

XENOTRANSPLANTES OVARIANOS E TESTICULARES: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS EM MAMÍFEROS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

[*Ovarian and testicular xenografting: state of art and perspectives in domestic and wild mammals*]

Marcelo Barbosa Bezerra^{1,*}, Ícaro Coutinho Cosmo^{3,4}, Fernanda Araujo dos Santos^{2,4}, Muriel Magda Lustosa Pimentel^{2,4}, Michelly Fernandes de Macedo^{1,4}

¹ Professor(a) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN. *Autor para correspondência. E-mail: mbezerra@ufersa.edu.br

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

³ Aluno de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

⁴ Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In vitro* de Embriões – UFERSA, Mossoró, RN

RESUMO – Nos últimos anos, um número crescente de artigos sobre xenotransplantes ovarianos e testiculares vem sendo publicado e demonstrando com isso o interesse gradual da comunidade científica sobre o tema. O presente artigo versará sobre a construção do conhecimento científico neste campo de pesquisa, os avanços mais recentes e as perspectivas de utilização da técnica associada a outras biotécnicas, além disso, tratará das expectativas nacionais acerca do assunto e atuação do Laboratório de Transplantes Gonadais da UFERSA, em Mossoró-RN, no país e as tendências mundiais no tema.

Palavras-Chave: xenotransplante; gônadas; pesquisa.

ABSTRACT - In recent years, a growing number of publications about ovarian and testicular xenografts has been published and increasing gradually the interest of the scientific community on this theme. This paper will focus on the construction of scientific knowledge in this field of research, the latest advances and perspectives of utilization associated with other biotechniques. Furthermore, deal with national expectations about the subject and performance of the Laboratory of Gonadal Transplantation of UFERSA, in Mossoro-RN-Brazil, as in Brazil and global trends in theme.

Keywords: xenografting; gonads; research.

INTRODUÇÃO

Os xenotransplantes consistem de técnicas de transferência de tecidos ou órgãos entre diferentes espécies animais e tem como finalidades principais a sobrevivência e manutenção da função do órgão transplantado, bem como do indivíduo receptor.

Mais especificamente, com relação aos xenotransplantes de gônadas, estes promovem em receptores, respostas que dependerão do objetivo, desde a recuperação da atividade gametogênica e endócrina até alterações fisiológicas que permitam a confirmação de hipóteses de estudos sobre desenvolvimento tecidual, síntese de hormônios, produção, desenvolvimento e maturação de gametas (a depender do sexo) e, finalmente, a produção de descendência.

O presente artigo versará sobre a construção do conhecimento científico neste campo de pesquisa, as aplicações dos transplantes gonadais, os avanços

mais recentes e as perspectivas de utilização da técnica associada a outras biotécnicas no Laboratório de Transplantes Gonadais da UFERSA, em Mossoró-RN, no país e as tendências mundiais no tema.

HISTÓRICO DA TÉCNICA

Os primeiros relatos de xenotransplante de gônadas ocorreram num passado distante em diferentes países, os pioneiros mais reconhecidos na literatura são o franco-americano Brown-Sequard e o russo radicado francês Serge Voronoff. O primeiro, ainda na Paris de 1889, inoculou-se extratos de testículos oriundos de cães e porcos da Índia com o objetivo de revigoramento físico perdido em função de sua idade avançada de 72 anos (Deschamps et al., 2005). Cerca de 40 anos depois, em 1920, ainda em Paris, Serge Voronoff realizou xenotransplantes de símios em humanos causando repercussão na época, superando a marca de 2000 procedimentos ao longo de sua carreira com o auxílio e adesão de

diversos cientistas, inclusive no Brasil. Em nosso país, o cirurgião realizou xenotransplantes de ovários e testículos de símios para humanos no fim da década de 1920 (Deschamps et al., 2005; Cuperschmid & Campos, 2007). Ressalte-se que ambos tiveram a eficácia dos seus métodos questionados do ponto de vista ético e manifestaram resultados incertos em função de problemas de ordem imunológica desconhecidos na época (Cuperschmid & Campos, 2007).

Os novos conceitos de imunologia e imunossupressão da década de 1960 permitiram a produção de fármacos e principalmente a obtenção de ratos e camundongos de linhagens imunodeficientes. Assim, tais animais de laboratório tornaram-se os principais coadjuvantes no processo de xenotransplante ovarianos e

testiculares. Em 1994, partindo de informações sobre métodos de transplante, da descoberta de mutações de camundongos que os tornariam imunodeficientes e da utilização destes animais com sucesso para outros tipos de transplantes de órgãos ou tecidos, Gosden et al. (1994) realizaram o primeiro xenotransplante de tecidos ovarianos de ovelhas e gatas com o intuito de gerar uma nova possibilidade de aproveitamento daqueles tecidos e investigar o desenvolvimento folicular em humanos e de espécies e raças de animais em vias de extinção de. A partir de então, dezenas de artigos científicos sobre xenotransplantes foram publicados, em diversas espécies animais e na espécie humana. A tabela 1 demonstra os estudos pioneiros com xenotransplantes em diversas espécies.

