

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

*Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas
domésticas*

ELLEN CRISTINA RIVAS LEONEL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

*Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas
domésticas*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Madeira Lucci

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Animal
da Universidade de Brasília como parte
dos requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos felinos, por quem criei um amor tão intenso durante este período e com quem tanto aprendi nesta etapa da minha vida. Especialmente a Janis, Mingau, Suzi, Lilo, Tutu, Isis, Cindi, Pandora, Margarida e Chantili, que mostraram tanto amor e carinho com suas maneiras peculiares mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre possibilitar a realização dos meus sonhos.

Ao meu marido, Filipe, pelo amor, amizade e companheirismo durante os últimos anos.

Também pelo apoio incondicional durante o desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora, Profa. Carolina Lucci, pela confiança, auxílio e disponibilidade a mim dedicados, sendo indispensável para a criação e o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Antônio e Inês, que me ajudaram e incentivaram em todos os momentos da vida, pelo exemplo, pelos conselhos e amor.

Aos queridos colegas Janice, Victor e Daniela, que muito contribuíram para a realização do trabalho e tornaram a jornada mais alegre.

Aos amigos Renata, Silvia, Tatiana Dourado, Gesiel, Tatiana e Cleiane da Clínica Veterinária Emporio dos Bichos, que tanto me ajudaram e contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos colegas Jivago e Giovana pelo auxílio dispensado durante o experimento.

À distribuidora Alere S/A pela contribuição com o fornecimento dos testes para detecção de FIV/FELV nos animais utilizados no experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por possibilitar minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do projeto.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Os folículos ovarianos	3
2.2. O ciclo estral da gata doméstica.....	6
2.3. Criopreservação de células germinativas femininas.....	10
2.4. Transplante de tecido ovariano.....	14
3. JUSTIFICATIVA	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo geral	22
4.2. Objetivos específicos	22
5. MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1. Etapa 1 – Criopreservação de tecido ovariano felino.....	23
5.1.1. Delineamento experimental.....	23
5.1.2. Protocolo de criopreservação.....	24
5.1.3. Microscopia de luz.....	25
5.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão	26
5.1.5. Análise estatística	27
5.2. Transplantes de tecido ovariano	27
5.2.1. Animais	28

5.2.2. Delineamento experimental	28
5.2.3. Protocolo anestésico e cirúrgico	29
5.2.4. Acompanhamento dos animais após os transplantes	30
5.2.5. Avaliação por histologia clássica	32
6. RESULTADOS	34
6.1. Etapa 1 – Teste de criopreservação de tecido ovariano felino	34
6.1.1. Microscopia de luz	34
6.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão	36
6.2. Etapa 2 – transplantes de tecido ovariano	40
6.2.1. Avaliações ultrassonográficas	40
6.2.2. Avaliação histológica do tecido ovariano transplantado	42
6.2.3. Comportamento e citologia vaginal	47
7. DISCUSSÃO.....	49
8. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
10. ANEXOS	69

LISTA DE ABREVIÇÕES

CL – Congelamento Lento

DMSO – Dimetilsulfóxido

EG – Etilenoglicol

FIV – Fertilização *in vitro*

FMN – Folículos Morfologicamente Normais

FPA – Folículos Pré-antrais

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HE – Hematoxilina e Eosina

LH – Hormônio Luteinizante

M – Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

ML – Microscopia de Luz

SCID – Severe combined immunodeficiency

SFB – Soro Fetal Bovino

TT – Teste de toxicidade

RESUMO

No Brasil, todas as espécies de felinos selvagens estão sob risco de extinção. Desta forma, técnicas de reprodução assistida aplicáveis a tais espécies são recursos valiosos para a conservação das mesmas. O gato doméstico (*Felis catus*) tem sido um excelente modelo experimental para estudos que visem aplicação em felinos selvagens. O presente trabalho teve como objetivos testar o efeito de diferentes protocolos de criopreservação, além da eficácia do autotransplante ovariano em manter a viabilidade e retomar o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em ovários de gatas domésticas. Um teste de criopreservação foi realizado comparando a eficácia de etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e a associação de ambos (EG+DMSO) na preservação de folículos ovarianos após descongelamento (1ª Etapa). Na 2ª Etapa do experimento, cinco gatas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. Os animais tiveram seis fragmentos de ovário fresco transplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço. Foram realizadas cinco biopsias (7, 14, 28, 49 e 63 dias). O tecido ovariano foi fixado em Carnoy, processado para histologia clássica e analisado por microscopia de luz. Durante o período de transplante, foram realizadas análises ultrassonográficas para acompanhar o desenvolvimento do tecido ovariano. Na Etapa 1, a criopreservação com DMSO a 1,5 M mostrou-se mais eficaz. Durante as avaliações ultrassonográficas, foi possível identificar a presença de círculos hipoecóicos com diâmetro aproximado de 1 mm, nos animais 3, 4 e 5. Tais estruturas correspondiam a folículos antrais. Nas biopsias, foi possível identificar folículos em todos os estágios do desenvolvimento. As porcentagens médias (\pm DP) de folículos morfológicamente normais encontrados nos fragmentos referentes às biopsias, realizadas nos dias 7, 14, 28, 49 e 63 pós-transplante, foram, respectivamente, $44,36\pm 30,56$, $46,95\pm 13,97$, $51,41\pm 14,38$, $54,80\pm 36,47$ e $37,70\pm 31,11$. A maioria dos folículos primordiais foi classificada como normal. Nas biopsias dos dias 7 e 14, houve grande concentração de folículos com o citoplasma do ovócito muito acidófilo e com ausência de núcleo (degeneração tipo 1). A partir do dia 14, muitos apresentaram-se com células da granulosa

justapostas, que cobriam o local do ovócito, que estava ausente nestas estruturas (degeneração tipo 2). Em conclusão, é possível manter a morfologia folicular após criopreservação de tecido ovariano felino com DMSO a 1,5 M. Também é mantida a viabilidade e funcionalidade de tecido ovariano felino fresco após autotransplante.

Palavras-chave: folículo pré-antral, congelamento lento, felinos, morfologia, desenvolvimento folicular

ABSTRACT

In Brazil, all wild felids species are endangered. This way, assisted reproduction techniques are a valuable resource to keep these species against extinction. The domestic cat (*Felis catus*) has been an excellent experimental model for studying new techniques to apply to wild felids. The aim of this work was to test different protocols of cryopreservation and the capacity of ovarian autotransplantation to keep the viability and resume preantral follicle development in domestic cats. The cryopreservation test was performed to compare ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and the association of both (EG+DMSO) in the preservation of preantral follicles included in ovarian tissue (1st stage). In the 2nd stage of the experiment, five cats were submitted to bilateral ovarian hysterectomy. In these animals, six fragments of fresh ovary were immediately transplanted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck. Five biopsies were performed after 7, 14, 28, 49 and 63 days of transplantation. The ovarian tissue was fixed in Carnoy, processed for classical histology and analysed under light microscopy. During the transplantation period, the ovarian tissue development and localization was monitored by ultrasonographic analysis. In the Stage 1 of the experiment, the cryopreservation with DMSO 1,5 M showed to be more efficient. During the ultrasonographic evaluation it was possible to identify the presence of hypoechoic circles with approximately 2 mm of diameter in the transplanted tissue of animals 3, 4 and 5. These structures corresponded to antral follicles. In the biopsies it was possible to identify follicles in all developmental stages. The mean (\pm SD) percentages of morphologically normal follicles found in the biopsies at days 7, 14, 28, 49 and 63 post-transplantation were respectively 44.36 ± 30.56 , 46.95 ± 13.97 , 51.41 ± 14.38 , 54.80 ± 36.47 e 37.70 ± 31.11 . The majority of the primordial follicles were classified as normal. At days 7 and 14 biopsies there was a great number of follicles with acidophilic cytoplasm and with absent of nucleus (Type 1 degeneration). From day 14 on, a lot of follicles showed juxtaposed granulosa cells covering the place where the oocyte should be (Type 2

degeneration). Both these follicles were classified as degenerated. In conclusion, it is possible to keep the morphology of ovarian follicles after cryopreservation with DMSO 1,5 M. It is possible to keep the viability and function of fresh feline ovarian tissue after autotransplantation.

Key words: preantral follicle, slow freezing, felids, morphology, follicular development

1. Introdução

A variabilidade genética das espécies tem decrescido em uma taxa alarmante. O crescimento da população humana promove a necessidade de formação de novas terras para plantio, o que causa a destruição de *habitats* naturais. Dentro da família *Felidae*, das 36 espécies existentes, todas, exceto os gatos domésticos, sofrem alguma ameaça, de acordo com a Lista Vermelha publicada em 2012 pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais, IUCN ([in http://www.iucnredlist.org/](http://www.iucnredlist.org/), acesso em 12/10/2013). No Brasil, todos os felinos selvagens estão sob risco de extinção como o gato do mato (*Leopardus tigrinus*), o leão baio (*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), a onça pintada (*Panthera onca*) e o gato maracajá (*Leopardus wiedii*).

Além de medidas diretas para prevenir a destruição de habitats naturais, invasão de territórios e caça, técnicas de reprodução assistida aplicadas a espécies selvagens são recursos valiosos para os esforços de conservação. A preservação de germoplasma de espécies ameaçadas tem o objetivo de manter material genético preservado para uso futuro. Para tanto, a criopreservação de células germinativas (ovócitos ou espermatozoides) de gatos domésticos tem sido explorada. Entretanto, deve-se ressaltar que as técnicas citadas não constituem uma alternativa para a manutenção do ambiente ou dos animais em zoológicos, mas uma segurança a mais.

Programas para promover a formação de bancos de germoplasma e o desenvolvimento de pesquisas com animais em extinção, com especial atenção aos felinos, têm sido criados em vários países, como na Espanha, o *Biological Resource Bank for Spain's endangered wildlife*, na Alemanha, o projeto Iberian Lynx (lince ibérico – *Lynx pardinus*) do *Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research* e, no Brasil, o projeto Felinos do Aguai, desenvolvido em alguns estados da região Sul. Além da criopreservação de gametas, sêmem e embriões, também há a possibilidade de manutenção de tecidos e células somáticas para a realização de estudos em

genética, além da possível realização de transferência nuclear de células somáticas (clonagem).

Os gatos domésticos constituem um modelo experimental estabelecido para o estudo dos felinos selvagens. Tecnologias desenvolvidas para os gatos têm sido utilizadas para a formação de um banco de germoplasma de células somáticas e germinativas femininas de lince ibérico, por exemplo, podendo-se concluir que tal modelo experimental é adequado para outros felinos (Leon-Quinto *et al.*, 2009). Além disso, o gato doméstico também foi um agente para preservação de genoma felino, atribuindo o estudo desta espécie à sua similaridade com os felinos selvagens.

Para preservação de germoplasma, uma alternativa tem sido a criopreservação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais. Esta técnica tem sido bastante explorada em várias espécies com sucesso. Além disso, já foi comprovada a possibilidade de retomada de função folicular após descongelamento. Para tanto, posterior cultivo do tecido ovariano é necessário, seja *in vitro* ou *in vivo*. Como o conhecimento dos fatores necessários para cultivo *in vitro* é algo ainda não totalmente estabelecido, o transplante ovariano torna-se uma alternativa a ser considerada.

Ao contrário dos humanos, grandes avanços nesta área ainda não foram realizados nos felinos. Considerando-se a importância de manutenção de germoplasma para algumas espécies, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um método eficaz de criopreservação e desenvolver células germinativas através do autotransplante heterotópico ovariano em gatas domésticas.

2. Revisão de Literatura

2.1 Os Folículos ovarianos

Os ovários dos animais domésticos são órgãos endócrinos, responsáveis pela produção de estrógeno e progesterona, e exócrinos, responsáveis pela produção de gametas femininos - os ovócitos. São envoltos por uma cápsula densa de tecido conjuntivo fibroso, conhecida como túnica albugínea. A camada cortical, também conhecida como zona parenquimatosa, caracteriza-se pela presença das células germinativas e localiza-se na porção externa do órgão. O córtex contém numerosos folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, assim como elementos do estroma, com densos agregados de fibroblastos. A camada medular, ou zona vascular, responsável pela irrigação sanguínea e inervação, geralmente está presente na porção interna. A medula é composta por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e tecidos embrionários remanescentes (Junqueira & Carneiro, 2004).

As estruturas funcionais dos ovários, os folículos ovarianos, são compostas por um ovócito envolto por um ou dois tipos celulares (células da granulosa e células da teca). Os ovócitos têm origem a partir de células epiblasticas durante a gastrulação. A camada de células da teca é formada em folículos mais desenvolvidos, e consiste de células do estroma ovariano diferenciadas (van den Hurk & Zhao, 2005). Já as células da granulosa são inicialmente denominadas células da pré-granulosa, que se originam das células somáticas do cordão embrionário (Juengel *et al.*, 2002).

Os ovócitos desenvolvem-se durante o período fetal. Para tanto, as ovogônias iniciam a meiose e permanecem quiescentes no estágio de prófase I, sendo denominados ovócitos primários. A atividade meiótica proporciona uma grande perda por degeneração dos ovócitos antes da formação do folículo, que ocorrerá em seguida (Rüsse, 1983). Mesmo assim, a população folicular com potencial reprodutivo ao nascimento consiste de milhares de folículos nas espécies mamíferas: humanos 700.000 (La Marca *et al.*, 2012), roedores 19.000

(Beaumont & Mandl, 1961), ovelhas 82.000 (McNatty *et al.*, 1995), gatas 38.000 (Carrizo Jr. *et al.*, 2010) e vacas 135.000 (Erickson, 1966), aproximadamente.

Os folículos primordiais, que representam o *pool* de reserva de ovócitos nos ovários, contêm um ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso. Para iniciar o desenvolvimento, os folículos primordiais precisam ser ativados, o que vai ocorrer em pequenos grupos (Rüsse, 1983). Em princípio, a ordem de ativação dos folículos primordiais é estabelecida de acordo com a ordem em que os mesmos foram formados (Picton *et al.*, 2008). Ao nível ultraestrutural, o ovócito no folículo primordial apresenta poucas organelas celulares (Rüsse, 1983). No geral, estas células apresentam um citoplasma homogêneo. As organelas de maior ocorrência são as mitocôndrias de formato arredondado. As mitocôndrias podem apresentar-se de duas maneiras: com eletrondensidade baixa e com poucas cristas ou com eletrondensidade alta e com muitas cristas. O retículo endoplasmático rugoso é frequentemente encontrado associado às mitocôndrias. A membrana celular do ovócito, neste estágio, está associada com as membranas das células da granulosa (Carrizo Jr. *et al.*, 2010).

Após a ativação, os folículos primordiais evoluem para folículos primários, secundários e terciários. Estes estão em estágio de crescimento e se diferenciam pela quantidade de camadas de células da granulosa: os primários possuem uma camada de células cubóides, os secundários possuem mais de uma camada e os terciários caracterizam-se pelo início da formação do antro. A partir da puberdade, os ovários tornam-se responsivos às gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) e os folículos antrais serão recrutados em ondas, podendo se desenvolver a folículos pré-ovulatórios. Os folículos pré-ovulatórios possuem um grande antro repleto de líquido folicular, secretado pelas células da granulosa (Hulshof *et al.*, 1994).

Além da formação da camada de células da teca, folículos em crescimento desenvolvem a zona pelúcida, que é uma camada protetora de glicoproteína ao redor do ovócito. Com a presença da zona pelúcida, o contato entre células da granulosa e o ovócito é realizado por junções do tipo *Gap*, que atravessam a camada glicoprotéica promovendo as trocas de nutrientes e de hormônios. Da mesma forma que as células da granulosa contribuem para o desenvolvimento do ovócito, este também promove crescimento e ativação das células da granulosa (Anderson & Albertini, 1976).

A formação do antro inicia-se em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular. A secreção do fluido antral é realizada pelas células da granulosa. Acredita-se que o aumento rápido do volume do antro se dá devido a uma maior permeabilidade vascular no folículo nesta etapa, possibilitando o acúmulo do líquido. Desta forma, o fluido é fonte de gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas, glicoproteínas entre outras substâncias, que podem ser derivadas tanto do sangue quanto das células da granulosa (van den Hurk & Zhao, 2005). Na maioria das espécies, a meiose no ovócito é retomada nesta etapa do desenvolvimento, e apenas no folículo pré-ovulatório, quando há o surgimento do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante, o LH (Hyttel *et al.*, 2002).

Uma vez que os folículos são ativados, ocorre um alongamento das mitocôndrias e o retículo endoplasmático rugoso se reorganiza para que possa circundar gotas lipídicas presentes no citoplasma. Além disso, com o desenvolvimento do folículo, o complexo de Golgi vai tornando-se cada vez mais significativo em relação às outras organelas (Rüsse, 1983). Os folículos primários apresentam o núcleo com cromatina descondensada e uma significativa camada de zona pelúcida já está presente, podendo apresentar pequenas microvilosidades projetadas do ovócito em direção às células da granulosa. Já os folículos secundários apresentam a camada de zona pelúcida bem desenvolvida. Neste estágio, há projeções das células da granulosa em direção à zona pelúcida, que irão formar as junções

tipo *Gap* entre as células da granulosa e o ovócito. Além disso, grânulos da cortical estão presentes no oolema (membrana plasmática do ovócito). Os folículos estão sempre circundados por uma membrana basal bem aderida ao estroma ovariano (Carrijo Jr. *et al.*, 2010).

2.2 O ciclo estral da gata doméstica (*Felis catus*)

A gata é classificada como poliéstrica sazonal fotoperiódica positiva, uma vez que é capaz de desenvolver vários ciclos estrais a cada ano nos períodos de primavera e verão, diminuindo a quantidade destes no outono e inverno (Michel, 1993), em regiões de clima temperado. Em animais fotoperiódicos, impulsos são gerados pela incidência luminosa nos fotorreceptores da retina. Estes são enviados à glândula pineal, que converte as informações neurais recebidas em liberação de melatonina (Hafez & Hafez, 2004). Quanto mais curta a incidência de luz, maior é a secreção de melatonina pela glândula pineal. Nos felinos, a melatonina é um hormônio anti-gonadotrófico. Desta forma, em períodos com alta incidência luminosa, haverá baixas concentrações séricas de melatonina, o que promove a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Este induz a secreção cíclica de hormônio folículo-estimulante (FSH) e de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise (Mialot, 1998). O FSH estimula o crescimento e o desenvolvimento dos folículos ovarianos. O LH age em conjunto com o FSH para promover a maturação dos ovócitos e, posteriormente, a ruptura da parede do folículo (Hafez & Hafez, 2004). Os folículos, por sua vez, são responsáveis pela produção de $17\ \beta$ -estradiol, que promove mudanças no comportamento de estro, fazendo com que a gata permita a monta, e sensibiliza o eixo hipotálamo-hipófise para a secreção de LH (Johnston *et al.*, 2001).

