



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**CULTIVO *IN VITRO* E EM MEMBRANA CORIOALANTOICA E
AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS
DOMÉSTICAS**

Janice de Miranda Vasconcellos Vilela

Tese de Doutorado

2016



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**CULTIVO *IN VITRO* E EM MEMBRANA CORIOALANTOICA E
AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS
DOMÉSTICAS**

Janice de Miranda Vasconcellos Vilela

Orientadora: Carolina Madeira Lucci

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

TESE DE DOUTORADO

BRASÍLIA - DF

2016

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

Albert Einstein

"Tente deixar a Terra um lugar melhor do que quando você chegou."

Sidney Sheldon



*Aos Olhos de Ra, sagradas felinas
Sekhmet e Bast, que comigo estiveram
Que inspiração e aprendizado trouxeram
Trazendo suas bênçãos divinas.*

*Aos Senhores do Conhecimento
Que abençoaram meus pensamentos
Que me trouxeram eloquência e saber
Para que este trabalho eu pudesse tecer.*

*Àqueles que abençoaram meus caminhos
E por quem eu aqui cheguei.
Para Todos a que com carinho
Este trabalho eu consagrei.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Não se faz um doutorado sozinha.

Por isso, este trabalho não é só meu. Ele é da Ellen, da Liu, da Letícia, da Raísa, da Thaís, da Carol, da Christiani.

Ele é da Renata e da Silvia. É de toda a equipe da Empório dos Bichos. É do Olivier e da Dolores.

Este trabalho também é da Cláudia, da Sabrina, da Nicole, da Pantera, da Bela, da Lua, da Fênix e da Daisy.

Nada disso seria possível sem vocês. Por isto, esta tese também é de vocês.

Serei eternamente grata por todo o auxílio, por toda a compreensão, pelo apoio, pelas lições, pelo aprendizado.

Que tudo que vocês fizeram por mim nestes quatro anos retorne triplicado para suas vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Carol, minha orientadora, por todo apoio, auxílio, aprendizado e orientação essenciais durante esse período.

À minha família, pelo apoio e pelos conselhos, em especial minha mãe, que além de ajudar com várias análises estatísticas, também me aconselhou nos momentos de dúvida e me ajudou mais do que ela pode imaginar; e ao meu pai, cujas lições e reflexões desde que me entendo por gente me ajudaram a chegar onde estou hoje, e pela revisão e crítica à escrita desta tese, que foram extremamente valiosas.

Ao Lucas, meu Chou, que esteve presente mesmo quando estava longe, que me apoia, me ouve e me ajuda o tempo todo.

Às estagiárias mais que essenciais: Raísa e Thaís, cuja ajuda e carinho no cuidado com as nossas gatinhas fez toda a diferença do mundo, principalmente para elas.

À Ellen, que me ajudou na primeira fase do trabalho e no desenvolvimento da segunda fase, por ter feito as imunos e pela amizade que construímos ao longo do tempo.

À profa. Aline Pic-Taylor, pelo auxílio com a incubação dos ovos, por me emprestar o laboratório de vez em quando e por todas as sugestões super bem aproveitadas no meu doutorado.

Agradeço enormemente à Liudimila (Liu), cujo auxílio foi essencial para a última fase do projeto. Mil vezes, obrigada pela disponibilidade e pela amizade. Foi excelente trabalhar com você!

À Christiani e a todo o laboratório de ginecologia da UCL em Bruxelas, pelo auxílio, pelo apoio, pela amizade e pela experiência vivenciada no meu doutorado sanduíche. Agradeço especialmente ao Olivier e à Dolores, técnicos do laboratório, cujo auxílio foi essencial. Agradeço também à Marie-Madeleine Dolmans por ter me recebido em seu laboratório.

