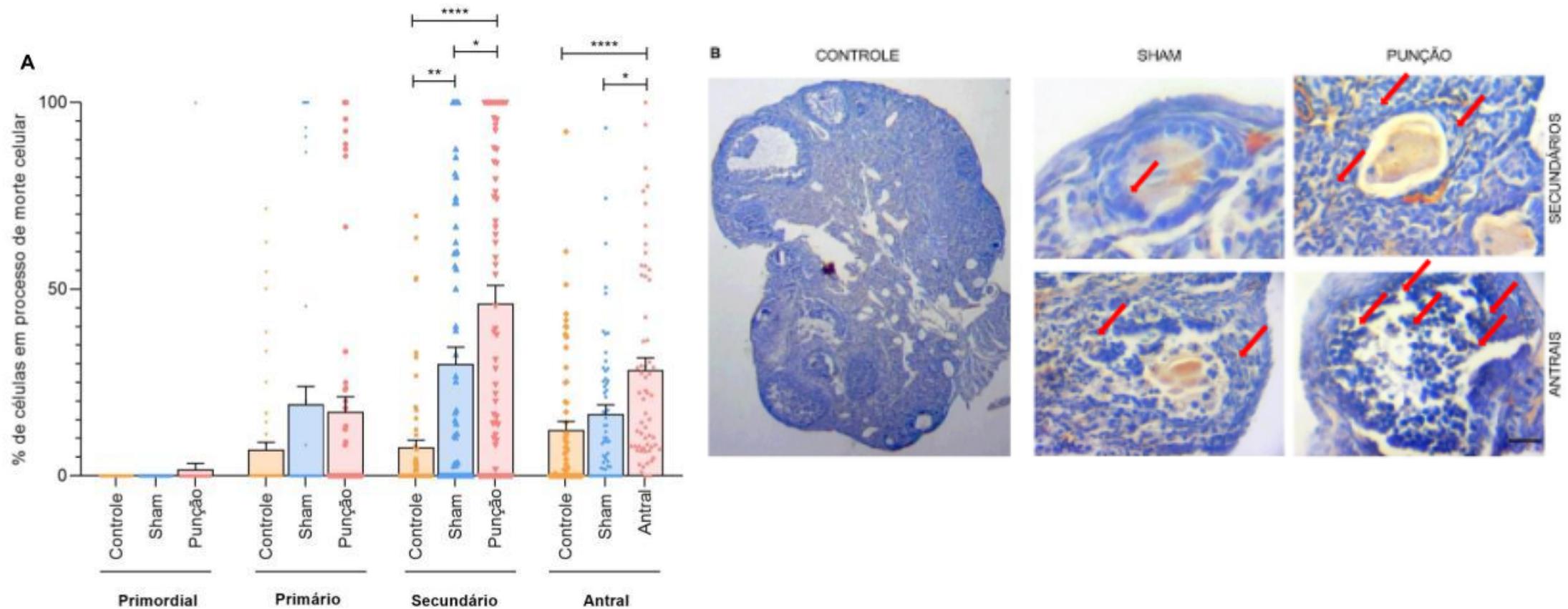


Figura 15. A análise de atresia folicular indica que o procedimento de punção ovariana provoca morte celular nos folículos em estágios mais avançados de crescimento (secundários e antrais). O gráfico A representa os resultados da análise estatística relacionada ao percentual de células em processo de morte celular na dinâmica folicular entre os diferentes grupos. Houve diferenças estatisticamente significativas com relação aos folículos secundários e antrais, sendo que o grupo Punção obteve uma maior porcentagem de células em processo de morte celular comparado aos grupos Sham ($p= 0,0341$) e Controle ($p< 0,0001$) e o grupo Sham com relação ao Controle ($p= 0,0023$) nos folículos secundários e nos folículos antrais o grupo Punção apresentou um maior

percentual destas células comparado ao grupo Sham ($p= 0,0100$) Controle ($p< 0,0001$). B demonstra a histologia ovariana através da marcação com caspase3, é possível observar uma maior quantidade de células em processo de morte celular no grupo Punção.. Barra lateral= 250um, Barras superiores= 50um e Barras inferiores = 20um.