A ovulação nas gatas domésticas, via de regra, ocorre em decorrência da cópula. Por ser um animal de ovulação induzida, o estímulo mecânico no momento do coito vai

desencadear um reflexo neuro-endócrino que culmina com a liberação do pico pré-ovulatório de LH, que por sua vez provocará a ovulação do(s) folículo(s) pré-ovulatório(s). Na ausência desta, sucessivos ciclos estrais irão ocorrer (Shille *et al.*, 1979). Entretanto, foi detectada alta concentração de progesterona ($\geq 4,8$ nmol. L⁻¹) e presença de corpo lúteo em 35% das gatas que não tiveram contato com machos, sugerindo a possibilidade de ovulação espontânea (Lawler *et al.*, 1993).

As gatas, entretanto, podem se apresentar poliéstricas contínuas em regiões tropicais, onde não há definição clara das estações do ano e, conseqüentemente, a quantidade de horas de luz por dia não se altera significativamente entre inverno e verão. O mesmo pode ocorrer em ambientes com iluminação artificial. Além do fator circadiano, o ciclo estral felino também pode ser influenciado pelo ambiente social do indivíduo (Michel, 1993).

A puberdade pode ocorrer dos 4 aos 12 meses de idade, ou quando os animais atingem um peso corporal de 2,3 a 2,5 kg e é influenciada pela estação do ano (em locais de clima temperado) e pela condição corporal da gata (Johnston *et al.*, 2001).

O ciclo estral felino é composto por proestro, estro, metaestro e anestro (Feldman & Nelson, 2004). O método mais confiável de identificar a fase do ciclo estral em que uma fêmea se encontra é a dosagem hormonal. Este constitui-se, principalmente, da avaliação da concentração de progesterona ou 17 β -estradiol. Estes hormônios podem ser avaliados no plasma sanguíneo. Sabe-se que a concentração de 17 β -estradiol no soro de gatas que estão em estro é de aproximadamente 25 pg/ml (Johnston *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que seus metabólitos são excretados na urina e até mesmo nas fezes, na forma de estradiol não conjugado e estrona (40%) e como conjugado hidrolizável não-enzimático (60%) (Brown *et al.*, 1994). Em felinos selvagens, avaliações da concentração destes metabólitos nas fezes têm sido realizadas para a obtenção de maiores informações sobre o ciclo estral destas espécies

(Moreira *et al.*, 2001). Já a progesterona não é detectada durante o ciclo estral e até 2 a 3 dias após a cópula (Johnston *et al.*, 2001).

As fases do ciclo estral da gata são caracterizadas por alterações comportamentais. No anestro, há pouca interação entre a fêmea e o macho e ela ignora a presença dele, defendendo-se com batidas das patas quando a tentativa de aproximação ou de monta ocorre. Quando o proestro tem início, a gata começa a friccionar a cabeça e o pescoço contra superfícies, movimentar-se demasiadamente e rolar. Anda próximo às paredes quase sempre esfregando o flanco. A repulsa à presença do macho diminui e ela começa a ficar mais tolerante à presença deste, entretanto a monta ainda não é permitida. Ronronados, alongamentos e abertura e fechamento das garras tornam-se cada vez mais constantes. Quando em estro, a fêmea deixa de friccionar a cabeça e rolar e começa a agachar-se com hiperextensão do trem posterior, lordose, lateralização da cauda e apresentação da região perineal. A monta é permitida com alta receptividade. A cópula ocorre muito rapidamente, mas pode se repetir por várias vezes em um curto espaço de tempo. O metaestro ocorre ao final do estro e novamente a fêmea repele as investidas do macho. Com a realização da cópula, ocorrerá a ovulação e a formação de corpo lúteo e, conseqüentemente, gestação ou pseudogestação (caso não haja fecundação). Na ausência da cópula, a gata retorna ao proestro, iniciando um novo ciclo (Michael, 1961).

Além do padrão comportamental, a citologia vaginal sofre modificações ao longo do ciclo estral, no qual são observados diferentes tipos e quantidades relativas das células epiteliais (Figura 1), e pode ser um fator útil na identificação das fases do ciclo estral da gata. No proestro, há muitas células intermediárias médias a grandes, poucas células superficiais nucleadas, poucos debris e raros neutrófilos. No estro, há grande concentração celular, especialmente de células epiteliais superficiais, nucleadas (em maior quantidade) ou anucleadas, isoladas e em grande quantidade, ausência de células parabasais, debris e neutrófilos e poucas células intermediárias. O metaestro caracteriza-se pela presença de

muitas células epiteliais intermediárias, poucas células superficiais, e a presença de neutrófilos. Por fim, na citologia vaginal em anestro, há poucas células, com predominância de células intermediárias de tamanho médio e aglomerados de células parabasais (Mills *et al.*, 1979).

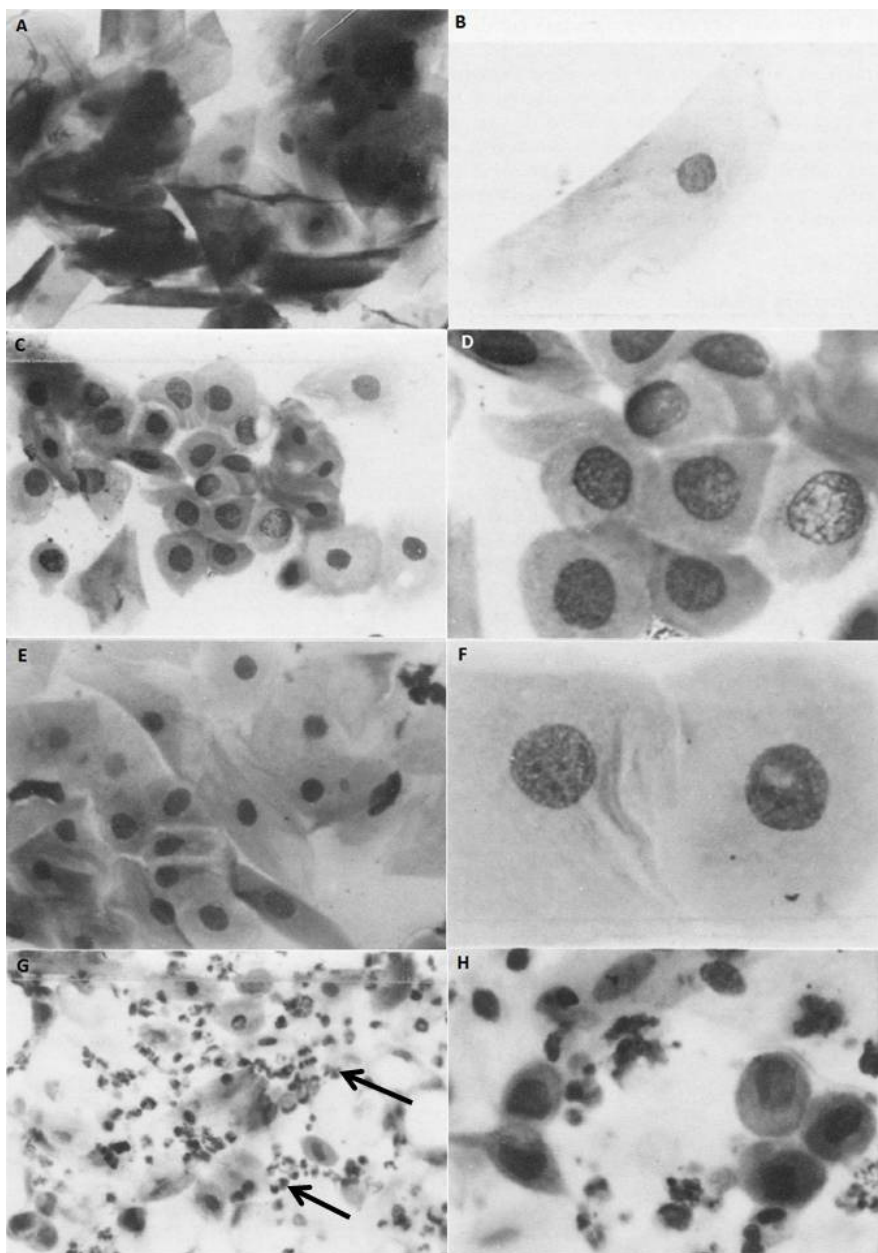


Figura 1. Esfregaço vaginal de gata. Células epiteliais superficiais – típicas do estro (A e B); células epiteliais parabasais (C e D); células epiteliais intermediárias (E e F); células epiteliais intermediárias e parabasais com neutrófilos (setas) em esfregaço de metaestro (G e H). Adaptado de Mills *et al* (1979).

2.3 Criopreservação de células germinativas femininas

A criopreservação de células vivas é uma metodologia estabelecida já há muito tempo (revisado por Pegg, 2002). Sua importância consiste na conservação de células em nitrogênio líquido, permitindo a estocagem, por tempo indeterminado, de tecidos animais ou vegetais, incluindo células germinativas (espermatozóides e ovócitos) e outros tipos celulares (Mazur, 1984). O tecido é conservado porque, a -196°C , temperatura do nitrogênio líquido, não há energia térmica suficiente para as reações químicas (McGee & Martin *et al.*, 1962).

Durante o processo de criopreservação, a água constitui um fator importante, pois, durante o resfriamento das amostras, ocorre a formação de cristais de gelo. Sabe-se que a célula e o meio ao seu redor não congelam até atingirem -5°C . Isto ocorre devido à redução do ponto de fusão, que é ocasionado pelos crioprotetores utilizados. Entre -5 e -15°C , gelo é formado no meio externo à célula e esta permanece apenas super-resfriada, mas ainda não congela, uma vez que a membrana plasmática impede a formação de gelo intracitoplasmático. A partir deste momento, os eventos físicos observados irão depender da velocidade do congelamento. Desta forma, se o procedimento for rápido, a desidratação celular não ocorre, já que não haverá tempo suficiente para o efluxo de água antes do congelamento do meio intracelular, o que resultará na produção de cristais de gelo dentro da célula. Se o procedimento for lento, haverá tempo para a desidratação celular, havendo formação de cristais de gelo apenas no meio extracelular. Em resposta ao gradiente osmótico com relação ao meio extracelular criado pela ação dos crioprotetores e do congelamento da água extracelular, a água super-resfriada intracelular flui para o meio externo, onde sofrerá congelamento. A partir daí, pode-se afirmar que a água no estado líquido não existe a temperaturas inferiores a -130°C , havendo, nestas condições, apenas o estado cristalizado (Mazur, 1984; Elmoazzen, 2000).

Como já mencionado, agentes crioprotetores são normalmente empregados nestas técnicas. Estes são substâncias orgânicas que, se usadas corretamente, protegem a célula ou o tecido contra a formação desordenada de cristais de gelo e o choque osmótico (Santos *et al.*, 2008). Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares. Os intracelulares – dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol (PROH), etilenoglicol (EG) e glicerol (GLI) – de baixo peso molecular, agem causando a redução do ponto de fusão, aumento da viscosidade do meio e substituindo parcialmente as moléculas de água intracelulares (Rall *et al.*, 1984). Já os extracelulares – sacarose, rafinose, trealose, proteínas (soro fetal bovino) – fazem a proteção da membrana plasmática e auxiliam na desidratação celular (Hovatta *et al.*, 2005).

A criopreservação pode ser realizada em ovócitos, assim como em folículos ovarianos isolados ou inclusos em tecido ovariano. No caso dos ovócitos, obtidos na maioria das vezes por punção de folículos antrais, a criopreservação resulta em taxas de fecundação *in vitro* consideravelmente inferiores se comparadas às de ovócitos não criopreservados. Este fato pode ser explicado pela organização celular dos ovócitos completamente desenvolvidos. Estes possuem alta diferenciação celular, com estruturas altamente suscetíveis aos danos causados pela criopreservação, como grande quantidade de gotas lipídicas, presença de grânulos da cortical e zona pelúcida e, no caso de ovócitos maduros, fuso meiótico. Neste caso, baixas temperaturas podem causar despolarização dos microtúbulos que formam o fuso, erros na separação dos cromossomos, e indução de aneuploidia (Shaw *et al.*, 2000). Para evitar estes graves efeitos nas células, uma alternativa é a criopreservação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (FPA), que são células menos diferenciadas e mais resistentes às crioinjúrias.

Há uma série de fatores que caracterizam os ovócitos inclusos em FPA como mais resistentes à criolesão: menor tamanho do ovócito, células da granulosa em menor quantidade,

baixa taxa metabólica, núcleo em estágio de prófase da primeira divisão meiótica, ausência de grânulos corticais e baixa quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos sensíveis ao congelamento (Shaw *et al.*, 2000).

Os folículos pré-antrais (FPA) podem ser criopreservados de duas maneiras: inclusos em fragmentos de tecido ovariano ou isolados. A criopreservação de folículos isolados tem como vantagens a maior facilidade de perfusão do agente crioprotetor, uma vez que não há barreiras teciduais e possibilidade de acompanhamento dos folículos individualmente durante os procedimentos. Entretanto, a criopreservação de FPA isolados dificulta a realização de cultivo *in vivo*, que pode ser facilmente realizado com fragmentos ovarianos (transplantes), com possibilidade de retomada da função ovariana. Além disso, o tecido é de mais fácil manuseio e facilmente transportado, o que tem feito a grande maioria dos trabalhos em criopreservação utilizarem este método. Contudo, pode-se citar como desvantagem da criopreservação de tecido ovariano a lenta perfusão dos agentes crioprotetores (Hovatta, 2005).

Dois métodos são utilizados para a criopreservação de folículos pré-antrais, seja de fragmentos de tecido ovariano ou de folículos isolados: a vitrificação e o congelamento lento. A vitrificação é um processo que utiliza altas concentrações de crioprotetor. Além de rápido (20.000 a 40.000°C por minuto), é de baixo custo, uma vez que não requer equipamentos específicos (Lin *et al.*, 2008). Neste método, a água passa do estado líquido para o estado vítreo e, como não há passagem pelo estado cristalino, não há formação de cristais de gelo (Yeoman *et al.*, 2005).

Já o congelamento lento é realizado em freezer programável, equipamento de alto custo necessário para realização deste método. Esta técnica é caracterizada pela adição de baixas concentrações de crioprotetor (Paynter, 2000). A curva de congelamento já é estabelecida para felinos (Lima *et al.*, 2006). O resfriamento é realizado lentamente (2°C/min)

até -7°C, mantendo-se nesta temperatura por 10 a 15 minutos, quando é realizado o *seeding* (Lima *et al.*, 2006). A função do *seeding* é impedir a formação de gelo intracelular, induzindo a sua formação extracelular (Shaw *et al.*, 2000). Em seguida, a amostra continua sendo resfriada a 0,3°C/min até -35°C. No momento em que a desidratação celular é atingida (-30 a -80°C), o material é então estocado em nitrogênio líquido, a -196°C. O congelamento lento tem se mostrado eficaz na criopreservação de folículos inclusos em tecido ovariano felino (Tanpradit & Chatdarong, 2011).

A criopreservação de FPA é uma técnica já estabelecida para algumas espécies. Animais de laboratório, como os ratos (Fathi *et al.*, 2013), são os mais estudados nesta área. No caso dos camundongos, houve até mesmo nascimento de indivíduos vivos após FIV de ovócitos criopreservados (Wang *et al.*, 2011). Caninos (Terazono *et al.*, 2012), felinos (Luvoni *et al.*, 2012), caprinos (Carvalho *et al.*, 2013), ovinos (Sauvat *et al.*, 2013) e bovinos (Faheem *et al.*, 2013) são exemplos de espécies domésticas que tiveram células germinativas criopreservadas com sucesso, apresentando manutenção das características morfológicas ou retomada de atividade ovariana após transplante. Em animais selvagens, há relatos de criopreservação com posterior desenvolvimento *in vitro* em felinos selvagens (Wiedemann *et al.*, 2013), primatas, como os babuínos (Amorim *et al.*, 2013) e macaco rhesus (Ting *et al.*, 2011), e até mesmo elefantes (Gunasena *et al.*, 1998).

Para os felinos, sabe-se que há alta sensibilidade dos ovócitos aos crioprotetores (Murakami *et al.*, 2004). Apesar disso, o método de congelamento lento tem sido o de eleição para a conservação das células germinativas felinas com bons resultados. Bosch *et al.* (2004) obtiveram desenvolvimento folicular após xenotransplante de tecido ovariano felino para cápsula renal de ratos, comprovando a manutenção da integridade folicular após a criopreservação com EG a 1,5 M. Posteriormente, diferentes tipos e concentrações de

crioprotetores foram avaliados no congelamento lento de tecido ovariano felino e os resultados comprovaram que a adição de 1,5 M de EG foi mais eficaz do que a mesma concentração de glicerol no tocante à porcentagem de folículos íntegros encontrados (Lima *et al.*, 2006).

No caso dos felinos selvagens, um fator limitante para o estudo das células germinativas é a disponibilidade de ovários, uma vez que tratam-se de animais em extinção. Isto explica a escassez de trabalhos com tais espécies. Além disso, a maioria dos bancos de germoplasma de felinos selvagens é para armazenamento de sêmen, cuja coleta é menos invasiva do que a de tecido ovariano (Leon-Quinto *et al.*, 2009). Apesar disso, têm sido desenvolvidos trabalhos com manipulação de tecido ovariano de felinos selvagens. Wiedeman *et al.* (2012) realizaram a criopreservação por congelamento lento também com EG a 1,5 M de tecido ovariano de leoas. Estes autores também comprovaram a funcionalidade de tal método crioprotetor após o desenvolvimento de folículos antrais *in vivo* e maturação *in vitro* dos ovócitos.

O desenvolvimento de métodos para a criopreservação de folículos pré-antrais pode permitir a conservação dos mesmos até que sejam desenvolvidos protocolos eficientes de cultivo *in vitro* ou de transplante para sua completa maturação.

2.4 Transplante de tecido ovariano

Após a criopreservação, ovócitos podem ser destinados para desenvolvimento e maturação *in vitro*, transplante ou uma combinação de ambas as técnicas. Entretanto, a recuperação e o crescimento continuado desses ovócitos *in vitro*, a partir de estágios muito precoces até o estágio de metáfase II, na qual a fertilização pode ocorrer, representam um considerável desafio.

Há várias classificações no tocante à realização de transplantes. Uma das maneiras de classificar a técnica é de acordo com a relação filogenética entre doador e receptor. Desta forma, tem-se:

- autotransplante: quando o tecido é transplantado para o mesmo indivíduo de origem;
- alotransplante: quando o doador e o receptor do enxerto pertencem à mesma espécie, mas são geneticamente distintos;
- isotransplante: quando o doador e o receptor, além de pertencerem à mesma espécie, também são geneticamente semelhantes; tal técnica tem sido realizada em mulheres gêmeas homozigóticas para restabelecimento de capacidade reprodutiva (Silber *et al.*, 2008);
- xenotransplante: quando o doador e o receptor pertencem a espécies diferentes;

Outra forma de classificar o método de transplante é de acordo com o local de aplicação do enxerto: transplante ortotópico, que corresponde às situações em que o enxerto é aplicado em posição anatômica próxima à origem; ou transplante heterotópico, quando o implante é aplicado em posições distantes à anatômica original, como o tecido subcutâneo, músculo, entre outras.