Aos amigos de longe e de perto, que fazem sempre toda a diferença na minha vida. Aos meus irmãos do Coven Labirinto das Sombras, a Brandon, Aldrich, John, Agathos e Naelyan, que se fizeram presentes mesmo quando eu estava do outro lado

do oceano e espantaram muito da minha solidão. Às novas amizades feitas, especialmente Fernanda, Marcelo, Costanza, Renan, Guillaume, Mercedes e Michelle, que tornaram os dias nublados da Bélgica um pouco mais agradáveis.

Agradeço às gatinhas que foram resgatadas do CCZ para participar deste experimento. Espero ter mudado um pouquinho do mundo de vocês e espero que vocês estejam muito felizes em seus lares!

A toda a equipe da clínica Empório dos Bichos, especialmente às veterinárias Renata e Silvia, que forneceram os ovários da primeira etapa e fizeram as castrações da segunda etapa do experimento.

Ao Jivago, à Adriana e ao Francisco, que ajudaram com o biotério e com o desenvolvimento de um ambiente melhor para nossas gatinhas.

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

À Asa Alimentos S.A. pela doação dos ovos embrionados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas durante este período. Também agradeço ao programa CAPES-WBI por viabilizar meu doutorado sanduíche.

E finalmente, agradeço aos Deuses que me acompanharam, me guiaram, me inspiraram e colocaram pessoas muito especiais para trabalhar comigo neste projeto. Afinal de contas, não existem coincidências...

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	12
Lista de Tabelas	15
Abreviaturas e Siglas	16
Resumo.....	18
Abstract.....	20
Introdução.....	22
Revisão de Literatura	23
Oogênese e foliculogênese	23
O ciclo estral.....	27
Criopreservação de Ovócitos Inclusos em Folículos Ovarianos.....	28
Cultivo in vitro (CIV)	33
Transplantes.....	37
Cultivo em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM).....	39
Justificativa.....	43
Objetivos	44
Objetivo geral.....	44
Objetivos específicos.....	44
Referências.....	45

Capítulo 1: Cultivo de tecido ovariano fresco de gatas <i>in vitro</i> e em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM)	59
Resumo.....	59
Introdução.....	61
Material e Métodos	63
Coleta de ovários.....	63
Desenho experimental.....	63
Processamento histológico	64
Imunohistoquímica	65
Análises estatísticas	66
Resultados.....	67
Discussão.....	72
Referências.....	77
Capítulo 2: Avaliação da criopreservação de tecido ovariano felino pelo autotransplante heterotópico	82
Resumo.....	82
Introdução.....	84
Material e Métodos	86
Animais.....	86
Procedimento de Ovariohisterectomia.....	86
Congelamento e Descongelamento dos Fragmentos.....	86
Autotransplantes.....	87

Análises Histológicas, Histoquímicas e Imunohistoquímicas.....	88
Análises Estatísticas.....	90
Resultados.....	90
Aspecto Macroscópico dos Fragmentos	90
Aspecto Microscópico dos Fragmentos	91
Discussão.....	97
Referências.....	101
Considerações Finais.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de um ovário com seus principais componentes (Junqueira e Carneiro, 2004).	23
Figura 2: Os estágios de desenvolvimento de folículos ovarianos [adaptado de Telfer e Zelinski (2013)].	25
Figura 3: Estrutura de um folículo secundário (Marília, 2013).	25
Figura 4: Perfil da ciclicidade reprodutiva de gatas com e sem cópula. E ₂ = Estrógeno; P ₄ = Progesterona. Adaptado de Senger (2003).	28
Figura 5: Sistemas de cultivo. A) Sistema bidimensional: 1 - Suporte plástico sem revestimento; 2 – Suporte plástico revestido por células; 3 – Suporte plástico revestido por ágar ou elementos da matriz extracelular; 4 – Suporte plástico revestido por elementos da matriz + células. B) Sistema tridimensional (Gonçalves et al., 2008).	34
Figura 6: Visão da CAM. a) Imagem após abertura do ovo no dia 10 de incubação; b) localização ao redor do embrião (em vermelho) e em contato direto com a casca no dia 12 de incubação; c) seção transversal no dia 10-12 de incubação. 1: epitélio coriônico; 2: mesoderma com vasos em vermelho; 3: epitélio alantoico [Adaptado de Vargas et al. (2007)].	40
Figura 7: Histologia normal da CAM. A) Cinco dias após a abertura do ovo; B) Onze dias após a abertura do ovo – densidade do estroma aumentada [Adaptado de Valdes et al. (2002b)].	40
Figura 8: Desenho experimental. IHQ = Imunohistoquímica.	64
Figura 9: Alterações mais observadas nos folículos ovarianos em CIV e CAM. Setas pretas indicam o núcleo do ovócito; pontas de seta brancas indicam o nucléolo. A) Folículos primordiais morfologicamente normais. B) Folículo primordial com núcleo do ovócito picnótico (ponta de seta preta). C) Folículo primordial com citoplasma do ovócito retraído. D) Folículo primordial com citoplasma do ovócito destacado das células da granulosa. E) Folículo em crescimento descolado do estroma. F) Folículo primordial apresentando vacúolos no ovócito e descolado do estroma. Barra = 10 µm.	70