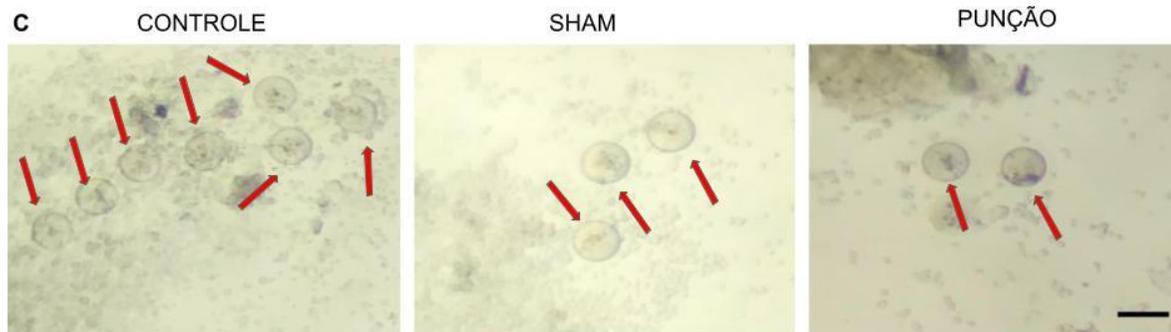
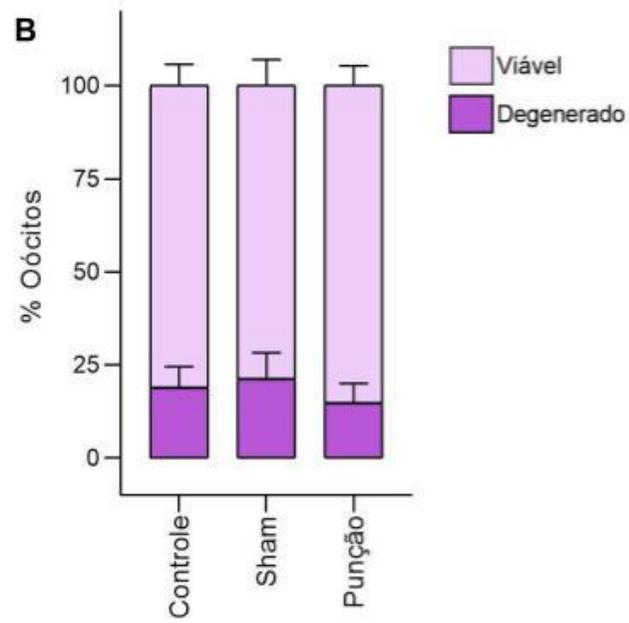
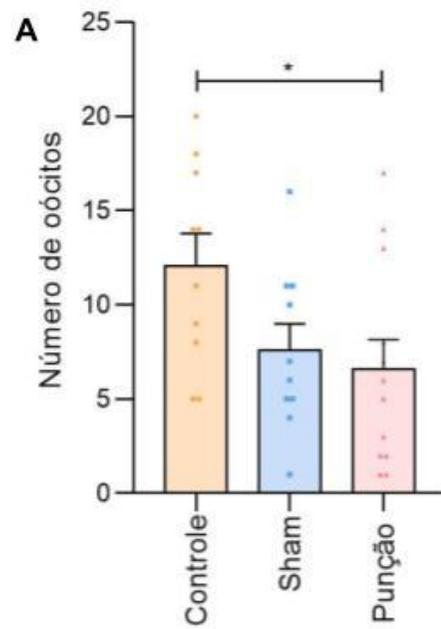
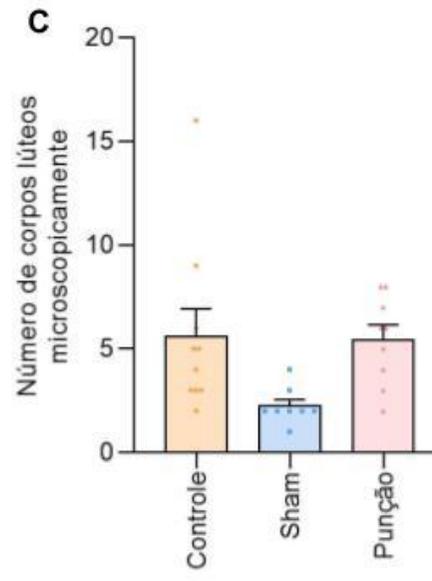
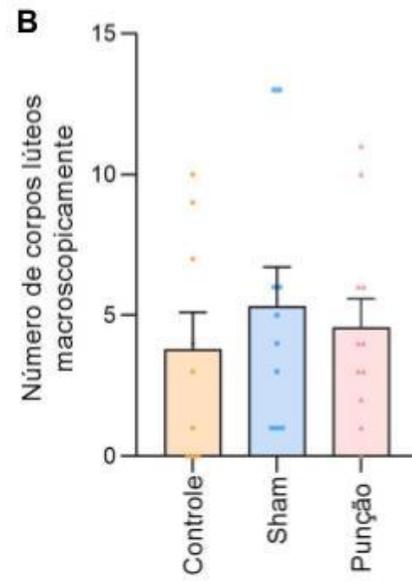
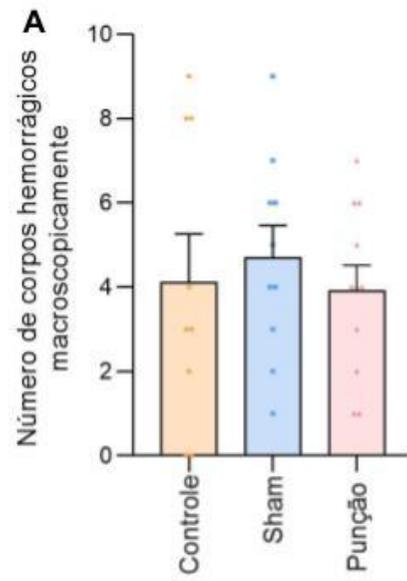
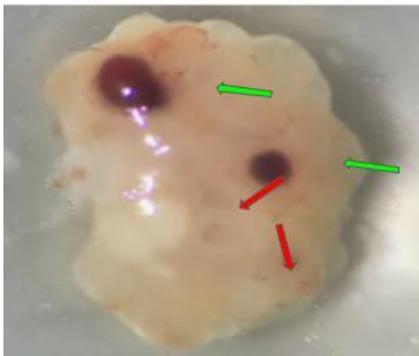