Os primeiros relatos de transplante de tecido ovariano fresco foram descritos na década de 1940 (Biskind *et al.*, 1944, citado por Biskind *et al.*, 1950), quando foram realizados autotransplantes heterotópicos em ratos. Já na década de 1960, bons resultados foram descritos após autotransplante em hamster, no qual houve restabelecimento da função ovariana com desenvolvimento de folículos para estágios antrais (Caldwell *et al.*, 1966) e até mesmo nascimento de indivíduos vivos (Parrot, 1960). Mais adiante, nos anos 90, os estudos em animais de laboratório começaram a ser direcionados para a efetividade do transplante após tratamentos quimioterápicos (Aubard *et al.*, 1998), visando futuras aplicações em humanos. Hoje em dia, bons resultados têm sido descritos em animais de laboratório. Experimentos visando ao restabelecimento da fertilidade em camundongos através de

autotransplante (Wang *et al.*, 2013) ou até mesmo de folículos isolados (Ryung-Park *et al.*, 2013) após tratamentos citotóxicos têm sido frequentes e eficazes, sempre com nascimento de animais saudáveis.

Apesar de a ideia já ter sido citada na década de 1980 com estudos preliminares (Grischenko *et al.*, 1987), experimentos com transplante de tecido ovariano humano começaram a ser realizados na década de 1990. Nesta época, testes com xenotransplante de ovário humano para ratos imunodeficientes eram realizados (Weissman *et al.*, 1999). Nestas circunstâncias, os camundongos imunodeficientes (NOD-SCID) têm sido uma opção adequada para evitar morte do tecido ovariano devido a reações imunológicas. O melhor local para transplante ovariano nestas espécies é intramuscular, uma vez que esta região mostrou-se mais eficaz na manutenção da integridade do estroma ovariano com menores taxas de fibrose (Dath *et al.*, 2010).

Atualmente, as técnicas de transplante ovariano têm colaborado na manutenção da fertilidade humana nos casos em que mulheres passam por tratamentos quimioterápicos capazes de impedir a produção posterior de ovócitos viáveis (Dolmans *et al.*, 2013). Avanços significativos em humanos têm sido realizados nesta área com este intuito (Ernst *et al.*, 2010).

No caso de autotransplantes ortotópicos em mulheres, de acordo com Donnez *et al.* (2013), há duas técnicas, já estabelecidas e comprovadamente eficazes. A primeira consiste na retirada e congelamento de apenas um ovário antes do tratamento. A segunda técnica pode ser adotada quando ambos os ovários são retirados. Para tanto, fragmentos ovarianos são depositados em uma “janela” para neovascularização e a adesão é facilitada com cola de fibrina. Tais técnicas já possibilitaram o nascimento de bebês saudáveis espontaneamente (Donnez *et al.*, 2004; Ernst *et al.*, 2010; Revel *et al.*, 2011; Sánchez-Serrano *et al.*, 2010).

Além do sucesso com transplante ortotópico, alguns experimentos adotaram o método heterotópico de transplante ovariano em humanos. Oktay *et al.* (2001) utilizaram esta técnica e verificaram a retomada da atividade ovariana, com ovulação após dez semanas de transplante. Este mesmo grupo também obteve o desenvolvimento de um embrião *in vitro* com o retorno da atividade ovariana três meses pós-transplante (Oktay *et al.*, 2004). Entretanto, o primeiro relato de gravidez após autotransplante heterotópico ocorreu anos depois. Após o transplante para a parede abdominal, foi realizada a punção do ovócito seguida de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Os dois embriões produzidos foram transferidos e a gravidez gemelar foi confirmada por ultrassonografia (Stern *et al.*, 2013).

Relatos de transplante ovariano em humanos têm sido publicados com frequência nos últimos anos. Sabe-se que a taxa de sucesso nesta espécie é considerável. De acordo com Donnez *et al.* (2013), pelo menos 30 bebês nasceram até o ano de 2012 após transplante ovariano de tecido criopreservado.

Sobre a manutenção da atividade ovariana após o transplante em humanos, há alguns relatos. De acordo com Silber *et al.* (2012), o tempo mínimo já descrito de manutenção da fertilidade foi de dois anos em duas pacientes, de 26 e de 35 anos, que tiveram o ovário fresco transplantado para uma irmã gêmea durante o período de tratamento. Nestas mesmas circunstâncias, há relatos de funcionalidade ovariana mantida por mais de sete anos após o transplante. Já no caso de autotransplante pós-descongelamento, a viabilidade máxima alcançada do enxerto foi de quatro anos, entretanto, não menos eficaz, uma vez que proporcionou nascimento de dois bebês saudáveis sem intervenção médica após o transplante.

Cirurgias de transplante de tecido ovariano também têm sido descritas em outras espécies como ovinos (Denschlag *et al.*, 2005), bovinos (Kagawa *et al.*, 2009) e patos (Song *et al.*, 2012). Em caninos, por exemplo, aplicação de enxertos ovarianos foi proposta com o

intuito de prevenir efeitos colaterais da cirurgia de ovariectomia (Schossler *et al.*, 1999), como obesidade e vulvite associada à incontinência.

Xenotransplante já foi descrito em caninos (Abdel-Ghani *et al.*, 2011) e bovinos (Aerts *et al.*, 2010). Nestes casos, o melhor resultado obtido foi apenas a manutenção da viabilidade dos folículos após os transplantes. O desenvolvimento de folículos antrais foi descrito por Gosden *et al.* (1994) e Bosch *et al.* (2004) após xenotransplante de ovário ovino e felino, respectivamente, para camundongos imunossuprimidos. Em animais selvagens, para os quais o objetivo é preservar a diversidade genética das espécies ameaçadas de extinção, o xenotransplante tem sido o método mais utilizado (Wiedemann *et al.*, 2012; Gunasena *et al.*, 1998; Candy *et al.*, 1995).

Entretanto, no âmbito dos animais domésticos, o autotransplante é uma opção considerável para caracterizar os ciclos estrais e particularidades hormonais em cada espécie e, além disso, estabelecer protocolos eficazes aplicáveis em espécies com proximidade filogenética. Imhof *et al.* (2006) relataram a ocorrência de prenhez espontânea em ovelha após autotransplante ortotópico. Em relação aos autotransplantes heterotópicos, já foi descrito, em cadelas o, desenvolvimento de folículos antrais em enxertos transplantados sob a fáscia do músculo toracolombar (Terazono *et al.*, 2012a). Em ovelhas, o desenvolvimento de folículo antral foi relatado (Aubard *et al.*, 1999). O nascimento de indivíduos saudáveis foi relatado em macacos rhesus após autotransplante heterotópico seguido de punção do ovócito e ICSI (Lee *et al.*, 2004).

Especificamente em gatas domésticas, experimentos foram realizados para avaliar a eficácia do autotransplante heterotópico para o tecido subcutâneo da região abdominal. Crestana *et al.* (2006) puderam inferir em seu experimento que o acúmulo de tecido adiposo nesta região, após o procedimento cirúrgico, dificulta a localização dos enxertos para acompanhamento dos mesmos após o transplante. Neste caso, a reabsorção do tecido em

questão é uma possibilidade a ser considerada. Entretanto, o xenotransplante mostrou-se uma opção para os felinos. Bosch *et al.* (2004) obtiveram o desenvolvimento folicular até o estágio antral após xenotransplante de ovário de gatas domésticas para cápsula renal de camundongos imunossuprimidos. Em outro experimento, foi realizada a punção do ovócito e a maturação *in vitro* com sucesso até a quebra da vesícula germinativa (Fassbender *et al.*, 2007).

Sabe-se que a maior perda de folículos acontece até a neovascularização, sendo este tempo o maior fator limitante para a sobrevivência de folículos primordiais em enxertos transplantados. Desta forma, a escolha do local onde será realizado o implante é um fator determinante para o sucesso da técnica.

Buscando a prevenção das injúrias causadas pela isquemia, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no âmbito de avaliar a ação de alguns tratamentos realizados, tanto no enxerto antes da aplicação, quanto na receptora. A utilização de agentes antioxidantes como a vitamina E tem proporcionado maior porcentagem de folículos viáveis após o transplante, assim como maiores taxas de revascularização (Nugent *et al.*, 1998). Esta vitamina previne a peroxidação de lipídeos nas membranas celulares, proporcionando maior integridade estrutural das células e impedindo a consequente formação de radicais livres (Medeiros & Paulino, 2006). Nugent *et al.* (1998) relatam que tal vitamina proporciona redução da ação de peróxidos lipídicos sobre o enxerto. Entre as principais fontes de vitamina E, estão o óleo de germe de trigo, vegetais verdes e crus, óleos de sementes e gordura animal (Medeiros & Paulino, 2006). O ácido ascórbico e também o manitol resultaram na redução de radicais livres (Sagsoz *et al.*, 2002). Também alguns hormônios, como o folículo estimulante (FSH) e o luteinizante (LH) (Imthurn *et al.*, 2000) e fatores de crescimento, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Dissen *et al.*, 1994) foram utilizados. Além de fatores químicos, a ação mecânica

sobre o local onde será depositado o enxerto para promover ação inflamatória do local e, conseqüentemente, maior vascularização foi realizada com sucesso (Donnez *et al.*, 2004).

3 Justificativa

Os gatos domésticos são o modelo experimental ideal para estudos relacionados a felinos selvagens devido à sua proximidade filogenética com tais espécies. Desta forma, o melhoramento de técnicas de preservação de tecido ovariano de gatas domésticas pode possibilitar, futuramente, avanços no melhoramento da capacidade reprodutiva de animais em risco de extinção.

Cada vez mais, a criopreservação de células germinativas tem sido utilizada como método de promover a eficiência reprodutiva de espécies domésticas e selvagens, buscando melhores resultados na produção ou a prevenção da extinção, respectivamente. No caso dos felinos selvagens, tais métodos contribuem com o processo de formação de bancos de germoplasma, cuja quantidade de material genético disponível é escassa.

Como os ovócitos maduros fertilizáveis são bastante susceptíveis a crioinjúrias, a solução encontrada é a utilização de FPA, os quais estão presentes em maior quantidade e são mais resistentes à criopreservação. Porém, protocolos para o crescimento *in vitro* destes folículos ainda estão em fase de desenvolvimento e são muito inespecíficos. Uma solução mais prática e aplicável seria a criopreservação do tecido ovariano, com posterior transplante, para que o desenvolvimento ocorra *in vivo*. Problemas devido a reações imunológicas e rejeição seriam contornados com o autotransplante, que, se realizado heterotopicamente no tecido subcutâneo, facilita as avaliações e possíveis coletas de ovócito pós-transplante, diminuindo o estresse sofrido pelo animal durante o experimento; desta forma, custos com procedimentos cirúrgicos são reduzidos e a manipulação é facilitada.

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi testar a viabilidade da criopreservação de tecido ovariano felino, bem como da técnica de autotransplante heterotópico e sua aplicabilidade na Medicina Veterinária.

4.2 Objetivos Específicos

- Testar diferentes crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano de gatas domésticas;
- Verificar a eficiência da técnica de autotransplante heterotópico de ovários frescos em gatas domésticas;
- Verificar a eficiência da criopreservação de tecido ovariano de gata através de características morfológicas dos folículos;
- Avaliar o desenvolvimento folicular após autotransplante de tecido ovariano de gatas.

5 Material e métodos

O experimento foi subdividido em duas etapas: a primeira foi referente ao teste de criopreservação (Etapa 1) e a segunda consistiu nos procedimentos de autotransplante ovariano (Etapa 2).

5.1 Etapa 1 – Criopreservação de tecido ovariano felino

Com o intuito de determinar qual o melhor protocolo de congelamento para tecido ovariano felino, um teste de criopreservação foi realizado.

Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia, Metabolismo e Reprodução, do Departamento de Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB).

5.1.1 Delineamento experimental

Inicialmente, nove pares de ovários provenientes de nove animais adultos hígidos submetidos a procedimentos de ovário-histerectomia eletiva em clínica veterinária local foram utilizados. Foram testados os crioprotetores DMSO e EG, separadamente ou de forma associada. Três tratamentos foram avaliados: DMSO a 1,5M, EG a 1,5M e DMSO a 0,75M + EG a 0,75M. O método utilizado foi o de congelamento lento.

De cada par de ovários foram retirados oito fragmentos de córtex de 1 mm x 1 mm x 5 mm. Destes, dois fragmentos foram subdivididos e uma parte foi imediatamente fixada para histologia clássica e a outra para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os outros 6 fragmentos foram submetidos às incubações com crioprotetores.

5.1.2 Protocolo de criopreservação

Os fragmentos foram equilibrados a 10°C por 10 minutos em 1 ml de M199 acrescido de 0,4% de sacarose 10% SFB com uma das três diferentes soluções crioprotetoras (duas amostras em cada): DMSO a 1,5M, EG a 1,5M ou DMSO a 0,75M + EG a 0,75M. De cada solução crioprotetora, uma amostra foi referente ao teste de toxicidade do crioprotetor e foi submetida aos três banhos, de cinco minutos cada, em M199 acrescido de 10% SFB e 0,4% sacarose com concentrações decrescentes do(s) crioprotetor(es) em questão: o primeiro com 0,75 M de crioprotetor, o seguinte com 0,375 M e o último com ausência de crioprotetor, com a intenção de remover o mesmo do tecido sem causar estresse osmótico às células. As outras amostras foram transferidas para o equipamento de congelamento lento. O desenho experimental está ilustrado na Figura 2.

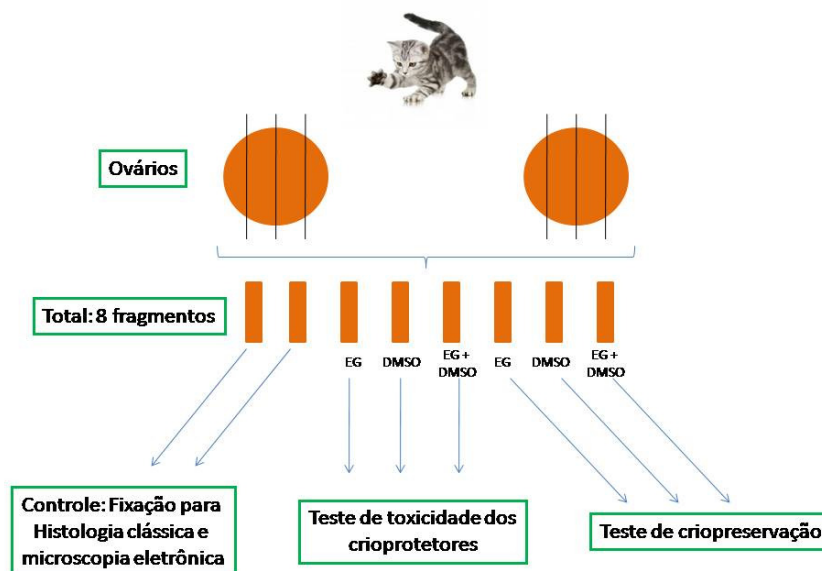


Figura 2. Delineamento experimental da Etapa 1.

Para o congelamento, independentemente da solução crioprotetora utilizada, os criotubos contendo os fragmentos de tecido ovariano foram resfriados a -7°C à velocidade de

2°C/min, e mantidos nesta temperatura por 15 minutos para a realização do *seeding*, resfriados até -35°C a 0,3°C/min e, por fim, submersos em nitrogênio líquido (-196°C) (Figura 3).

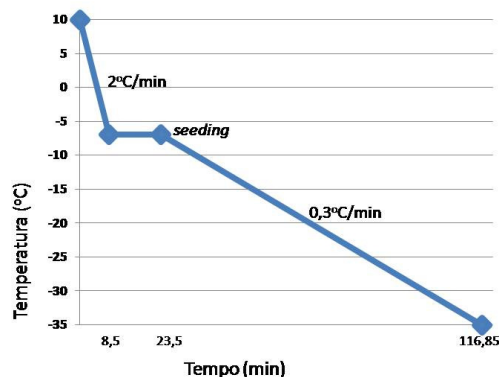


Figura 3. Curva de congelamento lento utilizada.

Após 45 dias estocadas as amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e submetidas ao protocolo de descongelamento. Primeiramente os criotubos foram mantidos em temperatura ambiente sobre a bancada por 1 minuto. Logo após, mergulhados em banho-maria a 37°C por 4 minutos. Após o completo descongelamento das amostras, foram realizados os banhos para retirada de crioprotetor, como descrito previamente para o teste de toxicidade. As amostras foram então fixadas e processadas para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

5.1.3 Microscopia de luz

As amostras destinadas à histologia clássica foram fixadas em Carnoy por 2 horas e, subsequentemente, mantidas em álcool 70%. Então, os espécimes foram submetidos ao processamento. Para a desidratação, cada fragmento foi banhado em soluções com concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e três banhos de álcool 100%). A diafanização foi realizada com três banhos de xilol de 1 hora cada. Para a inclusão, foram

realizados 3 banhos em paraplast, de 1 hora cada. Em seguida, o material foi colocado em formas de silicone, incluído em parafina e mantido em temperatura ambiente para endurecimento do bloco. Após o endurecimento dos blocos, os mesmos foram cortados com 5 µm de espessura e, então, as lâminas foram desparafinizadas (três banhos de xilol), reidratadas (banhos de álcool 100%, 90%, 80% e 70% e água) e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Logo após as secções, foram novamente desidratadas (álcool 70%, 80%, 90%, 100% e três banhos de xilol) e montadas, com a aplicação de lamínula sobre os cortes com verniz.

As lâminas obtidas do processamento histológico foram avaliadas pela contagem e classificação dos folículos morfológicamente normais e degenerados. Estes eram classificados como degenerados se apresentassem qualquer uma das seguintes características: núcleo do ovócito picnótico, ovócito com citoplasma retraído, vacúolos no citoplasma do ovócito, desorganização das células da granulosa ou descolamento do estroma. Os folículos eram ainda classificados como primordiais ou em crescimento, de acordo com a forma e o número de camadas de células da granulosa.

5.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras destinadas à MET foram fixadas em Karnovsky modificado (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2) por 4 horas, lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,1 M), pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) com ferrocianeto de potássio (1,6%) e cloreto de cálcio (5 mM), contrastadas *in bloc* em acetato de uranila (0,5%), lavadas e desidratadas com banhos sucessivos em concentrações crescentes de acetona, embebidas e incluídas em resina Spurr. Após o emblocamento, foram feitos cortes semi-finos (3 µm) para a localização dos folículos. As amostras foram então submetidas à ultramicrotomia, com espessura de 70 nm. As amostras foram avaliadas em

microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, JEM 1011) quanto às características e distribuição das organelas e membranas do ovócito e das células da granulosa.