Figura 10: A, B e C: Aspecto geral do tecido ovariano no dia 0 (controle – A) e dia 5 em CAM (B) e CIV (C). Folículos ovarianos raramente foram encontrados após 5 dias de cultivo em CAM. D, E e F: Proliferação celular marcada com anticorpo Ki67 no dia 0 (controle – D), dia 4 de cultivo em CAM (E) e dia 3 de CIV (F). Células da granulosa proliferativas estão marcadas em marrom. G, H e I: Coloração por tricrômico de Gomori no dia 0 (controle - G); e dia 4 do cultivo em CAM (H) e CIV (I). Núcleos corados em roxo; vasos sanguíneos corados em vermelho; tecido conjuntivo corado em azul. Barra = escala em μm71

Figura 11: Vasos sanguíneos marcados com anti-alfa-actina (setas pretas) permeando o tecido ovariano, próximos a folículos ovarianos (pontas de seta brancas).....72

Figura 12: Curva de congelamento lento.....87

Figura 13: Fragmentos ovarianos autotransplantados. 1) Controle (Dia 0). 2) Controle Crio. 3) Transplantes após congelamento/descongelamento.....88

Figura 14: Imagens representativas do ensaio de TUNEL mostrando o aspecto geral do tecido no Controle Crio (A) e no dia 14 (B) após transplante. Células mortas marcadas em fluorescência vermelha. Setas brancas apontam para folículos ovarianos.....92

Figura 15: Marcação com Ki67 em folículos nos grupos Controle (A) e Controle Crio (B). Barra = 100 μm93

Figura 16: Estruturas foliculares com células da granulosa justapostas e sem ovócito (setas) com células marcadas com Ki67 (marrom) nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) após transplante. Barra = 200 μm94

Figura 17: Folículos antrais encontrados em um animal no dia 28 após transplante. A e B) Coloração HE. C e D) Ensaio de TUNEL mostrando não haver células mortas (não há fluorescência vermelha). E e F) Marcação com Ki67 mostrando células da granulosa proliferativas marcadas em marrom. Barra = 200 μm95

Figura 18: A-G) Coloração com tricrômico de Masson mostrando o aumento da matriz extracelular (fibras colágenas – marcadas em verde) do tecido conjuntivo nos grupos Controle (A), Controle Crio (B) e aos 7 (C), 14 (D), 28 (E), 49 (F) e 63 (G) dias

após o transplante. H) Marcação com Ki67 mostrando a proliferação das células do estroma no dia 28 após o transplante. Barras: escala em μm96