Tabela 1. Estudos e países pioneiros em pesquisas com xenotransplantes ovarianos em mamíferos domésticos e silvestres

Autores	País	Animais Doadores
Gosden et al., 1994	Escócia	Gatas
Gosden et al., 1994	Escócia	Ovelhas
Candy et al., 1995	Inglaterra	Saguis
Oktay et al., 1998	Inglaterra	Mulher
Gunasena et al., 1998	Estados Unidos	Elefantas
Metcalfe et al., 2000	Austrália	Cadelas
Wolvekamp et al., 2001	Austrália	Vombats
Mattiske et al., 2002	Austrália	Cangurus
Snow et al., 2002	Austrália	Ratas
Senbon et al, 2003	Japão	Vacas
Kaneko et al., 2003	Japão	Porcas
Wiedeman et al., 2012	Alemanha	Leoas

Com relação aos xenotransplantes de tecidos testiculares, os primeiros estudos foram publicados em 2002 a partir de uma colaboração entre pesquisadores norte-americanos e alemães. Esta técnica foi apresentada como alternativa ao xenotransplante de células-tronco espermatogoniais e, com ela, fragmentos testiculares de suínos e caprinos foram transplantados para camundongos NUDE, o que resultou na diferenciação completa em ambas as espécies (12 semanas para suínos e 16 para caprinos). Assim, esta técnica foi apresentada como sendo viável quanto ao estabelecimento de espermatogênese completa permitindo ainda a manipulação dos receptores em condições controladas (Honaramooz et al., 2002).

Os xenotransplantes variam conforme o local podendo ser ortotópicos quando transplantados próximos à posição anatômica original ou heterotópicos quando tal posição não se correlaciona diretamente com a posição e origem

embrionária do órgão ou tecido transplantado. De modo geral, a grande maioria dos xenotransplantes gonadais são heterotópicos, no caso dos testiculares há uma predominância de procedimentos no subcutâneo, ao passo que, no caso de ovarianos, o sítio receptor, mais comumente utilizado é a região subcapsular do rim.

No início deste século, um novo modelo de xenotransplante, baseado em outros tecidos foi proposto por Cushman et al., (2002) que dentre as vantagens possíveis estariam o baixo custo de implantação da técnica, dispensa da utilização de animais imunodeficientes, simplicidade na manipulação dos tecidos e a possibilidade do cultivo de tecidos ovarianos em larga escala (Martinez-Madrid et al., 2009). Entretanto, tal procedimento, conhecido como cultivo *in ovo* é considerado em última análise por estes autores como um tipo de xenotransplante interclasse que apesar das vantagens mencionadas anteriormente

possui aplicação limitada a poucos dias de cultivo em virtude do desenvolvimento do embrião da galinha.

ESTADO DA ARTE E INTERAÇÃO COM BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS

Apesar dos xenotransplantes de tecido testicular permitir a produção e o desenvolvimento de células da linhagem espermatogênica em machos, tal procedimento não deve ser utilizado isoladamente quando o objetivo é a obtenção de uma cria viável. Assim, diante da necessidade de complementar essa técnica faz-se necessário, por exemplo, o domínio de técnicas de conservação e micromanipulação de espermatozoides. Em suínos, pesquisadores aguardaram o período estimado entre 125 e 192 dias após transplante para que seus tecidos respondessem e para realizar procedimentos de dissecação tecidual, centrifugação e recuperação dos espermatozoides, que ocorreu em aproximadamente 63% dos animais transplantados. Os espermatozoides foram por sua vez colhidos com uma pipeta injetora, que foi direcionada à gota contendo oócitos maturados e injetados com o auxílio de um micromanipulador piezo-elétrico. Uma hora após, foram transferidos para uma placa com solução de ativação e submetidos a pulsos elétricos de 1,5KV/ cm por 20 μ s (Nakai et al., 2010).

O transplante de células-tronco espermatogoniais é uma técnica que permite a diferenciação das células germinativas, entretanto a diferenciação completa até espermatozoides é limitada, parecendo haver uma limitação filogenética no tocante ao xenotransplante. Em ratos essa técnica foi bem sucedida no xenotransplante para camundongos, resultando em nascimentos (Shinohara et al., 2006), porém os mesmos autores conseguiram, alguns anos antes, resultados tão expressivos quanto estes com o protocolo de xenotransplante de tecido testicular a partir de coelhos, gerando um nascimento (Shinohara et al., 2002). Num estudo comparativo entre as eficiências das técnicas de xenotransplante de células-tronco espermatogoniais e de tecido testicular de camundongos positivos para a proteína fluorescente verde (GFP), verificou-se não haver diferença entre ambas as técnicas, cabendo a decisão da escolha da técnica ser direcionada à sua exequibilidade e para qual tipo de estudo esta será aplicada (Van Saen et al., 2009).