5.1.5 Análise estatística

As porcentagens de folículos morfológicamente normais e nos diferentes estágios de desenvolvimento (primordial e em crescimento) foram calculadas em cada tratamento. Os dados foram transformados para $\arcsen\sqrt{\%}$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre os tratamentos pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5.2 Etapa 2 – Transplantes de tecido ovariano

Esta etapa do projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB), sob número UnBDOC 76940/2012. Os animais foram mantidos no Biotério do IB/UnB, localizado na cidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil ($15^{\circ} 78'$ de latitude sul e $47^{\circ} 93'$ de longitude oeste). O clima é tropical de altitude com verão úmido e chuvoso e inverno seco, temperatura média anual de 19°C , 12 horas/luz por dia, precipitação média de 378,9 mm de chuva por mês e umidade relativa do ar média de 67,5% (INMET – Brasília – DF).

Os procedimentos de processamento histológico foram realizados no Laboratório de Neuroendocrinologia, Metabolismo e Reprodução, Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, UnB.

As cirurgias, bem como os implantes, foram realizados em clínica veterinária local. As biopsias foram realizadas na sala de procedimentos do Biotério do IB, UnB.

5.2.1 Animais

Para a realização desta etapa do experimento, foram utilizadas cinco gatas, sem raça definida, provenientes de Centro de Controle de Zoonoses (DIVAL – Diretoria de Vigilância Ambiental – Brasília – DF). Não foi possível obter a idade exata dos animais, mas todos eram adultos no momento do resgate, estimado de acordo com seu tamanho. Além disso, os animais apresentavam histórico comprovado de fertilidade. Todas as gatas eram negativas para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e para o vírus da leucemia felina (FELV) e foram vermifugadas no momento da transferência para o gatil de experimentação. As gatas foram mantidas por um período de adaptação de 1 mês em acompanhamento clínico para assegurar que estivessem saudáveis no momento da cirurgia e após os transplantes. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentadas com ração comercial seca conforme suas necessidades corporais e água fresca *ad libitum*.

5.2.2 Delineamento Experimental

Os animais foram submetidos ao procedimento de ovário-histerectomia bilateral. Após a retirada, os ovários foram limpos de tecidos adjacentes e lavados em solução salina. Cada ovário foi então cortado em quatro fragmentos de aproximadamente 1 x 1 x 5 mm, totalizando oito fragmentos por animal. Um dos fragmentos de cada ovário foi imediatamente fixado para posterior análise por histologia, conforme descrito anteriormente, para servir de controle (Figuras 4 e 5).

Os animais foram submetidos ao autotransplante de fragmentos de ovários frescos (n=6) no tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço durante o mesmo procedimento cirúrgico (Figura 4).



Figura 4. Esquema do procedimento adotado para o transplante de tecido ovariano fresco. ML: microscopia de luz.

5.2.3 Protocolo anestésico e cirurgia

As gatas foram mantidas em jejum alimentar de 12 horas prévias ao procedimento. Previamente à cirurgia, foram submetidas a protocolo anestésico adaptado de Cunha *et al* (2002) e Schiochet *et al.* (2007): pré-anestesia com acepromazina (0,2 mg/kg) e meperidina (5 mg/kg) aplicadas via intramuscular, indução anestésica com quetamina (3 mg/kg) e midazolam (0,5 mg/kg) e a manutenção com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100%. Também, antibioticoterapia profilática (Enrofloxacina, 5 mg/kg) e anti-inflamatório (Cetoprofeno, 2 mg/kg) foram administrados previamente ao procedimento cirúrgico. O procedimento de castração foi realizado segundo Fossum (2007).

Os animais tiveram seis fragmentos (três de cada ovário) imediatamente aderidos ao tecido subcutâneo da região cervical dorsal (Figuras 5 e 6), durante o mesmo procedimento cirúrgico em que os ovários foram removidos. Antes da aplicação, os fragmentos eram rapidamente banhados em solução de iodo a 1% seguido de três banhos em solução fisiológica a 0,9% estéril para antissepsia dos enxertos. O local para aplicação dos enxertos foi selecionado devido à baixa deposição de tecido adiposo pós-cirurgia nesta região. Além

disso, trata-se de uma região de difícil acesso para lambedura, evitando possíveis infecções posteriores. O local foi identificado posteriormente mantendo-se a região tricotomizada.

Todas as gatas receberam uma aplicação de vitamina E (Monovin E®) no dia dos transplantes (5 mg/kg) para prevenir a produção de radicais livres e promover a viabilidade do enxerto até a neovascularização (Nugent *et al.*, 1998).



Figura 5. Fotos ilustrativas da aplicação dos enxertos na região dorsal do pescoço das gatas.

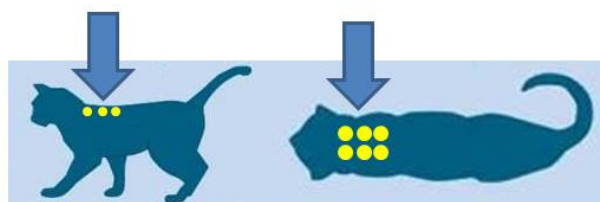


Figura 6. Local de aplicação dos implantes no tecido subcutâneo.

5.2.4 Acompanhamento dos animais após os transplantes

Após os transplantes (o dia do transplante foi considerado sempre como o dia 0 do tratamento), as gatas foram acompanhadas semanalmente para verificar o retorno ao ciclo estral por meio de avaliação do comportamento, citologia vaginal e ultrassonografias. As biopsias de tecido ovariano transplantado foram retiradas nos dias 7, 14, 28, 49 e 63 pós-transplante (Figura 7).

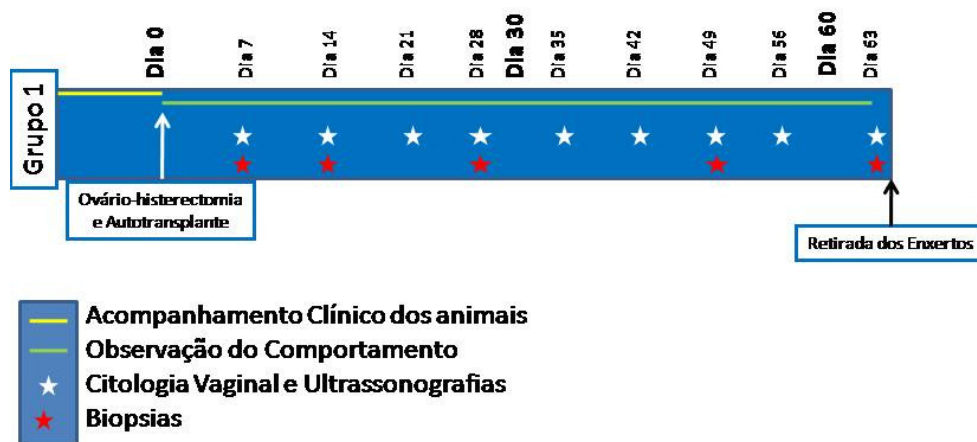


Figura 7. Cronologia dos procedimentos e avaliações realizados nas gatas.

A avaliação do comportamento foi realizada diariamente. As alterações comportamentais consideradas relevantes foram aumento da vocalização, lordose associada a tremor do trem posterior, apresentação da região perineal e lateralização frequente da cauda. De acordo com a ocorrência, as alterações comportamentais eram registradas em ata para posterior associação com possível desenvolvimento folicular.

A citologia vaginal foi realizada semanalmente. Ao final do experimento, a sequência de lâminas confeccionadas para a citologia vaginal foi avaliada e comparada de acordo com o perfil celular apresentado: ocorrência de células parabasais, intermediárias, superficiais nucleadas e superficiais anucleadas, neutrófilos e hemácias. A partir desta avaliação, foi interpretado o perfil de cada animal durante o período referente ao experimento e se houve alterações que pudessem representar alterações hormonais do ciclo estral.

As avaliações por ultrassom foram realizadas semanalmente com o intuito de acompanhar a localização e o desenvolvimento dos transplantes e possível desenvolvimento de folículos antrais. Os tipos de imagens observadas durante as avaliações ultrassonográficas de cada fragmento durante o exame foram:

- ecogenicidade mista (EM): fragmentos em que a imagem revelava áreas de característica mista, com pontos tanto hipocóicos quanto hiperecóicos;

- possível folículo (PF): classificação dada aos fragmentos em que foram identificados círculos hipocóicos, sugestivos de cavidades repletas com líquido que poderiam corresponder a folículos antrais;

- fragmento encapsulado (FE): fragmentos que apresentavam uma cápsula de tecido conjuntivo ao redor do fragmento implantado, visualizado facilmente pelo ultrassom como uma fina camada hiperecólica circundando uma área mais hipocólica;

- processo inflamatório (IN): caracterizado por hiper-ecogenicidade, com espessamento das bordas;

- vascularização (VS): caracterizada por ausência do espessamento das bordas do fragmento, o que caracteriza boa adesão e, conseqüentemente, vascularização.

5.2.5 Avaliação por histologia clássica

Com o objetivo de avaliar o sucesso do transplante pela sua revascularização e desenvolvimento folicular um dos fragmentos de tecido ovariano transplantados foi retirado após 7, 14, 28, 49 e 63 dias de transplante. Para as biopsias, os animais encontravam-se sedados e sob analgesia (quetamina 5 mg/kg e xilazina 0,5 mg/kg). O material obtido foi processado para avaliação por histologia clássica, conforme já descrito para a Etapa 1 do trabalho. A análise por microscopia de luz consistiu na avaliação das estruturas foliculares, do estroma ovariano bem como da presença de vasos sanguíneos.

As lâminas obtidas do processamento histológico foram avaliadas como descrito para a Etapa 1 do experimento. Os folículos eram contados e considerados normais quando apresentaram núcleo do ovócito não picnótico e células da granulosa organizadas. Em

algumas amostras, devido à grande alteração morfológica, as estruturas foram descritas de acordo com a forma que apresentaram.

6 Resultados

6.1 Etapa 1 – Teste de criopreservação de tecido ovariano felino

6.1.1 Microscopia de luz

Devido à baixa quantidade de folículos encontrados nos estágios primário e secundário, ambos foram classificados como folículos em crescimento. No total, 4582 folículos foram avaliados por microscopia de luz: 3893 folículos primordiais e 689 em crescimento. A partir da avaliação do tecido fixado na microscopia de luz, foram calculadas as porcentagens médias de FPA morfolologicamente normais. Tais resultados encontram-se na Tabela 1. A análise estatística revelou uma porcentagem de FPA morfolologicamente normais significativamente menor ($P < 0,05$) em todos os tratamentos de criopreservação quando comparados ao grupo controle. Os testes de toxicidade com os diferentes crioprotetores não apresentaram diferença estatística em relação ao controle ou ao congelamento. Entre os defeitos encontrados nos folículos primordiais analisados, os mais freqüentes foram os núcleos de ovócitos picnóticos, que caracterizam-se pela extrema condensação da cromatina que proporciona uma coloração mais acidófila ao núcleo. Já entre os folículos em crescimento, houve descolamento da estrutura folicular do estroma ovariano, com espaço vazio entre folículo e células do estroma e também presença de vacúolos no citoplasma do ovócito, que consistiam de grandes círculos claros que foram sugestivos de gotas lipídicas. O estroma ovariano apresentou-se frouxo nos tecidos observados. (Figura 8).

Tabela 1. Porcentagem de folículos morfologicamente normais encontrados nos diferentes tratamentos de criopreservação na avaliação pela microscopia de luz.

Tratamento	% Fol. Morf. Normais	% Primordiais Normais	% Em Crescimento Normais
Controle	94,45 ± 4,80 ^a	95,12 ± 4,47 ^a	82,02 ± 21,33 ^a
EG	80,56 ± 8,57 ^b	80,06 ± 10,19 ^b	74,24 ± 21,75 ^a
DMSO	78,70 ± 11,36 ^b	78,91 ± 12,57 ^b	76,47 ± 25,65 ^a
EG+DMSO	75,87 ± 13,89 ^b	78,85 ± 13,17 ^b	70,27 ± 26,63 ^a
TT EG	90,79 ± 3,50 ^{ab}	90,34 ± 2,55 ^{ab}	87,55 ± 18,20 ^a
TT DMSO	88,80 ± 9,69 ^{ab}	88,91 ± 9,21 ^{ab}	86,32 ± 17,45 ^a
TT EG+DMSO	83,11 ± 10,38 ^{ab}	82,88 ± 8,61 ^{ab}	79,48 ± 29,12 ^a

^{a, b} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$). TT EG: teste de toxicidade com etilenoglicol; TT DMSO: teste de toxicidade com DMSO; TT EG+DMSO: teste de toxicidade com EG + DMSO

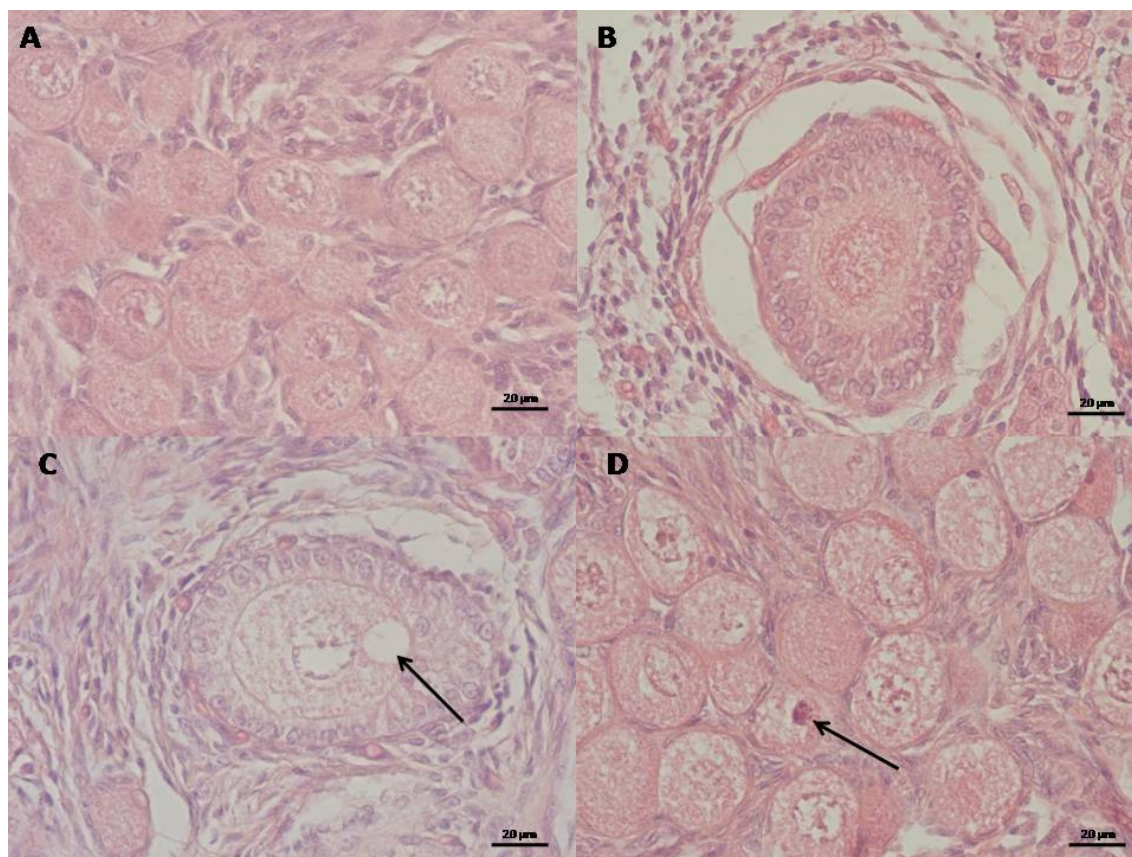


Figura 8. Folículos pré-antrais de gata doméstica corados com HE. A) Pool de folículos primordiais normais; B) folículo secundário com descolamento de estroma; C) folículo primário com vacúolo no citoplasma do ovócito (seta); D) folículo primordial com núcleo picnótico (seta).

6.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Durante a avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão, os folículos (n=4) das amostras frescas (controle, Figura 9) apresentaram ovócito aderido às células da granulosa ou início de formação de zona pelúcida com prolongamentos da membrana plasmática. As organelas estavam bem distribuídas no citoplasma, com abundância de mitocôndrias arredondadas e cisternas de retículo endoplasmático (Figuras 9A e B). Além disso, os folículos analisados apresentaram gotas lipídicas de tamanho médio com eletrondensidades diferentes (Figuras 9C e D).

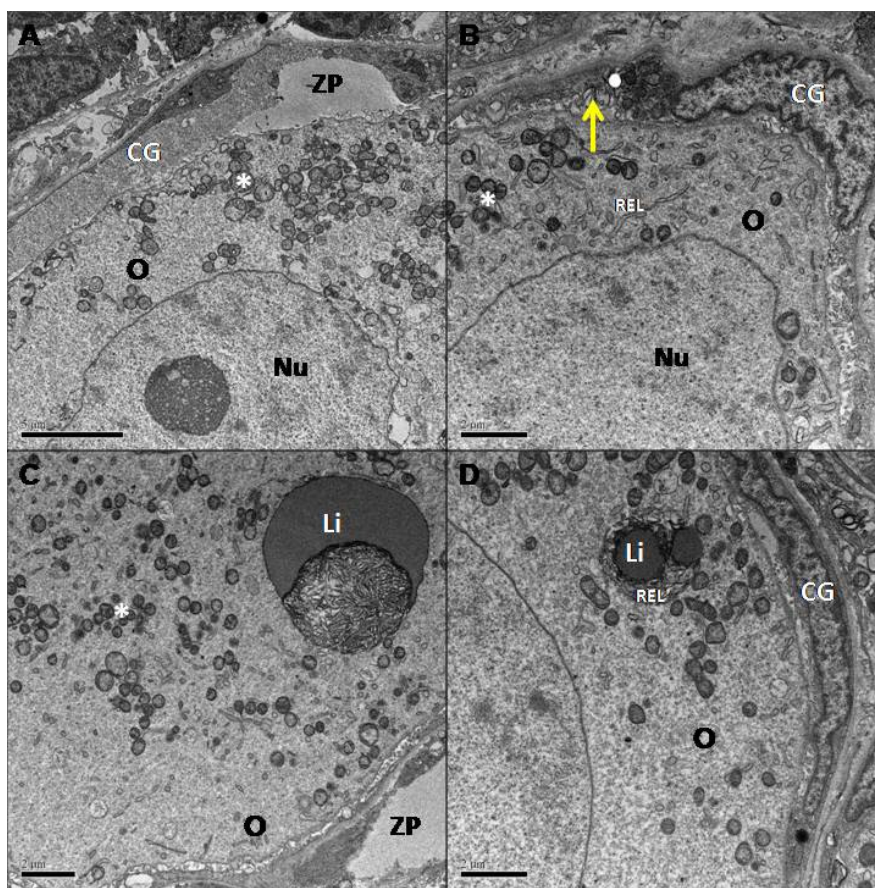


Figura 9. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais em tecido ovariano de gata fresco (controle). A) início de formação da zona pelúcida (ZP), adesão entre ovócito e célula da granulosa (CG). Barra = 5 μ m; B) microvilosidades entre ovócito e células da granulosa (seta amarela); C) gota lipídica (Li) apresentando cisternas de retículo endoplasmático liso associadas; D) presença de retículo endoplasmático liso (REL) anexo à gota lipídica (Li). CG: célula da granulosa, O: ovócito, Nu: núcleo do ovócito, ZP: zona pelúcida, REL: retículo endoplasmático liso, (*) mitocôndrias. Barras = 2 μ m.