Figura 19: Vascularização do tecido nos dias 7 (A) e 63 (B) após o transplante. Setas brancas apontam para vasos calibrosos observados em coloração HE aos 63 dias de transplante.97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetro de folículos pré-antrais e ovócitos de gatas (Carrijo et al., 2010).	26
Tabela 2: Porcentagem (média \pm desvio padrão) e número de FMN primordiais e em crescimento, em relação ao total, no controle (Dia 0) e durante os 5 dias de cultivo in vitro (CIV) e em CAM.....	68
Tabela 3: Porcentagem (Média \pm desvio padrão) e número de folículos primordiais e em crescimento, considerando apenas FMN, em controle (Dia 0) e durante 5 dias de cultivo in vitro (IVC) e em CAM.....	69
Tabela 4: Número estimado (média \pm DP) de folículos primordiais e em crescimento, em 1 mm ³ de tecido ovariano.....	69
Tabela 5: Número e porcentagem de folículos primordiais e em crescimento encontrados em tecido fresco (controle), após a congelamento/descongelamento (controle crio) e nos dias 7, 14, 28, 49 e 63 dias após o transplante.	92
Tabela 6: Porcentagem de estruturas foliculares com células da granulosa justapostas e sem ovócito (CGJ) em relação aos folículos degenerados encontrados (% CGJ/F. Deg) e ao total de folículos contados (% CGJ/F. Total).....	93

ABREVIATURAS E SIGLAS

- bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (*Basic Fibroblast Growth Factor*)
- BMP-15 – Proteína Morfogenética Óssea 15 (*Bone Morphogenetic Protein 15*)
- BSA – Albumina Bovina Sérica (*Bovine Serum Albumin*)
- CAM – Membrana Corioalantoica de Embriões de Galinha
- CIV – Cultivo *in vitro*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- E₂ – Estrógeno
- eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
- EG - Etilenoglicol
- EGF – Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)
- FGF-2 – Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (*Fibroblast Growth Factor 2*)
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FMN - Folículos Morfologicamente Normais
- FOPA - Folículos Ovarianos Pré-Antrais
- GDF-9 – Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (*Growth and Differentiation Factor-9*)
- HE – Hematoxilina-Eosina
- hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
- IGF-I – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (*Insulin-Like Growth Factor I*)
- IGF-II - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina II (*Insulin-Like Growth Factor II*)
- IHQ - Imunohistoquímica
- ITS - Insulina, Transferrina e Selênio
- LIF – Fator Inibitório de Leucemia (*Leukemia Inhibitory Fator*)
- M-199 – Meio de cultivo *in vitro*
- MEM – Meio Essencial Mínimo (*Minimal Essential Medium*)
- MOIFOPA – Manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais
- P₄ - Progesterona
- PCNA - Antígeno Imunorreativo a Proliferação Celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
- SCID - Severe Combined Immunodeficiency

SFB - Soro Fetal Bovino

TCM-199 – Meio de cultivo *in vitro*

TGF- α – Fator de Crescimento e Transformação α (*Transforming Growth Factor α*)

TGF- β – Fator de Crescimento e Transformação β (*Transforming Growth Factor β*)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade de utilização das técnicas de cultivo *in vitro*, cultivo em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM) e autotransplante heterotópico para avaliação da do tecido ovariano de gatas. Na primeira etapa, foi comparado o cultivo de tecido ovariano fresco de gatas *in vitro* e em CAM para determinar se estes métodos seriam adequados para avaliar a eficácia da criopreservação de tecido ovariano. Para isso, ovários de 8 gatas foram cortados em cubos de 3 mm³, cultivados *in vitro* e em CAM por até 5 dias. A porcentagem de folículos primordiais na população de folículos morfológicamente normais (FMN) foi sempre maior que 80%, com exceção do dia 3 de cultivo em CAM. Não foi observado proliferação celular ao longo do cultivo. Adicionalmente, ambos os métodos mostraram um aumento do tecido conjuntivo a cada dia que o tecido permaneceu em cultivo. Foi observado vascularização durante o cultivo em CAM, porém sem associação com a viabilidade folicular. Nenhum dos sistemas foi capaz de promover crescimento e/ou desenvolvimento folicular. O autotransplante heterotópico já se mostrou eficiente em tecido ovariano fresco de gatas, por isso, na segunda etapa do experimento, este método foi utilizado para avaliar o protocolo de criopreservação de tecido ovariano felino. Quatro gatas foram submetidas a ovariectomia e os ovários foram cortados e criopreservados. Após uma semana, foram autotransplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço e retirados após 7, 14, 28, 49 e 63 dias. A porcentagem de folículos morfológicamente normais primordiais e em crescimento nas amostras de tecido fresco (Grupo Controle) foram de 87,8% e 96,7%, respectivamente, e imediatamente após o descongelamento (Controle Crio) de 73,7% e 100%, respectivamente, e não foram significativamente diferentes entre si. Folículos em crescimento quase não foram vistos após o transplante. Nenhum FMN foi encontrado a partir de 49 dias de transplante. Nos fragmentos de Controle e Controle Crio, a maioria dos folículos (primordiais e em crescimento) apresentavam proliferação das células da granulosa. Dois folículos antrais foram encontrados aos 28 dias em uma das gatas e se mostraram vivos e proliferativos. Houve um aumento das fibras colágenas a partir dos 7 dias de transplante. A vascularização do tecido foi observada após 7 dias de transplante, e