Figura 16. Dados obtidos através do ensaio de superovulação, apesar de ter sido observada uma redução relacionada a quantidade de oócitos coletados, a qualidade não foi alterada pelo procedimento. A mostra que o grupo Punção obteve uma menor recuperação oocitária comparada ao grupo Controle ($p=0,1943$). Apesar disso, em B é possível observar que a qualidade dos oócitos não é afetada pelo tratamento ($p > 0,05$). C representa os oócitos dos diferentes grupos observados sob microscópio estereoscópio. Barra= 80um.



D CONTROLE



SHAM



PUNÇÃO

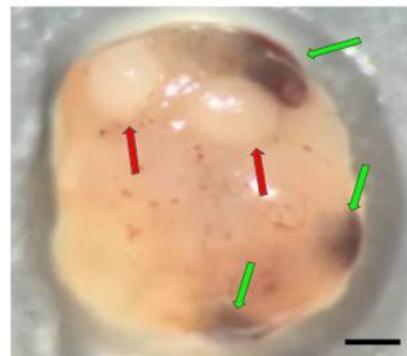


Figura 17. Dados obtidos através do ensaio de superovulação, não foram observadas alterações relacionadas ao número de corpos hemorrágicos e lúteos. A e B representam os dados relacionados ao número de corpos hemorrágicos e lúteos observados por microscópio estereoscópico, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$). C demonstra os dados de contagem microscópica de corpos lúteos e também não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$). D representa os ovários dos diferentes grupos, as setas verdes apontam os corpos hemorrágicos e as vermelhas os corpos lúteos. Barra= 0,1cm.