No tecido congelado com DMSO (Figura 10), os folículos (n=12) apresentaram grande similaridade com o grupo controle. As mitocôndrias estavam com eletron densidade normal e bem distribuídas (Figuras 10A e B). Algumas mitocôndrias foram classificadas como pleomorfas e continham muitas cristas. Foi observado material de zona pelúcida em alguns folículos, entre o ovócito e as células da granulosa, onde eram vistas microvilosidades se projetando. As gotículas de lipídeo apresentavam tamanho normal (Figura 10A).

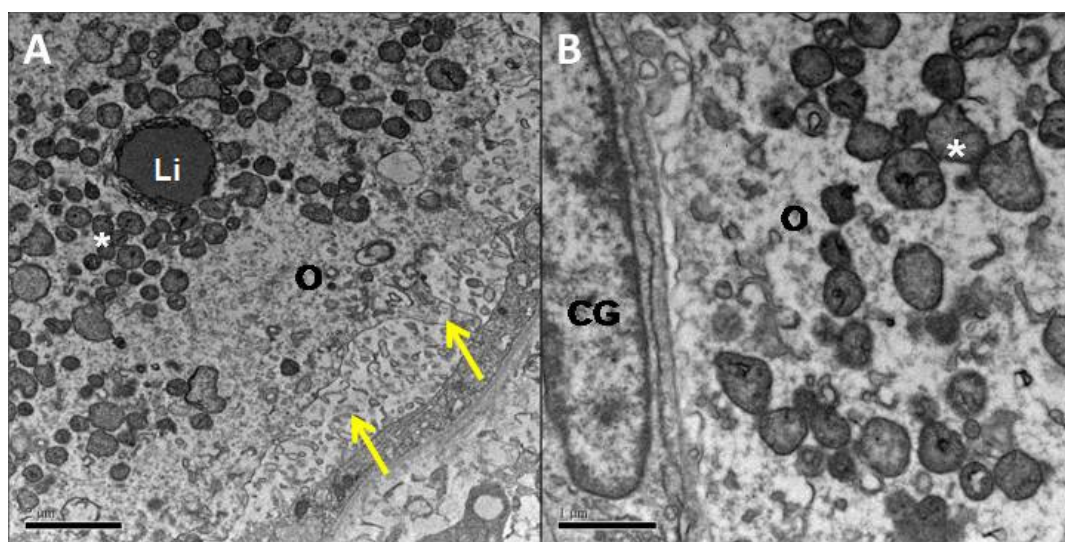


Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais em tecido ovariano criopreservado com DMSO. A) mitocôndrias (*) com eletron densidade normal bem distribuídas pelo citoplasma do ovócito e gota lipídica (Li) com retículo endoplasmático liso ao redor, microvilosidades na região de deposição de zona pelúcida (setas amarelas); B) boa adesão entre o ovócito (O) e a célula da granulosa (CG), Mitocôndrias (*). Barras = 1 µm.

Já a avaliação dos folículos (N=8) do grupo criopreservado com EG (Figura 11) evidenciou algumas características indesejáveis. Foi possível observar descolamento do ovócito das células da granulosa, que foi a principal alteração encontrada (Figura 11A). O citoplasma apresentou granulação, cisternas de retículo endoplasmático dilatadas e vesículas claras, e muitas vezes apresentava áreas vazias na região perinuclear (Figura 11A e B).

Alguns folículos apresentavam grandes gotas lipídicas podendo ocupar até $\frac{1}{4}$ do citoplasma (Figura 11B).

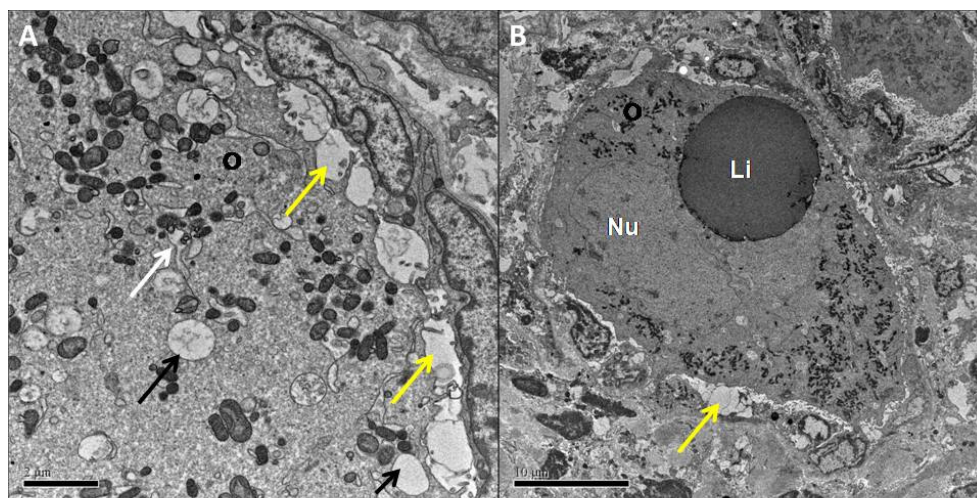


Figura 11. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais em tecido ovariano criopreservado com EG. A) descolamento do ovócito (O) das células da granulosa (CG) sem microvilosidades (setas amarelas) e vesículas claras (setas branca e preta). Barra = 2 μm ; B) grande gota lipídica (Li) pressionando o núcleo (Nu), espaço entre ovócito e célula da granulosa (seta amarela). Barra = 10 μm .

Os folículos (n=4) no tecido ovariano criopreservado com EG+DMSO (Figura 12) apresentaram sinais claros de degeneração com descolamento entre o ovócito e as células da granulosa, vesículas e grumos no citoplasma do ovócito (Figura 12A e B). Além disso, pôde-se observar, neste tratamento, o rompimento da membrana plasmática em vários pontos (Figura 12C) e separação das camadas interna e externa da membrana nuclear (Figura 12D).

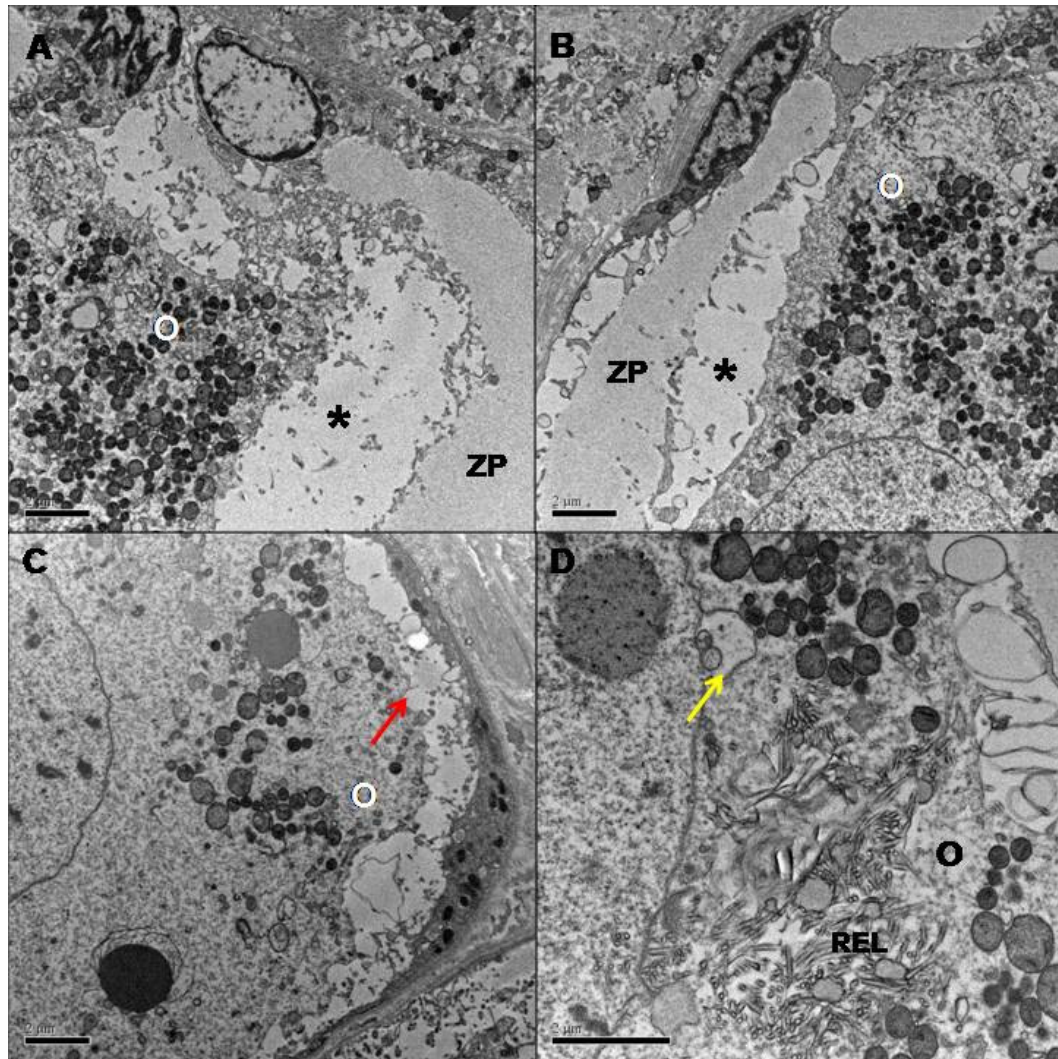


Figura 12. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais no tecido ovariano criopreservado com EG+DMSO. A e B) folículos degenerados apresentando destacamento (*) da zona pelúcida (ZP) e tanto do ovócito (O) quanto das células da granulosa (CG); Notar os grumos no citoplasma do ovócito. C) rompimento de membrana plasmática (seta vermelha); D) separação entre as camadas interna e externa da membrana nuclear (seta amarela) e desorganização das cisternas de retículo endoplasmático liso (REL). Barras = 2 µm.

O presente experimento teve como um de seus objetivos determinar o melhor método de criopreservação para o tecido ovariano felino. De acordo com a avaliação histológica, os três protocolos utilizados apresentaram resultados semelhantes. Entretanto, a microscopia eletrônica de transmissão revelou maior eficiência do DMSO para criopreservação do tecido ovariano felino.

6.2 Etapa 2 – Transplantes de tecido ovariano

Durante o período do experimento, os animais apresentaram-se clinicamente bem e ganharam peso. Não houve problemas que pudessem causar perdas nos resultados do experimento. Um animal demonstrou problemas gastrointestinais durante o período de adaptação à nova ração, foi prontamente atendido e medicado até sua completa recuperação. Nos dias seguintes à cirurgia de castração, alguns animais apresentaram processo inflamatório da ferida cirúrgica. Estes animais foram tratados com antibioticoterapia (enrofloxacina 5 mg/kg) durante sete dias após a cirurgia. Ao final do experimento, todos os animais foram doados.

Durante todo o período pós-transplante do experimento, os fragmentos eram palpáveis e facilmente identificáveis sob a pele dos animais, devido à localização escolhida para as aplicações (região dorsal do pescoço) não sofrer grande deposição de tecido adiposo.

6.2.1 Avaliações ultrassonográficas

Alguns fragmentos não foram encontrados em algumas análises ultrassonográficas devido à sua localização sobre o osso da escápula. Em alguns transplantes, foi possível constatar a presença de vascularização, processo inflamatório e identificação de “estruturas circulares hipoeecóicas”, que poderiam corresponder a folículos antrais.

Os resultados de tais avaliações para cada animal em cada dia encontram-se no Anexo 1.

Imagens obtidas por ultrassom (Figura 13) mostraram as características de enxertos bem vascularizados, com ecogenicidade mista, cápsula de tecido conjuntivo, inflamação e revelaram folículos antrais encontrados nos animais 3 e 4.

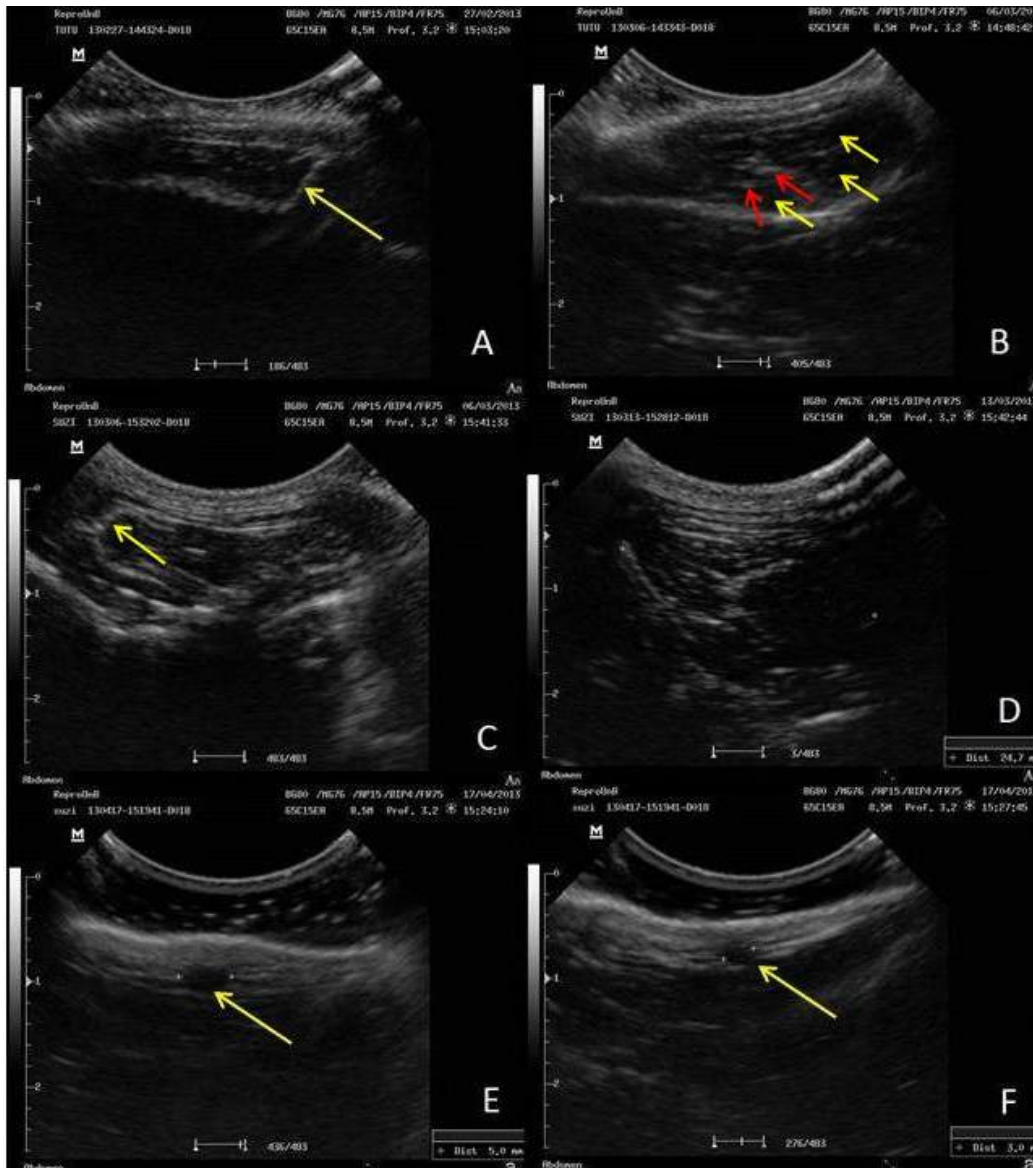


Figura 13. Imagens ultrassonográficas típicas das características encontradas nos implante subcutâneo de tecido ovariano de gata. A) amostra encapsulada (seta); B) fragmento com ecogenicidade mista: áreas hipoeecóicas (setas amarelas) e áreas hipereecóicas (setas vermelhas); C) fragmento com processo inflamatório, ecogênico e com espessamento das bordas (seta); D) fragmento bem vascularizado, com ausência de cápsula e bem aderido; E e F) identificação de possível folículo antral (setas) aos 56 dias pós-transplante no animal 3.

A escolha do fragmento a ser retirado foi realizada de acordo com a característica do implante ao ultrassom. Quando o implante era identificado como “ecogenicidade mista”, “vascularização” ou como “possível folículo”, o mesmo era mantido no animal, viabilizando possível desenvolvimento folicular em períodos mais avançados de transplante.

6.2.2 Avaliação histológica do tecido ovariano transplantado

A porcentagem de implantes recuperados foi de 100%. A média de folículos analisados por biopsia foi de $181,36 \pm 24,78$.

A avaliação histológica dos fragmentos fixados imediatamente após a ovariectomia (controle) possibilitou verificar a presença de folículos primordiais, primários, secundários e até mesmo antrais. Folículos poliovulares (com mais de um ovócito) foram identificados em algumas amostras, mas não foram quantificados. A porcentagem média de folículos normais encontrados nos fragmentos controle (ovário fresco) foi de $94,79 \pm 3,23\%$. Dos folículos primordiais analisados, $91,54 \pm 7,18\%$ eram morfolologicamente normais e dos folículos em crescimento $76,49 \pm 31,17\%$ eram morfolologicamente normais.

Os fragmentos de biopsias apresentaram uma cápsula de tecido conjuntivo ao redor do tecido ovariano transplantado (Figura 14A). Além disso, algumas biopsias também apresentaram tecido adiposo anexo à cápsula de tecido conjuntivo (Figura 14B). Muitos vasos sanguíneos foram identificados em meio ao tecido ovariano e à cápsula de conjuntivo (Figuras 14C e D).