vasos sanguíneos calibrosos foram facilmente observados nos dias 49 e 63 após transplante. Houve uma grande perda folicular após o transplante de tecido ovariano de gatas previamente criopreservado. Em conclusão, o cultivo em CAM não parece promissor para tecido ovariano de felinos, mas o cultivo *in vitro* pode ser otimizado para melhor desenvolvimento dos folículos ovarianos de gatas e para avaliação do tecido após criopreservação. Os transplantes permanecem como a alternativa mais viável para avaliar a criopreservação. No entanto, o presente estudo mostrou que a sobrevivência folicular após criopreservação e transplante foi muito baixa, provavelmente devido à junção das injúrias causadas pela criopreservação com os danos provocados pelo período de isquemia-reperfusão do tecido nos primeiros dias de transplante. Desta forma, as técnicas de transplante e de criopreservação também devem ser otimizadas.

Palavras-chave: Reprodução assistida; felinos; ovário; folículos ovarianos; viabilidade folicular.

ABSTRACT

The aim of this study was to test the viability of *in vitro* culture (IVC), culture in the chorioallantoic membrane of chick embryos (CAM) and heterotopic autotransplantation techniques for evaluation of cat ovarian tissue. In the first stage, we compared the culture of fresh cat ovarian tissue *in vitro* and in CAM to determine if those methods would be suitable to evaluate the efficacy of cryopreservation of ovarian tissue. For this, ovaries from 8 queens were cut in 3 mm³ cubes, and cultured *in vitro* and in CAM for up to 5 days. The percentage of primordial follicles in the population of morphologically normal follicles (MNF) was always higher than 80%, with the exception of day 3 in the CAM. Cellular proliferation was not observed in culture. Additionally, both methods showed an increase in connective tissue during culture. Vascularization was observed during culture in CAM, however, there was no association with follicular viability. None of the systems were capable of promoting follicular growth and/or development. Heterotopic autotransplantation has already been demonstrated to be effective for fresh cat ovarian tissue, thus, in the second stage of this study, this method was used to evaluate ovarian tissue cryopreservation. Four queens were subjected to ovariectomy and the ovaries were cut and cryopreserved. After one week, they were thawed and autografted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck region and removed after 7, 14, 28, 49 and 63 days. The percentage of primordial and growing MNF in fresh tissue samples (Control) were 87.8% and 96.7%, respectively, and immediately after thawing (Cryo Control) were 73.7% and 96.7%, respectively, and they were not significantly different. Growing follicles were hardly seen after grafting. No MNF were found after 49 days of transplantation. In Control and Cryo Control fragments, most of the follicles (primordial and growing) presented granulosa cell proliferation. Two antral follicles were found on day 28 post-transplantation in one of the queens and they were alive and proliferative. There was an increase in connective fibers from day 7 of transplantation on. Vascularization of the tissue was observed after 7 days of grafting and calibrous blood vessels were easily observed in days 49 and 63 post-grafting. There was a great follicular loss after cryopreserved ovarian tissue transplantation. In conclusion, culture in CAM does not seem promising for cat ovarian tissue, but IVC