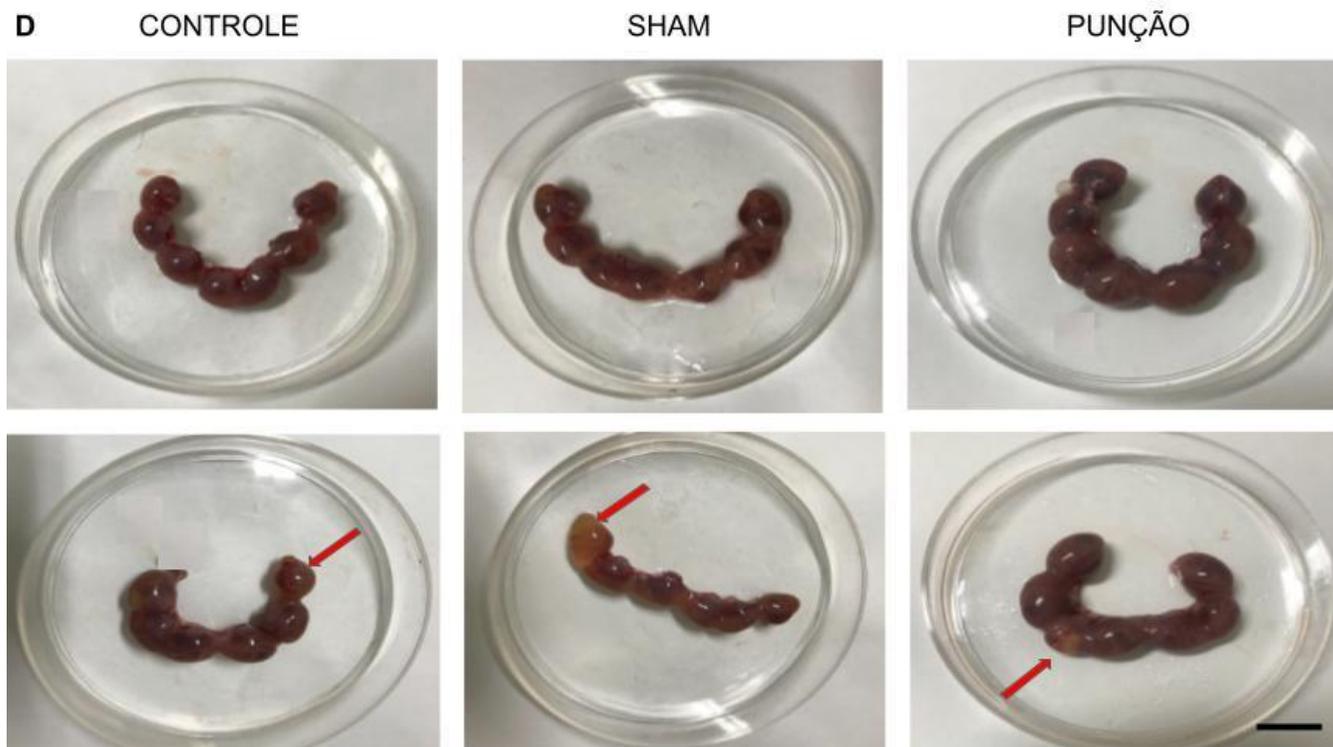
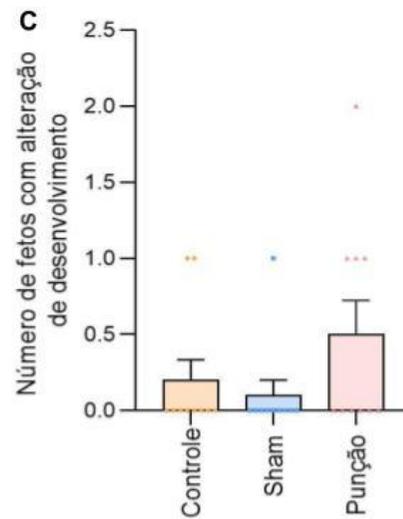
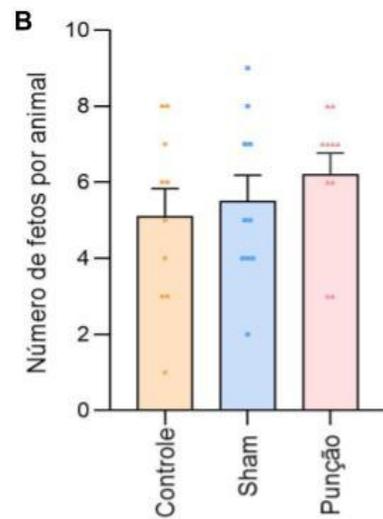
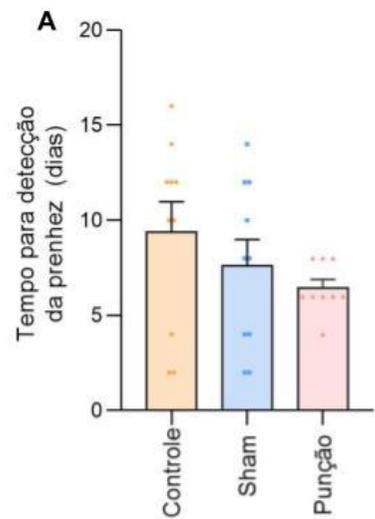


Figura 18. Os resultados obtidos a partir do ensaio de fertilidade mostram que os parâmetros associados à fertilidade não foram afetados pelo procedimento. Não houveram diferenças significativas entre os grupos Controle, Sham e Punção com relação ao tempo para detecção da prenhez (A), número de fetos por animal (B) e número de fetos com alteração no desenvolvimento (C). D representa os úteros dos animais dos diferentes grupos, as setas vermelhas apontam fetos com alteração do desenvolvimento. Barra= 3,5cm.