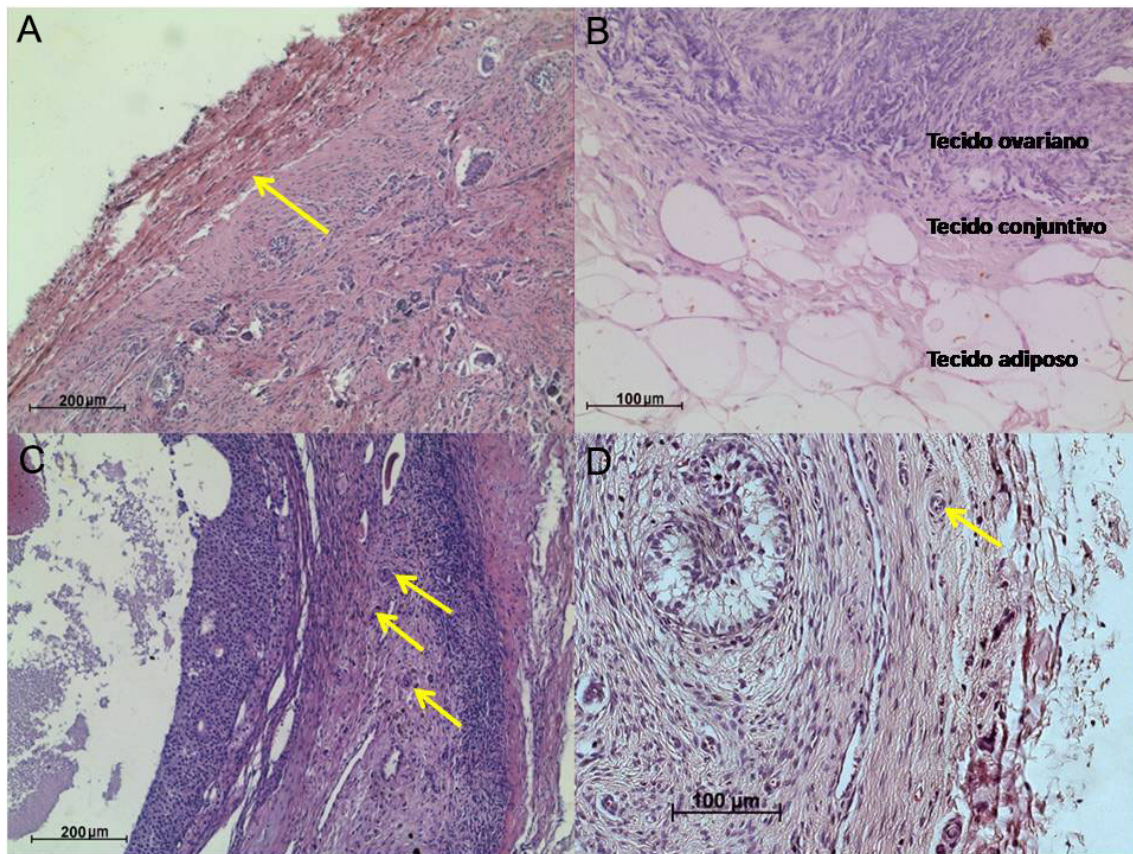


Figura 14. Tecido ovariano biopsiado em diversos períodos pós-transplante. A) Cápsula de tecido conjuntivo aderida ao tecido ovariano após 42 dias de transplante (seta). B) Tecido adiposo aderido à capsula de conjuntivo após 28 dias de transplante. C) Vasos sanguíneos (setas) presentes no tecido ovariano próximo a um folículo antral após 63 dias de transplante. D) Vaso sanguíneo (seta) presente na cápsula de tecido conjuntivo após 28 dias de transplante.

Foi possível observar todas as classes foliculares (primordiais, primários, secundários e antrais, Figura 15), após o transplante de tecido ovariano fresco. Houve grande diferença individual entre as biopsias coletadas no mesmo dia para os diferentes animais. Pôde-se observar que a maioria dos folículos pertencentes ao grupo dos primordiais foi classificada como normal ao longo de todo o período do estudo ($89,61 \pm 12,35$). As médias de folículos morfológicamente normais bem como a de folículos degenerados encontrados nas biopsias dos dias 7, 14, 28, 49 e 63 encontram-se na Tabela 2. Dentre os folículos morfológicamente normais, a distribuição nas classes de primordial e em crescimento encontra-se na Tabela 3.

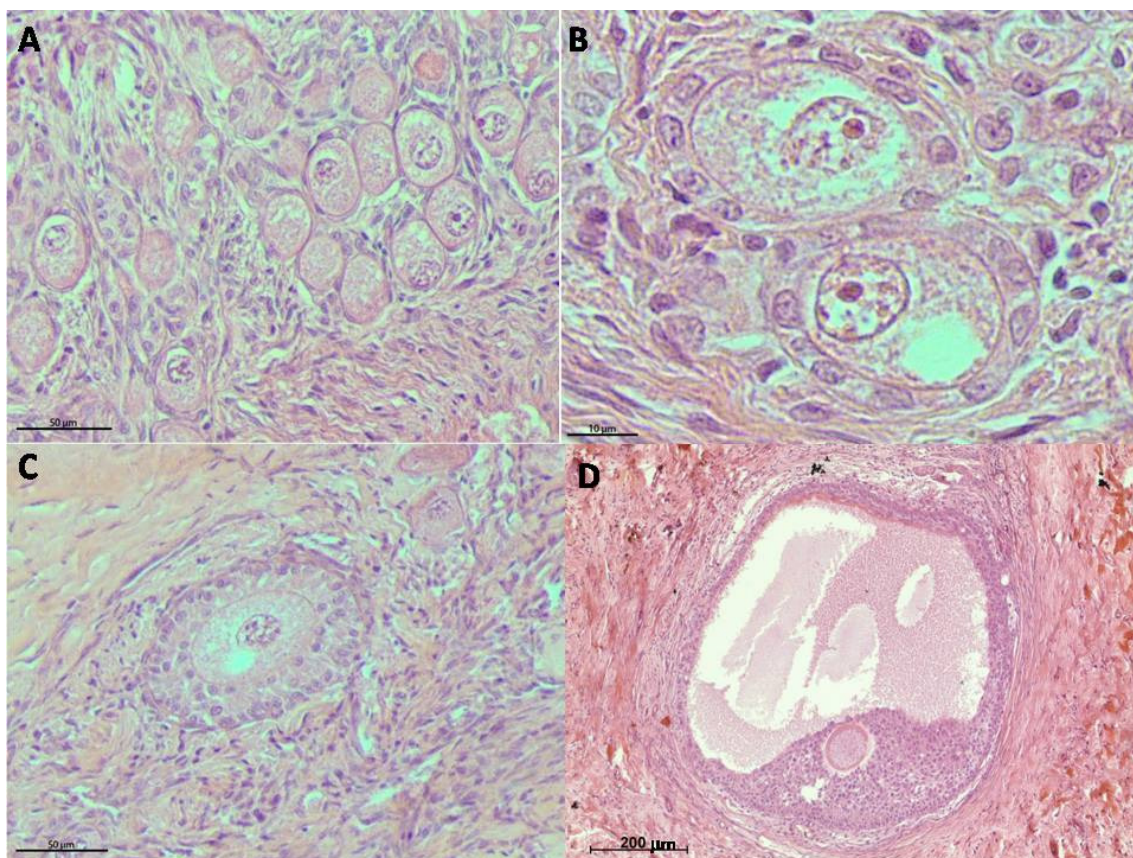


Figura 15. Folículos ovarianos morfologicamente normais observados nas biopsias. A) Folículos primordiais após 7 dias de transplante. B) Folículos primários após 63 dias de transplante. C) Folículo secundário após 42 dias de transplante. D) Folículo antral após 28 dias de transplante.

Tabela 2. Porcentagens médias de folículos ovarianos morfologicamente normais e degenerados encontrados nas biopsias.

Dias	Primordiais	Em crescimento	Totais	Degeneração tipo 1	Degeneração tipo 2	Outros
0 dias	97,68±0,66	88,56±9,91	94,79±3,23	0	0	5,21±3,23
7 dias	68,66±28,83	7,15±8,73	44,36±30,56	39,98±23,51	8,13±7,19	7,50±0,14
14 dias	81,65±24,57	2,78±2,14	46,95±13,97	8,29±11,72	42,28±0,47	2,46±2,72
28 dias	99,47±0,74	5,93±5,75	51,22±14,12	0	48,46±14,54	0,3±0,42
49 dias	99,49±0,72	15,55±18,4	54,80±36,47	0	44,81±37,00	0,37±0,52
63 dias	90,74±11,29	23,96±34,36	21,13±17,03	0	73,98±23,92	4,86±6,88

Tabela 3. Distribuição dos folículos morfologicamente normais nas classes de desenvolvimento (primordial e em crescimento).

Dias	Folículos morfologicamente normais	
	Primordiais	Em crescimento
7 dias	95,75±2,70	4,24±2,70
14 dias	96,88±3,04	3,12±3,04
28 dias	94,47±2,00	5,52±2,00
49 dias	92,17±2,02	7,82±2,03
63 dias	78.66±16.97	21.33±16.97

Os fragmentos de tecido ovariano transplantados e biopsiados apresentaram folículos com características peculiares, que foram classificadas como defeitos. Dentre os folículos em desenvolvimento, nas biopsias dos dias 7 e 14 houve um tipo de degeneração folicular caracterizada por ovócito com citoplasma acidófilo e ausência de núcleo (Degeneração tipo 1, Figuras 16A e B). Outra alteração bastante comum foi caracterizada como estruturas foliculares com células da granulosa justapostas que cobriam a região do ovócito (Degeneração tipo 2, Figura 16C e D). Outros defeitos observados foram semelhantes àqueles já descritos na Etapa 1 do experimento: núcleo picnótico e descolamento do estroma ovariano.

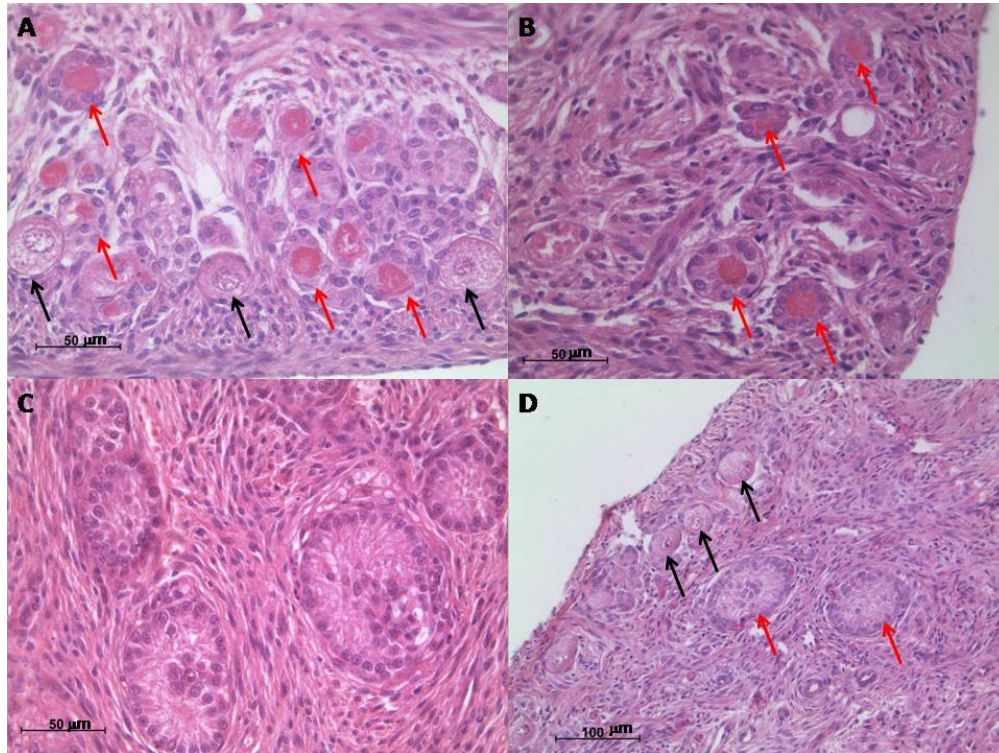


Figura 16. Folículos com degenerações encontrados nas biopsias de tecido ovariano. A) Folículos com degeneração do tipo 1 (setas vermelhas) próximos a folículos normais (setas pretas) após sete dias de transplante. B) Folículos com degeneração tipo 1 (setas vermelhas) após 14 dias de transplante. C) Folículos com degeneração tipo 2 após 49 dias de transplante. D) Folículos com degeneração tipo 2 (setas vermelhas) próximo a folículos primordiais normais (setas pretas) após 14 dias de transplante.

Os animais 3, 4 e 5 apresentaram desenvolvimento de folículo antral após autotransplante de tecido ovariano fresco. No animal 3, houve desenvolvimento de um folículo antral (1,8 mm de diâmetro) após 63 dias de transplante (Figura 17A). Já o animal 4 teve folículos antrais em três biopsias (Figura 17B a D): dias 28 (1 folículo – 0,6 mm), 49 (1 folículo – 0,6 mm) e 63 pós-transplante (dois folículos – 1,0 e 0,8 mm). O animal 5 apresentou folículos luteinizados nos dias 28 e 49, e 1 folículo antral (1,1 mm) no dia 63 (Figura 17E e F).

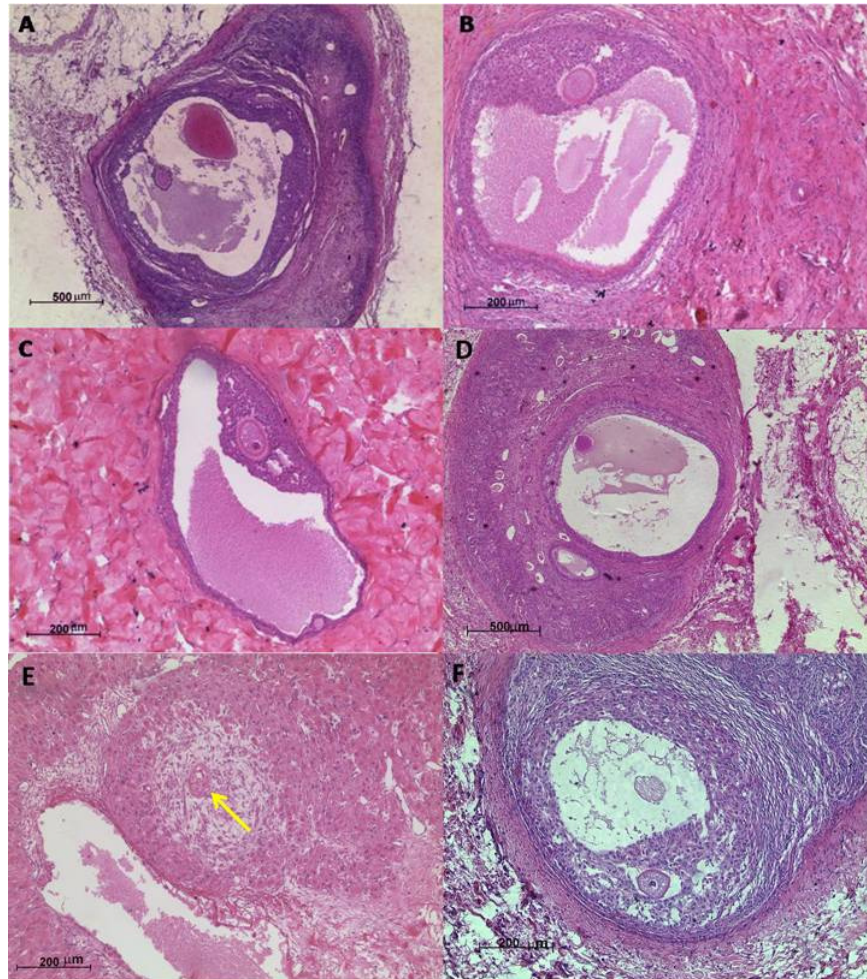


Figura 17. Estruturas foliculares encontradas em tecido ovariano biopsiado: A) Folículo antral presente na biopsia de tecido ovariano do animal 3 após 63 dias de transplante; B-D) Folículos antrais presentes nas biopsias de tecido ovariano do animal 4 após 28 (B), 49 (C) e 63 (D) dias de transplante; E-F) folículos presentes nas biopsias de tecido ovariano do animal 5: E) Folículo luteinizado com ovócito (seta amarela) após 49 dias de transplante; F) folículo antral após 63 dias de transplante.

6.2.3 Comportamento e citologia vaginal

Alterações comportamentais foram verificadas apenas no animal 4 do nos dias 14, 47 e 63 após o transplante. O animal apresentou lordose associada a tremor do trem posterior. Após a apresentação do comportamento de cio nos dias 14, 47 e 63, foram realizadas análises ultrassonográficas, que revelaram a presença de um círculo hipocóico. As biopsias comprovaram a presença de, pelo menos, um folículo antral nos dias 49 e 63. No dia 14, o

fragmento transplantado que apresentou círculo hipoecóico na análise ultrassonográfica não foi biopsiada neste dia. A avaliação do comportamento das demais gatas não revelou alterações durante o período pós-transplante.

A citologia vaginal não revelou diferenças expressivas no período avaliado em nenhuma das gatas. A maior concentração celular encontrada foi dos tipos parabasais e superficiais nucleadas. Em menor quantidade, também foram encontradas células intermediárias, superficiais anucleadas, neutrófilos e hemácias. Apesar disso, não foi possível estabelecer uma ciclicidade a partir da observação semanal das lâminas de acordo com as concentrações e tipos celulares observados.

7 Discussão

O presente estudo teve como um de seus objetivos (primeira etapa) comparar o efeito de três soluções crioprotetoras, o EG, DMSO e EG associado a DMSO, na criopreservação de tecido ovariano felino. Os resultados da microscopia de luz não revelaram diferença significativa entre as três soluções crioprotetoras (contendo EG, DMSO ou EG+DMSO) testadas no protocolo de congelamento lento. Lima *et al.* (2006) compararam o etilenoglicol com glicerol também no congelamento lento de ovário de gatas domésticas, ambos na concentração de 1,5 M. Os resultados obtidos levaram os autores à conclusão de que etilenoglicol promove melhor preservação da morfologia dos folículos após o descongelamento. Os autores obtiveram 58% de folículos morfologicamente normais quando criopreservados com EG, menor do que o observado no presente trabalho (~80%). Esta diferença entre os resultados pode ser explicada pelo fato da retirada de crioprotetor após o descongelamento não ter sido gradativa, o que pode ter causado choque osmótico e consequente morte dos folículos (Santos, 2000). Além disso, também deve-se citar a variação encontrada entre diferentes animais.