As técnicas de criopreservação de tecidos ovarianos e testiculares são também de grande utilidade para o xenotransplante. Se por um lado, o xenotransplante serve para confirmar a eficiência de técnicas de congelamento e vitrificação, estas, uma vez validadas, para uma espécie, são plenamente aplicáveis na reprodução assistida em animais de interesse

ecológico (Abassi et al., 2011, Wiedemann et al., 2012, Campos-Júnior et al., 2014), econômico (Senbon et al., 2003), bem como para humanos (Oktay et al., 1998).

Em fêmeas, o xenotransplante de tecido ovariano pode servir como complemento ou controle em condições de cultivo *in vitro* de tecidos ovarianos (MOIFOPA); como complemento cite-se, por exemplo, a sua utilização para o cultivo de folículos pré-antrais ativados (primários e secundários), desde que, se sobressaiam ao processo de isquemia natural dos transplantes, como ocorreu em vacas, por exemplo (Senbon et al., 2003; Senbon et al., 2004 a,b). Por outro lado, uma vez serem desconhecidos numa espécie o processo de ativação *in vitro* dos folículos primordiais, este procedimento auxiliaria nesta situação como foi constatado em xenotransplantes *in vivo* com a massiva ativação folicular (Aerts et al., 2010).

Ainda tratando-se de inovações, recentemente, folículos primordiais foram xenotransplantados em camundongos NUDE, seus folículos já com o antro desenvolvido com o auxílio de estímulos hormonais, tiveram oócitos colhidos e fundidos com citoplastos provenientes de oócitos convencionais, aumentando assim a produção de blastocistos de zero, no grupo xenotransplantado tradicionalmente, para 14,3%; percentual considerado equivalente ao dos oócitos convencionalmente utilizados para a produção *in vitro* de embriões no estudo (Kaneko et al., 2013). Assim em modelos para a produção de blastocistos a partir de folículos primordiais esta técnica mostrou-se promissora.

Os conhecimentos de produção *in vitro* de embriões são fundamentais para o xenotransplante ovariano. As etapas de maturação *in vitro* têm sido ferramentas de grande importância para a confirmação do desenvolvimento folicular, tal combinação de procedimentos de PIV associada ao xenotransplante foi realizada inicialmente em ratas (Snow et al., 2002) e em grandes mamíferos na espécie suína (Kaneko et al., 2003).

REALIDADE DOS XENOTRANSPLANTES NO BRASIL

É sabido que existem ações de pesquisa no país focadas no tema xenotransplante de ovários e testículos. Nesse mister, é de conhecimento a existência de laboratório voltado para o xenotransplante de células-tronco espermatogoniais e tecidos testiculares (Campos-Junior et al., 2014) em Belo Horizonte – MG, com ampla colaboração científica com laboratórios do exterior e nacionais e, recentemente, em 2012, instalou-se o Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In vitro* de

Embriões, sediado em Mossoró-RN. Este laboratório possui linhagens de camundongos Balb-c NUDE e C57 Black/SCID e tem como objetivo principal a integração pesquisas com xenotransplantes com diferentes grupos de pesquisa nacionais e internacionais. A sua equidistância entre as capitais do Ceará (Fortaleza) e Rio Grande do Norte (Natal) permite realização de atividades conjuntas com laboratórios e institutos de pesquisa destas cidades, assim como, ambas fornecem facilidades com o acesso e envio de material biológico de outras cidades do país, permitindo não apenas atividades *in locu* como também a colaboração com demais laboratórios nacionais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora resultados demonstrem que as respostas dependam em parte da afinidade zoológica entre doador(a) e receptor(a), estudos com lagomorfos e os realizados posteriormente em suínos demonstraram que gametas viáveis podem também ser obtidos a partir de tecidos testiculares e de tecidos ovarianos transplantados para camundongos, fornecendo assim, perspectivas mais otimistas em relação à obtenção de crias em outras espécies filogeneticamente mais distantes.

No tocante à integração dos xenotransplantes com outras biotécnicas, a sua condição precípua de técnica em desenvolvimento a credencia por elaborar constantes inovações, haja vista, a versatilidade de aplicações, sendo que essas prováveis e futuras associações podem ajudar espécies animais que correm algum perigo ou risco de extinção, assim como, fornecer subsídios para estudos fisiológicos.