Tabela 2. Divisão dos animais nos grupos Controle, Sham e Punção para os experimentos de coleta de oócitos e quantificação de ninhadas e filhotes/ninhada.

	Grupo	Número de fêmeas	Número de machos
Superovulação	Controle	10	-
	Sham	10	-
	Punção	10	-
Número de filhotes e ninhadas	Controle	10	5
	Sham	10	5
	Punção	10	5
Total		60	15

Tabela 3. Elementos utilizados para avaliação anatomopatológica.

Compartimento Folicular	Célula em processo de necrose	<i>Células com núcleos picnóticos, tumefação celular, material genético condensado e fragmentado.</i>
	Célula polimorfonuclear	<i>Células saudáveis, com núcleos que apresentam polimorfismo, fortemente corado por hematoxilina. Predominantemente neutrófilo.</i>
Compartimento Estromal	Célula em degeneração	<i>Células picnóticas, não saudáveis.</i>
	Célula polimorfonuclear	<i>Células saudáveis, com núcleos que apresentam polimorfismo, fortemente corado por hematoxilina.</i>
	Hemorragia	<i>Regiões que apresentam células sanguíneas (hemácias) fora de vasos.</i>
	Exsudato inflamatório (edema)	<i>Regiões homogêneas e eosinofílicas.</i>
	Necrose	<i>Regiões eosinofílicas sem manutenção da arquitetura tecidual, podendo ter ainda fragmentos do material genético.</i>

Tabela 4. Dados relacionados a padronização do procedimento de punção ovariana em camundongos. Foi obtido 100% de sucesso nos parâmetros observados.

Parâmetros	Taxa de sucesso (%)
Anestesia inalatória	100
Sobrevivência pós-cirúrgica	100
Recuperação cirúrgica após 24h	100
Retorno a ciclicidade estral após 48h	100
Capacidade de ovulação pós-cirurgia	100
Capacidade de prenhez pós-cirurgia	100

Tabela 5. Os resultados obtidos a partir da análise anatomopatológica demonstraram que os grupos submetidos aos procedimentos cirúrgicos (Sham e Punção) obtiveram uma maior densidade volumétrica dos aspectos patológicos associados à inflamação comparado ao grupo Controle. A tabela representa os resultados do teste t que compara o grupo Controle com o Sham e o Punção nos diferentes tempos (3, 24, 48 e 96h), Houve diferenças estatisticamente significativas principalmente com relação aos elementos patológicos (células em degeneração, células polimorfonucleares, hemorragia, edema e necrose).

Compartimento Folicular									
	3h			24h		48h		96h	
	Controle	Sham	Punção	Sham	Punção	Sham	Punção	Sham	Punção
Células em degeneração	0,5	0,69	0,72	0,4	0,95 *	0,3	0,85	1	0,92
Células polimorfonucleares	0,09	0,53 ***	3,35 **	1,33 ***	1,41 ***	0,23	1,44 ****	0,24	1,29 ****

Compartimento Estromal									
	3h			24h		48h		96h	
	Controle	Sham	Punção	Sham	Punção	Sham	Punção	Sham	Punção
Células em degeneração	0,02	0,01	0,07	0	0	0	0	0	0
Células polimorfonucleares	0,08	0,77 **	1,74 *	0,42 *	1,58	0,03	0,90 **	0,04	0,49 **
Hemorragia	0,03	5,24 ****	17,50 **	7,47 ****	4,63 *	2,67 **	5,02 ****	0,36 ***	2,93 ****
Edema	0,06	2,81 ***	6,13 *	0,94 ***	6,32	0,11	5,82 ****	0,01	3,57 ****
Necrose	0,03	0,04	0,73 *	0,03	0,78	0	0,51 ***	0	0