Apesar de existirem poucos trabalhos com congelamento de tecido ovariano de gata, há vários já realizados em outras espécies. No experimento de Borges *et al.* (2009), no qual foi feita a comparação entre diferentes crioprotetores (DMSO, EG, propanodiol e glicerol) em tecido ovariano suíno, os melhores resultados foram obtidos com DMSO a 1,5 M e EG a 1,5 M, com 67% e 81% de folículos morfologicamente normais, respectivamente. Tais valores estão próximos aos encontrados com DMSO (78%) e EG (80%) em nosso experimento. Assim como no presente experimento, Borges *et al.* (2009) também não encontraram diferença significativa na porcentagem de folículos morfologicamente normais entre os tratamentos. Também Lucci *et al.* (2004), ao compararem os resultados de diferentes crioprotetores em diferentes concentrações para criopreservação de tecido ovariano da vaca,

puderam concluir que o DMSO mostrou-se mais eficaz (74-88%) quando comparado com EG (32-52%). O DMSO tem se mostrado eficaz na criopreservação de tecido ovariano em várias espécies, como já comprovado em diversos experimentos (Celestino *et al.*, 2007 – bovinos, Hovatta *et al.*, 1996 – humanos, Gunasena *et al.*, 1997 – camundongos, Salle *et al.*, 1998 – ovinos).

As porcentagens de folículos morfológicamente normais observadas nos testes de toxicidade (TT EG, TT DMSO e TT EG+DMSO) não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos valores referentes ao tecido ovariano fresco (controle) e nem com aqueles referentes ao tecido ovariano criopreservado em qualquer tratamento (EG, DMSO ou EG+DMSO). O teste de toxicidade é uma ferramenta importante para constatar possíveis danos ocasionados ao tecido ovariano unicamente pelos agentes crioprotetores. Estes testes também já foram realizados em outros experimentos com tecido ovariano mamífero (Rodrigues *et al.*, 2004; Lucci *et al.*, 2004; Cecconi *et al.*, 2004), algumas vezes apontando agentes crioprotetores inadequados antes mesmo da criopreservação. No presente trabalho, os crioprotetores testados não foram tóxicos ao tecido ovariano felino nas condições utilizadas.

A caracterização ultraestrutural dos folículos pré-antrais em ovários de gatas que não foram criopreservados mostrou espaços entre o ovócito e as células da granulosa com prolongamentos da membrana citoplasmática e com deposição de zona pelúcida, desde a classe de primordial. Carrijo Jr. *et al.* (2010), ao realizarem a caracterização ultraestrutural de folículos ovariano felinos, também identificaram a formação destes prolongamentos em direção à zona pelúcida. Outra característica encontrada nestes folículos durante a análise ultraestrutural foi a presença de gotas lipídicas. Muitas vezes, estas gotas apresentaram cisternas de retículo endoplasmático associadas. Estes achados já foram apresentados por Isachenko *et al.* (2001) em suínos. Estes autores ressaltam que as gotículas lipídicas podem ter eletrondensidades diferentes, como observado no presente experimento. No caso dos

felinos, a presença de gotas lipídicas é uma característica normal já relatada em outros trabalhos (Guraya *et al.*, 1965; Carrijo Jr. *et al.*, 2010).

A análise ultraestrutural dos folículos criopreservados apontou o método com DMSO como o mais eficaz, mostrando folículos com características semelhantes às encontradas em fragmentos de ovário fresco. Borges *et al.* (2009), ao avaliarem a ultraestrutura de folículos ovarianos suínos, relataram que as características encontradas pós-descongelamento com EG ou DMSO foram semelhantes às aquelas visualizadas nos fragmentos controle. Em folículos bovinos criopreservados com DMSO, também pôde-se observar a normalidade da ultraestrutura do ovócito com apenas algumas alterações nas células da granulosa (Lucci *et al.* 2004). Já os folículos criopreservados com EG ou EG+DMSO, no presente experimento, apresentaram algumas alterações ultraestruturais, como descolamento entre ovócito e células da granulosa, rompimento da membrana plasmática e até mesmo separação da bicamada lipídica da membrana nuclear. Também puderam ser evidenciadas áreas vazias e vesículas no citoplasma, características já mencionadas por outros autores após criopreservação de tecido ovariano de outras espécies (Rodrigues *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2009).

Segundo Shaw *et al.* (2000), as associações de crioprotetores têm se mostrado mais eficientes. Entretanto, ao contrário do que se podia esperar, os resultados observados no presente experimento mostraram que a associação de EG e DMSO não foi efetiva. Normalmente, assume-se que, usando uma associação de crioprotetores se terá a soma dos efeitos benéficos. No presente trabalho, na avaliação ultraestrutural, o que ocorreu foi a soma dos efeitos deletérios, provavelmente pela baixa concentração de crioprotetores utilizada (0,75 M de cada), em especial de DMSO, uma vez que o EG já havia se mostrado menos eficiente.

Outro objetivo do nosso experimento foi estabelecer uma técnica para avaliar a eficácia de métodos de criopreservação de ovário felino. Para tanto, o autotransplante

heterotópico, como já descrito em outras espécies, foi escolhido por possibilitar a retomada da função ovariana com menores chances de se desenvolver reações imunológicas.

Nossos resultados revelaram que o autotransplante heterotópico de tecido ovariano para o subcutâneo de gatas possibilita a retomada da atividade ovariana, sendo, portanto, uma técnica viável para avaliar a eficácia de métodos de criopreservação. Aubard *et al.* (1999) realizaram autotransplante subcutâneo de ovário em ovelhas e puderam concluir que a técnica foi eficaz no restabelecimento da atividade ovariana. Entretanto, em gatas, Crestana *et al.* (2006) chegaram à conclusão de que o autotransplante heterotópico de ovário realizado para o subcutâneo da parede abdominal é pouco eficaz, uma vez que grande parte dos fragmentos não foi recuperada. Segundo os autores, o desaparecimento dos enxertos pode ter sido ocasionado pela reabsorção ou deposição de gordura no local após a ovariectomia, que impossibilitou a localização dos fragmentos transplantados. No presente experimento foi estabelecido outro local para o implante (região dorsal do pescoço), onde não ocorresse grande deposição de tecido adiposo após a castração, e 98% dos transplantes puderam ser recuperados. Transplantes aplicados em regiões periféricas têm a vantagem de serem acessados sob anestesia local e de serem facilmente puncionados para FIV (Terazono *et al.*, 2012a).

Nossos resultados provam que a reanastomose vascular realizada no momento do transplante por alguns autores (Jeremias *et al.*, 2002; Martinez-Madrid *et al.*, 2004) é dispensável para felinos domésticos, uma vez que, mesmo com as injúrias sofridas até a completa reperusão sanguínea, ainda houve desenvolvimento folicular até o estágio antral, o que prova a manutenção da atividade folicular. De maneira semelhante, Imhof *et al.* (2006) puderam concluir em seu experimento após autotrasplante ortotópico de ovários ovinos que a reanastomose vascular é um procedimento dispensável, uma vez que não apresentou melhor

viabilidade folicular quando comparado ao transplante de fragmentos de tecido ovariano sem reanastomose.

As análises realizadas pelo ultrassom auxiliaram o acompanhamento e localização dos enxertos. É um método não invasivo e mostrou-se vantajoso em nosso experimento, uma vez que possibilitou a escolha dos fragmentos a serem biopsiados. A avaliação semanal nos possibilitou constatar o desenvolvimento dos folículos antrais, que ocorreu em três dos cinco animais, totalizando seis folículos. Fassbender *et al.* (2007) avaliaram xenotransplante de ovário felino para ratos por ultrassom. Além da presença de folículos antrais, outra característica avaliada pelos autores através do ultrassom foi a viabilidade do enxerto, que foi determinada pelo tamanho e desenvolvimento semanal de cada implante.

As alterações comportamentais correspondentes a cio, registradas nos dias 14, 47 e 63 no animal 4, foram concomitantes com a presença de folículos antrais observados na ultrassonografia e posteriormente comprovada pela histologia. Os animais 3 e 5, mesmo com desenvolvimento folicular comprovado, não apresentaram comportamento de estro característico como o animal 4, cujo comportamento foi facilmente identificado. Tal fato pode ser atribuído à possibilidade dos animais terem diferentes níveis de liberação de estradiol na corrente sanguínea, como proposto por Wildt *et al.* (1981). Tais níveis de estradiol foram, ainda, insuficientes para determinar alterações a nível de epitélio vaginal das gatas do experimento. No caso do animal 4, é possível que a produção de estradiol tenha sido suficiente para provocar comportamento de cio, ao contrário do que ocorreu nos animais 3 e 5, apesar de não ter sido suficiente para promover o pico de LH, como observado no animal 5. Em geral, gatas domésticas possuem uma fase folicular com vários folículos se desenvolvendo em conjunto (Shille *et al.*, 1979). Entretanto, nas gatas do presente experimento que apresentaram folículos antrais, houve a presença de apenas um folículo de cada vez, sendo que o animal 3 desenvolveu apenas um folículo antral durante todo o período

do experimento. Resultados semelhantes foram reportados por Terazono *et al.* (2012b) após autotransplante de ovário em cadela. Entretanto, Fassbender *et al.* (2007), após xenotransplante de ovário de gata, puderam observar a presença de vários folículos antrais nos enxertos transplantados para a cápsula renal de ratos imunossuprimidos. A alta taxa de desenvolvimento folicular neste caso pode ser atribuída ao local escolhido para implante dos fragmentos, a cápsula renal, que possui maior vascularização e, provavelmente, promove a revascularização mais rápida dos fragmentos.

No presente experimento, de modo geral, os folículos primordiais mantiveram sua morfologia normal ao longo do período avaliado após os transplantes. Ao contrário, os folículos em crescimento sofreram queda na porcentagem de folículos morfologicamente normais a partir da primeira semana de transplante, e um aumento a partir do dia 49 pós-transplante. Este padrão observado nos permitiu concluir que os folículos que, no momento do transplante já se encontravam em crescimento, foram mais suscetíveis às injúrias causadas pela ausência de perfusão sanguínea. Segundo Shaw *et al.* (2000), o ovócito incluso em folículos primordiais possui menor taxa metabólica e, portanto, apresenta menor demanda nutricional, sendo portanto mais resistentes a condições sub-ótimas. A manutenção da morfologia dos folículos primordiais, associada à grande redução dos folículos em crescimento normais nos dias 7, 14 e 28 pós-transplante seguida de um aumento nos dias 49 e 63, sugere que os folículos primordiais podem manter sua viabilidade, serem ativados e desenvolverem-se após a revascularização do transplante.

Dentre os folículos avaliados nas cinco biopsias realizadas, um padrão foi observado: nas biopsias dos dias 7 e 14 houve um tipo específico de degeneração – Degeneração tipo 1 – que acometeu apenas folículos em crescimento. A partir do dia 28 pós-transplante, este tipo de degeneração esteve ausente, e um outro tipo foi frequentemente observado - Degeneração tipo 2. A maioria dos trabalhos de transplante não faz referência à morfologia dos folículos

encontrados (Ernst *et al.*, 2010; Meiorow *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2004). A ênfase dada aos bons resultados obtidos a partir de transplantes ovarianos, como o nascimento de indivíduos vivos (Sánchez-Serrano *et al.*, 2010), altos níveis de estradiol sérico (Khoram *et al.*, 2010) ou o desenvolvimento de folículos antrais (Denschlag *et al.*, 2005) é de grande relevância, pois confirma o sucesso da técnica. Entretanto, a avaliação e caracterização dos folículos primordiais e em crescimento presentes no tecido ovariano transplantado, como realizado no presente experimento, também é de extrema importância, uma vez que auxilia no esclarecimento dos processos fisiológicos reprodutivos femininos.

Folículos luteinizados foram identificados no presente experimento nas amostras dos dias 28 e 49 pós-transplante do animal 5. Tais estruturas já foram descritas em ovários bovinos após protocolos de superovulação (Monniaux *et al.*, 1983). Segundo estes autores, morfologicamente, estes folículos podem ser diferenciados de um corpo lúteo ou de um corpo hemorrágico pela presença do ovócito em meio às células luteínicas. Fisiologicamente, estas estruturas podem surgir devido à liberação espontânea de LH em momentos errôneos, que é ocasionada pela administração de gonadotropinas como PMSG (gonadotropina coriônica equina), como demonstrado em caprinos por Armstrong *et al.* (1982). No presente experimento, é provável que o animal 5 tenha apresentado um pico de LH, ocasionado pelo aumento na secreção de estradiol pelo folículo, levando à luteinização do folículo antral presente nas biopsias dos dias 28 e 49. Como já descrito por Shille *et al.* (1979), as gatas domésticas são animais de ovulação induzida. Com a cópula, o pico de LH ocorre, levando à ovulação e início do desenvolvimento de corpo lúteo. Entretanto, algumas podem ovular espontaneamente sem o estímulo mecânico da cópula, como comprovado pelo padrão hormonal de gatas na ausência de machos descrito por Lawler *et al.* (1993).

8. Conclusão e considerações finais

A partir dos resultados observados na Etapa 1 do presente experimento, pôde-se concluir que a utilização de M-199 contendo DMSO a 1,5 M suplementado com 10% de SFB e 0,4% de sacarose é eficaz na manutenção das características morfológicas e ultraestruturais de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de gatas domésticas após congelamento lento.

A técnica de autotransplante heterotópico de tecido ovariano para o subcutâneo da região do pescoço de gatas mostrou-se eficaz na manutenção da capacidade de desenvolvimento folicular pelo tecido transplantado. Apesar das injúrias causadas aos folículos em desenvolvimento até a completa reperfusão sanguínea, os folículos primordiais mantiveram sua viabilidade e capacidade de ativação. Com isso, o desenvolvimento de folículos antrais ocorreu em três dos cinco animais em que o transplante de ovário fresco foi realizado, comprovando a manutenção da viabilidade folicular e capacidade de desenvolvimento pós-transplante.

Novos experimentos estão sendo desenvolvidos com o autotransplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado em gatas domésticas. Caso seja possível comprovar a possibilidade de desenvolvimento folicular *in vivo* pós-transplante de tecido ovariano criopreservado, o fornecimento de ovócitos fertilizáveis poderá promover nascimentos em gatos domésticos. Com isso, a técnica poderá ser testada em felinos em risco de extinção, auxiliando, de fato, a manutenção da variabilidade genética destas espécies através de técnicas como o alotransplante ou o xenotransplante.

Já estão previstas análises hormonais a partir de metabólitos de estradiol presentes nas fezes dos animais, que foram coletadas diariamente. A partir dos resultados observados,

poderão ser determinadas variações na secreção de estradiol sérica presente nos animais que desenvolveram folículos antrais durante o experimento.

9. Referências bibliográficas

- Abdel-Ghani, M.A., Abe, Y., Asano, T., Suzuki, H. Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice. *Reproduction Medicine Biology*, v.10, p.259–266, 2011.
- Aerts, J.M.J., Martinez-Madrid, B., Leroy, J.L.M.R., Van Aelst, S., Bols, P.E.J. 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, p.708-714, 2010.
- Alves, A.E., Kozel, A.C., Luvoni, G.C. Vitrification with DAP 213 and Cryotop of Ex Situ and In Situ Feline Cumulus–Oocyte Complexes. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.1003-1008, 2012.
- Amorim, C.A., Jacobs, S., Devireddy, D.V., Langendonck, A.V., Vanacker, J., Jaeger, J., Luyckx, V., Donnez, J., Dolmans, M.M. Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Human Reproduction*, DOI: 10.1093/humrep/det103, 2013.
- Anderson, E., Albertini, D.F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *Journal of Cell Biology*, v.71, n.2, p.680-686, 1976.
- Armstrong, D.T., Pfitzner, A.P., Porter, K.J., Warnes, G.M., Janson, P.O., Seaman, R.F. Ovarian responses of anoestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotrophin. *Animal Reproduction Science*, v.5, p.15-23, 1982.
- Aubard, Y., Newton, H., Scheffer, G., Gosden, R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, v.79, p.83-87, 1998.
- Aubard, Y., Piver, P., Cognié, Y., Fermeaux, V., Poulin, N., Driancourt, M.A. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Human Reproduction*, v.14, p.2149-2154 1999.
- Beaumont, H.M., Mandl, A.M. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proceedings of the Royal Society of London*, v.155, n.961, p.557-579, 1962.

Biskind, G.R., Kordan, B., Biskind, M.S. Ovary transplanted to spleen in rats: the effect of unilateral castration, pregnancy, and subsequent castration. *Cancer Research*, v.10, p.309-318, 1950.

Borges, E.N., Silva, R.C., Futino, D.O., Rocha-Junior, C.M.C., Amorim, C.A., Bão, S.N., Lucci, C.M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, v.59, p.195-200.

Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H.J., Miller, D.M., Winingar, J.D., Massey, J.B., Lamb, S.V. Brackett, B.G. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v.61, p.581-594, 2004.

Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E., Graham, L.H. Comparative Aspects of Steroid Hormone Metabolism and Ovarian Activity in Felids, Measured Noninvasively in Feces. *Biology of Reproduction*, v.51, p.776-786, 1994.

Caldwell, B.V., Pawling, R.S., Wright, P.A. Reestablishment of Ovarian Periodicity After Transplantation to the Syrian Hamster Cheek Pouch. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.123, p.551-553, 1966.

Candy, C.J., Wood, M.J., Whittingham, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Human Reproduction*, v.10, n.9, p.2334-2338, 1995.

Carrijo Jr., O. A. Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas domésticas. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, (2009).

Carrijo Jr., O.A., Marinho, A.P.S., Campos, A.A., Amorim, C.A., Bão, S.N., Lucci, C.M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, v.191, p. 152-160, 2010.

Carrilho, D.J. Comparação Entre o Congelamento Lento e a Vitriificação na Criopreservação de Tecido Ovariano de Suínos. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2013.

Carvalho, A.A., Faustino, L.R., Silva, C.M.G., Castro, S.V., Lopes, C.A.P., Santos, R.R., Bão, S.N., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*, v.138, p.220– 227, 2013.

Cecconi, S., Capacchietti, G., Russo, V., Berardinelli, P., Mattioli, M., Barboni, B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biology of Reproduction*, v.70, p.12-17, 2004.

Celestino, J.J.H., Santos, R.R., Lopes, C.A.P., Martins, F.S., Matos, M.H.T., Melo, M.A.P., Bão, S.N., Rodrigues, A.P.R., Silva, J.R.V, Figueiredo, J.R. Preservation of

bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*, v.108, p.309-318, 2007.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Klomkleaw, W., Tharasanit, T., Techakumphu, M., Lohachit, C. Combination of dimethylsulphoxide and ethylene glycol improves survival of preantral follicles after ovarian tissue vitrification in domestic cats. In: *Proceedings of the 9th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference April 1*, p. 140, 2010.

Crestana, F. M., Jacomini, J.O., Beletti, M.E., Silva, J.M., Lima, C.A.P., Silva, S.V.S. Autotransplantação de Ovário no Subcutâneo e Consumo Folicular em Gatas Domésticas (*Felis catus*). *Veterinary Notice*, v.12, p.131-140, 2006.

Cunha, J.M.C.C.P., Cortopassi, S.R.G., Machado, A. Analgesia transoperatória induzida pela morfina ou meperidina em gatos submetidos a osteossíntese. *Ciência Rural*, v.32, p.67-72, 2002.