may be optimized for better cat follicle development and evaluation of the tissue after cryopreservation. Transplantation remains the most viable alternative to evaluate cryopreservation. However, this study showed that follicular survival after cryopreservation and grafting was low, probably due to the combination of injuries caused by cryopreservation with the damages caused by ischemia-reperfusion period in the early days of the tissue transplant. Thus, the techniques of cryopreservation and transplantation must also be optimized.

Keywords: Assisted reproduction; felids; ovary; ovarian follicles; follicular viability.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia reprodutiva tem se desenvolvido amplamente, tanto para espécies de importância econômica quanto para a conservação da biodiversidade animal. A habilidade de usar gametas frescos e criopreservados para tecnologias reprodutivas é particularmente importante por permitir que a linha genética de qualquer animal possa ser utilizada, independentemente de tempo e espaço (Jewgenow e Paris, 2006). Quase todos os felídeos estão presentes na Lista Vermelha da IUCN para espécies ameaçadas de extinção (Iucn, 2014). O gato doméstico é um excelente modelo para estudos reprodutivos visando os felídeos selvagens devido à sua proximidade filogenética (Swanson, 2003).

Os estudos reprodutivos têm investido cada vez mais no desenvolvimento de folículos pré-antrais. Seu tamanho relativamente pequeno e estado indiferenciado dificultam o cultivo, pois requerem períodos extensos de crescimento *in vitro* para adquirirem competência. Por outro lado, estas mesmas características são fatores ideais para a criopreservação dos folículos ovarianos (Santos *et al.*, 2010). Além disso, eles representam 90-95% da população folicular, o que os torna excelentes candidatos ao uso para criopreservação com a finalidade de formar bancos genéticos para a preservação de animais geneticamente melhorados e espécies ameaçadas de extinção (Picton *et al.*, 2008).

A criopreservação de tecido ovariano visando o melhor aproveitamento de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais é uma alternativa promissora e tem sido estudada em diversas espécies (Ambrosini *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010; Jewgenow *et al.*, 2011). No entanto, o desenvolvimento de protocolos de criopreservação precisa do respaldo de testes de viabilidade, para certificar que os gametas permanecem viáveis e poderão ser utilizados no futuro para a produção de embriões. Formas de avaliar tecido ovariano após criopreservação incluem o cultivo *in vitro* (Hasegawa *et al.*, 2006; Isachenko *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2013) e em membrana corioalantoica (CAM) de embriões de galinha (Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013), bem como os transplantes (Donnez e Dolmans, 2014; Jensen *et al.*, 2015). O sucesso dessas técnicas combinadas poderá favorecer os programas de reprodução visando a conservação das espécies ameaçadas de extinção.

REVISÃO DE LITERATURA

OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

Os ovários de mamíferos são responsáveis pela produção de estrógeno e progesterona e pela gametogênese. Sua superfície é coberta por um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, o epitélio germinativo. Abaixo dele, encontra-se a túnica albugínea, uma camada de tecido conjuntivo denso, e abaixo desta localiza-se a camada cortical, onde se encontram os folículos ovarianos, unidades funcionais do ovário, em meio a tecido conjuntivo. Na maioria dos mamíferos, a parte mais interna do ovário é a região medular, que contém tecido conjuntivo frouxo com muitos vasos sanguíneos (Figura 1) (Junqueira e Carneiro, 2004).