A evolução dos xenotransplantes no Brasil depende essencialmente de integração de diferentes setores e grupos de pesquisa envolvidos direta ou indiretamente com o tema. Assim, os xenotransplantes podem interagir com diferentes biotécnicas para alcançar seus objetivos, sendo parte dessas biotécnicas de fácil execução, enquanto que, outras precisam de equipamentos, material e pessoal qualificado e com permanência mínima para o alcance dos objetivos propostos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES) pela concessão das bolsas de mestrado de Fernanda Araujo dos Santos e Muriel Magda Lustosa Pimentel, à Universidade Federal Rural do Semi-Árido pela bolsa de Iniciação Científica de Ícaro Coutinho Cosmo e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de pesquisa do

Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In vitro* de Embriões (projeto CNPq 483890/2012).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, Sepideh; Honaramooz, Ali. Xenografting of testis tissue from bison calf donors into recipient mice as a strategy for salvaging genetic material. *Theriogenology*, v. 76, n. 4, p. 607-614, 2011.
- Aerts, Jan Mj et al. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. *Fertility and sterility*, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.
- Campos-Junior, Paulo Henrique et al. Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*T. tajacu*). *Reproduction*, p. REP-13-0581, 2013.
- Candy, C. J.; Wood, M. J.; Whittingham, D. G. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*, v. 10, n. 9, p. 2334-2338, 1995.
- Cuperschmid, Ethel Mizrahy; CAMPOS, Tarcisio Passos Ribeiro de. Os curiosos xenotransplantes glandulares do doutor Voronoff. *Hist. ciênc. saúde-Manguinhos*, v. 14, n. 3, p. 737-760, 2007.
- Cushman, R. A.; Wahl, C. M.; Fortune, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reproduction*, v. 17, n. 1, p. 48-54, 2002.
- Deschamps, J. Y., Roux, F. A., Saï, P., Gouin, E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 12(2), 91-109, 2005.
- Gosden, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *Journal of reproduction and fertility*, v. 101, n. 3, p. 619-623, 1994.
- Gunasena, K. T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Animal reproduction science*, v. 53, n. 1, p. 265-275, 1998.
- Honaramooz, Ali et al. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, v. 418, n. 6899, p. 778-781, 2002.
- Kaneko, Hiroyuki et al. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. *Theriogenology*, v. 80, n. 8, p. 887-892, 2013.
- Kaneko, Hiroyuki et al. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. *Biology of reproduction*, v. 69, n. 5, p. 1488-1493, 2003.
- Martinez-Madrid, Belen et al. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and sterility*, v. 91, n. 1, p. 285-292, 2009.
- Mattiske, D.; Shaw, G.; Shaw, J. M. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction*, v. 123, n. 1, p. 143-153, 2002.

Metcalf, S. S.; Shaw, J. M.; Gunn, I. M. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, v. 57, p. 323-329, 2000.

Nakai, Michiko et al. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction*, v. 139, n. 2, p. 331-335, 2010.

Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., & Gosden, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction*, 13(5), 1133-1138. 1998.

Senbon, S.; Atsushi, O.; Tachibana, M.; Myiano, T. Xenotransplantation of bovine secondary follicles into ovariectomized female severe combined immunodeficient mice. *Journal of Reproduction and Development*, v.50, p.439-444, 2004a.

Senbon, S.; Atsushi, O.; Tachibana, M.; Myiano, T. Xenotransplantation of Bovine Secondary Follicles into Male and Female SCID Mice. *Journal of Mammalian Ova Research*, v.21, p.157-161, 2004b.

Senbon, S.; Ota, A.; Tachibana, M.; Myiano, T. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote*, v.11, n.2, p.139-149, 2003.

Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Nakata, K., Kurome, M., Nagashima, H., Toyokuni, S., Kogishi, K., Honjo, T And Ogura, A. Birth of off spring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod*, 17:3039-3045. 2002.

Shinohara T, Kato M, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Nakatsuji, et al. Rats produced by interspecies spermatogonial transplantation in mice and in vitro *in vitro* microinsemination. *Proc Natl Acad Sci*, 103:13624-8, 2006.

Snow, Melanie et al. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science*, v. 297, n. 5590, p. 2227-2227, 2002.

Van Saen, Dorien et al. Regeneration of spermatogenesis by grafting testicular tissue or injecting testicular cells into the testes of sterile mice: a comparative study. *Fertility and sterility*, v. 91, n. 5, p. 2264-2272, 2009.

Wiedemann, C. et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. s6, p. 300-304, 2012.

Wolvekamp, M. C. J. et al. Follicular development in cryopreserved common wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. *Animal Reproduction Science*, v. 65, n. 1, p. 135-147, 2001.