Dath, C., Van Eyck, A.S., Dolmans, M.M., Romeu, L., Vigne, D., Donnez, J., Van Langendonck, A. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Human Reproduction*, v.25, n.7, p.1734–1743, 2010.

Denschlag, D. *et al.* Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue in sheep. *Fertility and Sterility*, v. 83, n. 2, p.501-503, 2005.

Dissen, G.A., Lara, H.E., Fahrenbach, W.H., Costa, M.E., Ojeda, S.R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, v.134, p.1146-1154, 1994.

Dolmans, M.M., Jadoul, P., Gilliaux, S., Amorim, C.A., Luyckx, V., Squifflet, J., Donnez, J., Van Langendonck, A. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.30, p.305–314, 2013.

Donnez, J., Dolmans, M.M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B., Van Langendonck, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, v.364, p.1405-1410, 2004.

Donnez, J., Dolmans, M.M., Pellicer, A., Diaz-Garcia, C., Serrano, M.S., Schmidt, K.T., Ernst, E., Luyckx, V., Andersen, C.Y. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and Sterility*, v.99, n.6, p.1503-1513, 2013.

Elmoazzen, H.Y. Parameters affecting water permeability across biological cell membranes Tese de Mestrado, UNIVERSITY OF ALBERTA, (2000).

Erickson, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v.25, p.800-805, 1966.

- Ernst, E., Bergholdt, S., Jorgensen, J.S., Andersen, C.Y. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*, v.25, n.5, p.1280–1281, 2010.
- Faheem, M.S., Carvalhais, I., Baron, E., Silva, F.M. Effect of Bovine Ovarian Tissue Vitrification on the Structural Preservation of Antral Follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.774-780, 2013.
- Fassbender, M., Hildebrandt, T.B., Paris, M.C., Colenbrander, B., Jewgenow, K. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. *Journal of Reproduction and Development*, v.5, p.1023-1034, 2007.
- Fathi, R., Valojerdi, M.R., Salehnia, M. Effects of Different Cryoprotectant Combinations on Primordial Follicle Survivability and Apoptosis Incidence After Vitrification of Whole Rat Ovary. *Cryoletters*, v.34, n.3, p.228-238, 2013.
- Feldman, E.C., Nelson, R.W. in *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Ed. Saunders, p.1016-1044, 2004.
- Gosden, R. G., Boulton, M. I., Grant, K. & Webb, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *Journal of reproduction and fertility*, v.101, p.619-623, 1994.
- Grischenko, V.I., Chub, N.N., Lobyntseva, G.S., Demina, L.G., Chadayev, V.E. Creation of a bank of cryopreserved human ovarian tissue for allotransplantation in gynaecology. *Kriobiologia*, v.3, p.7–11, 1987.
- Grynberg, M., Poulain, M., Sebag-Peyrelevade, S., le Parco, S., Fanchin, R., Frydman, N. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v.97, n.6, p.1260-1268, 2012.
- Gunasena, K.T., Lakey, J.R.T., Villines, P.M., Critser, E.S., Critser, J.K. Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue to Athymic Mice. *Biology of Reproduction*, v.57, p.226-231, 1997.
- Gunasena, K.T., Lakey, J.R.T., Villines, P.M., Bush, M., Raath, C., Critser, E.S., McGann, L.E., Critser, J.K. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant *Loxodonta africana* ovarian tissue. *Animal Reproduction Science*, v.53, p.265–275, 1998.
- Guraya, S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *Journal of Experimental Zoology*, v.160, p.123-136, 1965.
- Hafez, B. & Hafez, E.S.E. in *Reprodução Animal*. Ed. Manole, p.33-54, 2004.
- Hovatta, O., Silye, R., Krausz, T., Abir, R., Margara, R., Trew, G., Lass, A., Winston, R.M.L. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human reproduction*, v.11, p.1268-1272, 1996.

Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *RBM Online*, v.10, p.729-734, 2005.

Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van Den Hurk, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, v.16, n.2, p.78–80, 1994.

Hyttel, P., Viuff, D., Fair, T., Laurincik, J., Thomsen, P.D., Callesen, H., et al. Ribosomal RNA expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, v.122, p.21–30, 2002.

Imhof, M., Bergmeister, H., Lipovac, M., Rudas, M., Hofstetter, G., Huber, J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertility and Sterility*, v. 85, p.1208-1215, 2006.

Imthurn, B., Cox, S.L., Jenkin, G., Trounson, A.O., Shaw, J.M. Gonadotrophin administration can benefit ovarian tissue grafted to the body wall: implications for human ovarian grafting. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, p.141-146, 2000.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. 2013. In <www.inmet.gov.br> Acesso em 19 de setembro de 2013.

Isachenko, V., Isachenko, E., Michelmann, H.W., Alabart, J.L., Vazquez, I., Bezugly, N., Nawroth, F. Lipolysis and Ultrastructural Changes of Intracellular Lipid Vesicles after Cooling of Bovine and Porcine GV-oocytes. *Anatomy, Histology Embriology*, v.30, p.333-338, 2001.

Jeremias, E., Bedaiwy, M.A., Gurunluoglu, R., Biscoti, C.V., Siemionow, M., Falcone, T. Heterotopic autotransplantation of the ovary with microvascular anastomosis: a novel surgical technique. *Fertility and Sterility*, v.77, p.1278-1282, 2002.

Jewgenow, K., Goritz, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. *Animal Reproduction Science*, v.39, p.285-297, 1995.

Jewgenow, K., Penfold, L.M., Meyer, H.H.D., Wildt, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.112, p.39-47, 1998.

Johnston, S.D., Kustritz, M.V., Olson, P.N. in *Canine and Feline Theriogenology*. Ed Saunders, p.396-405, 2001.

Juengel, J.L., Sawyer, H.R., Smith, P.R., Quirke, L.D., Heath, D.A., Lun, S., Wakefield, S.J., McNatty, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Molecular and cellular endocrinology* v.191, p.1-10, 2002.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J. *in* Histologia Básica. Ed. Guanabara Coogan, p.433-440, 2004.
- Kagawa, N., Silber, S., Kuwayama, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reproductive BioMedicine Online*, v.18, 568-577, 2009.
- Khoram, H., Najafpour, A., Razi, M. Follicular Viability and Histological Alterations after Auto-transplantation of Dog Ovaries by Experimentally Inducing Blood Sinus on Stomach. *International Journal of Fertility and Sterility*, v.5, p.27-34, 2011.
- La Marca, A., Papaleo, E., D'Ippolito, G., Grisendi, V., Argento, C., Volpe, A. The ovarian follicular pool and reproductive outcome in women. *Gynecological Endocrinology*, v.28, n.3, p.166-169, 2012.
- Lawler, D.F., Johnston, S.D., Hegstad, R.L., Keltner, D.G., Owens, S.F. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *Journal of reproduction and fertility supplement*, v.47, p.57-61 1993.
- Lee, D. M., Yeoman, R.R., Battaglia, D.E., Stouffer, R.L., Zelinski-Wooten, M.B., Fanton, J.W., Wolf, D.P. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*, v.428, p.137-138, 2004.
- Leon-Quinto, T. Simon, M.A., Cadenas, R., Jones, J., Martinez-Hernandez, F.J., Moreno, J.M., Vargas, A., Martinez, F., Soria, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal reproduction science* v.112, p.347-361, 2009.
- Lima, A.K.F., Silva, A.R., Santos, R.R., Sales, D.M., Evangelista, A.F., Figueiredo, J.R., Silva, L.D.M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, v.66, p.1664-1666, 2006.
- Lin, T., Yen, J., Kuo, T., Gong, K., Hsu, K., Hsu, T. Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnology*, v.8, p.38-50, 2008.
- Lucci, C.M., Kacinskis, M.A., Lopes, L.H.R., Rumpf, R., Bão, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114, 2004.
- Lucci, C.M., Schreier, L.L., Machado, G.M., Amorim, C.A., Bao, S.N., Dobrinsky, J.R. Effects of Storing Pig Ovaries at 4 or 20°C for Different Periods of Time on the Morphology and Viability of Pre-Antral Follicles. *Reproduction in domestic animals*, v.42, p.76-82, 2007.

- Luciano, A.M., Chigioni, S., Lodde, V., Franciosi, F., Luvoni, G.C., Modena, S.C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*, v.59, p.90-95, 2009.
- Luvoni, G.C., Tessaro, I., Apparicio, M., Ruggeri, E., Luciano, A.M., Modena, S.C. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.385-391, 2012.
- Martinez-Madrid, B., Dolmans, M.M., Langendonck, A.V., Defrere, S., Donnez, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. v.82, p.1390-1394, 2004.
- Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology*, v.247, p.C125-142, 1984.
- McGee Jr. & Martin, W.J., H.A. Cryochemistry. *Cryogenics NASA Center*, v.2, p.1-11, 1962.
- McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Tisdall, D.J., O, W.S., Braw-Tal, R. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.49, p.123-135, 1995.
- Medeiros, R.M.T., Paulino, C.A. in *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Ed. Guanabara Koogan, p. 736-749, 2006.
- Meirow, D., Levron, J., Eldar-Geva, T. Pregnancy after Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue in a Patient with Ovarian Failure after Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*, v.353, p.318-321, 2005.
- Mialot, J.P. in *Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos*. Ed. A hora Veterinária, p.131-138, 1998.
- Michael, R. P. Observations Upon the Sexual Behaviour of the Domestic Cat (*Felis catus* L.) under Laboratory Conditions. *Behaviour*, v.18, p.1-24, 1961.
- Michel, C. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. *Laboratory animals*, v.27, p.278-280, 1993.
- Mills, J.N., Valli, V.E., Lumsden, J.H. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, v.20, p.95-101 1979.
- Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, v.19, p.55-81, 1983.

- Moreira, N.Monteiro-Filho, E.L.A., Moraes, W., Swanson, W.F., Graham, L.H., Pasquali, O.L., Gomes, M.L.F., Morais, R.N., Wildt, D.E. Brown, J.L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biology*, v.20, p.103-116, 2001.
- Murakami, M., Otoi, T., Karja, N.W.K., Wongsrikeao, P., Agung, B., Suzuki, T. Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology*, v.48, p.341-348, 2004.
- Nugent, D., Newton, H., Gallivan, L., Gosden, R.G. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.114, p.341-346, 1998.
- Oktay, K., Economos, K., Kan, M., Rucinsky, J., Veeck, L., Rosenwaks, Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Journal of American Medical Association*, v.286, n.12, 2001.
- Oktay, K., Buyuk, E., Veeck, L., Zaninovic, N., Xu, K., Takeuchi, T., Opsahl, M., Rosenwaks, Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, v.363, p.837-840, 2004.
- Parrott, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Journal of reproduction and Fertility*, v.1, p.230-241, 1960.
- Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Human Reproduction Updated*, v.6, p.449-456, 2000.
- Pegg, D.E. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive medicine*, v.20, p.5-13, 2002.
- Picton, H.M., Harris, S.E., Muruvi, W., Chambers, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v.136, p.703-715, 2008.
- Rall, W.F., Reid, D.S., Polge, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*, v.21, p.106-121, 1984.
- Revel, A., Laufer, N., Meir, A.B., Lebovich, M., Mitrani, E. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. *Human Reproduction*, v.26, n.5, p.1097-1103, 2011.
- Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., Costa, S.H.F., Matos, M.H.T., Santos, R.R., Lucci, C.M., Bao, S.N. Ohashi, O.M., Figueiredo, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004.
- Rüsse, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, n.24, p.77-92, 1983.
- Ryung Park, M., Choi, Y.J., Kwon, D.N., Park, C., Bui, H.T., Gurunathan, S., Cho, S.G., Song, H., Seo, H.G., Min, G., Kim, J.H. Intraovarian transplantation of primordial

- follicles fails to rescue chemotherapy injured ovaries. *Scientific Reports*, v.3, p. 1384, 2013.
- Sagsoz, N., Kisa, U., Apan, A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Human Reproduction*, v.17, p.2972-2976, 2002.
- Salle, B., Lornage, J., Franck, M., Isoard, L., Rudigoz, R.C., Guerin, J.F. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Reproductive Biology*, v.70, p.124-128, 1998.
- Sánchez-Serrano, M., Crespo, J., Mirabet, V., Cobo, A.C., Escribá, M.J., Simón, C., Pellicer, A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertility and Sterility*, V.93, n.1, p. 268e11-e13, 2010.
- Santos, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.70-84, 2000.
- Santos, R.R., Celestino, J.J.H., Lopes, C.A.P., Melo, M.A.P., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.9-15, 2008.
- Sartori, R., Dode, M.A.N., Rumpf, R. *in*: Bovinocultura de corte. FEALQ, p 561-584, Piracicaba, 2010.
- Sauvat, F., Bouilly, J., Capito, C., Lefèvre, A., Blachère, T., Borenstein, N., Sarnacki, S., Dandolo, L., Binart, N. Ovarian function is restored after grafting of cryopreserved immature ovary in ewes. *The FASEB Journal*, v.27, 2013.
- Schiochet, F., Beck, C.A.C, Pinto, V., Stedile, R., Contesini, E., Alievi, M.M., Yamazaki, P.H., Jurinitz, D.F., Bernardes, S.B.L. Ovário-histerectomia laparoscópica em uma gata com fetos mumificados – relato de caso. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 102, p.361-364, 2007.
- Schossler, J. E., Rios, M. V., Ilha, M. R., Lima, S. Auto-transplantação de ovário na tela subcutânea em cães. *Acta Cirurgica Brasileira*, v.14, n.1, (1999).
- Shaw, J.M., Oranratnachai, A., Trounson, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Shille, V.M., Lundstrom, K.E., Stabenfeldt, G.H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of reproduction*, v.21, p.953-963, 1979.
- Silber, S.J., DeRosa, M., Pineda, J., Lenahan, K., Grenia, D., Gorman, K., Gosden, R.G. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical

versus microvascular) and cryopreservation. *Human Reproduction*, v.23, n.7, p.1531–1537, 2008.

Silber, S. J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Molecular Human Reproduction*, v.18, p.59-67, 2012.

Song, Y., Cheng, K.M., Robertson, M.C., Silversides, F.G. Production of donor-derived offspring after ovarian transplantation between Muscovy (*Cairinamoschata*) and Pekin (*Anasplatyrhynchos*) ducks. *Poultry Science*, v.91, p.197–200, 2012

Stern, C.J., Gook, D., Hale, L.G., Agresta, F., Oldham, J., Rozen, G., Jobling, T. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Human Reproduction*, Vol.0, No.0 p.1–4, 2013.

Tanpradit, N. & Chatdarong, K. Cat ovarian tissue cryopreservation using a passive cooling device. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, v.41, p.115-116, 2011.

Terazono, T., Inoue, M., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V.L., Taura, Y., Takagi, M., Takuma, T., Otoi T. Assessment of canine ovaries autografted to various body sites. *Theriogenology*, v.77, p.131–138, 2012a.

Terazono, T., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V.L., Takagi, M., Inoue, M., Sato, Y., Taniguchi, M., Otoi, T. Follicle Formation in the Canine Ovary After Autografting to a Peripheral Site. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.e16-e21, 2012b.

Ting, A.Y., Yeoman, R.R., Lawson, M.S., Zelinsk, M.B. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Human Reproduction*, v.26, n.9, p.2461–2472, 2011.

van den Hurk, R. & Zhao, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

Wang, X., Catt, S., Pangestu, M., Temple-Smith, P. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction*, v. 141, p.183–191, 2011.

Wang, F., Wang, L., Dong, Z., Lai, D., Guo, L. Human Amniotic Epithelial Cells Transplantation can Differentiate to Granulosa Cells and Restore Folliculogenesis in a Mouse Model of Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, v.3, 2013.

Weissman, A., Gotlieb, L., Colgan, T., Jurisicova, A., Greenblatt, E.M., Casper, R.F. Preliminary Experience with Subcutaneous Human Ovarian Cortex Transplantation in the NOD-SCID Mouse. *Biology of Reproduction*, v.60, p.1462–1467, 1999.

Wiedemann, C., Hribal, R., Ringleb, J., Bertelsen, M.F., Rasmussen³, K., Andersen, C.Y., Kristensen, S.G., Jewgenow, K. Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.300–304, 2012.

Wiedemann, C., Zahmel, J., Jewgenow, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *Biomed Central Veterinary Research*, v.9, p.37, 2013.

Wildt, D.E., Chan, S.Y., Seager, S.W., Chakraborty, P.K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of Reproduction*, v.25, p.15-28, 1981.

Yeoman, R.R., Wolf, D.P. & Lee, D.M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertility and sterility*, v.83, Suppl.1, p.1248-1254, 2005.

10. Anexos

Anexo 1. Resultados das avaliações por ultrassonografia dos transplantes realizados nos animais

Animal		Fragmento	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	42 dias
1 - Mingau	F1	FE	FR	FR	FR	FR	FR	FR
	F2	EM	EM	FR	FR	FR	FR	FR
	F3	NE	EM	VS	NA	FR	FR	FR
	F4	FE	EM	VS	NA	PF	EM	EM
	F5	NE	NE	NE	NA	NE	NE	NE
	F6	EM	EM	EM	NA	EM	EM	EM
2 - Tutu	F1	FE	HE	VS	NA	PF	PF	PF
	F2	FE/IN	EM	FR	FR	FR	FR	FR
	F3	IN	FR	FR	FR	FR	FR	FR
	F4	IN	EM	VS	NA	FR	FR	FR
	F5	FE	HE	NE	NA	HE	NE	NE
	F6	FE	IN	VS	NA	PF	NE	NE
G1 3 - Suzi	F1	IN	FR	FR	FR	FR	FR	FR
	F2	FE	IN	EM	NA	FR	FR	FR
	F3	IN	EM	EM/PF	NA	PF	EM	EM
	F4	NE	NE	NE	NA	EM/PF	PF	PF
	F5	IN	EM	FR	FR	FR	FR	FR
	F6	NE	NE	NE	NA	EM	EM	EM
4 - Chantili	F1	NE	NE	NA	NE	NA	NA	NA
	F2	NE	NE	NA	NE	FR	FR	FR
	F3	EM	EM	FR	FR	FR	FR	FR
	F4	NE	NE	NA	NE	FR	FR	FR
	F5	EM	PF	NA	EM	NA	NE	NE
	F6	EM/PF	FR	FR	FR	FR	FR	FR
5 - Margarida	F1	NE	NE	NA	NE	NA	NA	NA
	F2	NE	NE	NA	NE	NA	NA	NA
	F3	EM	EM	FR	FR	FR	FR	FR
	F4	NE	EM	NA	HE	NA	NA	NA
	F5	EM/PF	NE	NA	PF	FR	FR	FR
	F6	NE	FR	FR	FR	FR	FR	FR

11. Legenda: NA não avaliado; EM ecogenicidade mista; NE fragmento não encontrado; PF possível folículo; FE fragmento encapsulado; IN processo inflamatório; FR fragmento retirado; HE hipocóico; VS vascularização