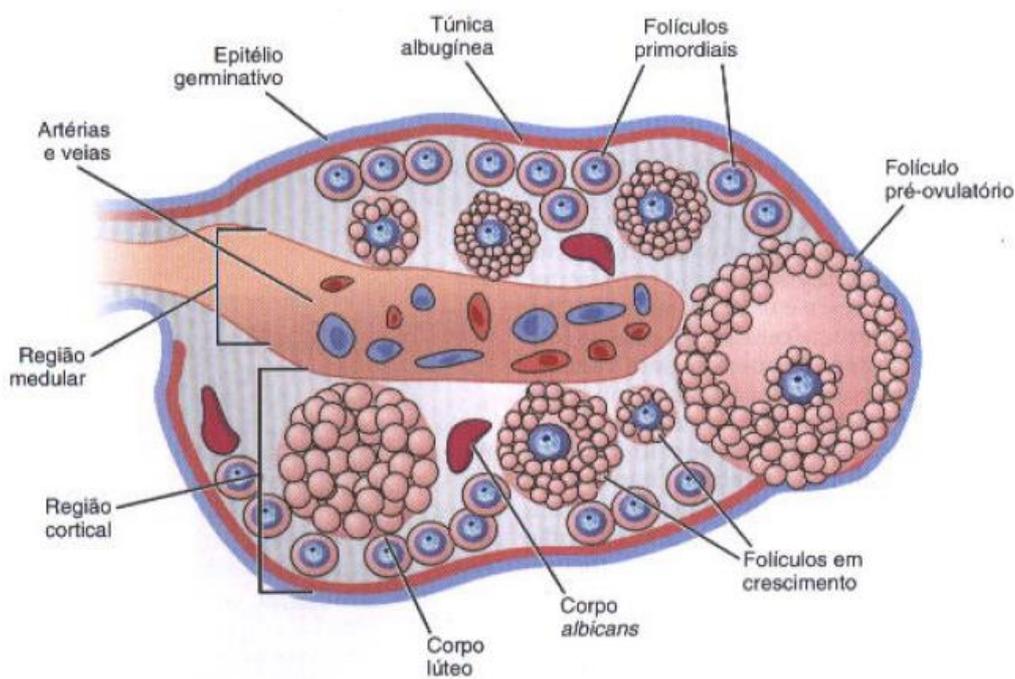


Figura 1: Desenho esquemático de um ovário com seus principais componentes (Junqueira e Carneiro, 2004).

Na maioria dos mamíferos, a oogênese e a formação dos folículos ovarianos ocorrem no período fetal das fêmeas. Na cadela, na gata e na coelha, este processo se inicia na segunda ou terceira semana do desenvolvimento fetal (Bristol-Gould e

Woodruff, 2006). A ovogênese se inicia com a migração de células do saco vitelínico embrionário para a gônada em formação. As células sofrem várias divisões mitóticas e depois iniciam a meiose, transformando-se em ovócitos (Soto-Suazo, 2005). Após as divisões mitóticas, células epiteliais dos cordões sexuais enviam processos citoplasmáticos entre as ovogônias, separando-as por uma camada de células pavimentosas (chamadas de células da pré-granulosa). Uma lâmina basal é depositada na superfície dessas células e isola os folículos primordiais recém-formados do estroma ovariano. Quando a ontogênese do ovário está completa, os folículos são incorporados em uma matriz de fibroblastos, colágeno e elastina, e localizados no córtex ovariano (Aerts e Bols, 2010).

Estes folículos desempenham uma função exócrina, responsável pelo desenvolvimento dos ovócitos, e uma endócrina, a produção de hormônios esteroides (Hafez e Hafez, 2004). Eles colaboram com o desenvolvimento do ovócito que, com sinalização apropriada, será ovulado e, talvez, fertilizado. No ovário, os folículos estão presentes em diversas fases de desenvolvimento, sendo denominados pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Sua população não é renovável e fornece os gametas para toda a vida reprodutiva do animal. Eles estão caracterizados a seguir (Erickson, 1966; Byskov e Lintern-Moore, 1973; Picton, 2001; Bristol-Gould e Woodruff, 2006) e ilustrados na Figura 2:

★ **Folículos primordiais:** são os menores folículos e possuem uma camada de células pré-granulosa, pavimentosas, circundando o ovócito.

★ **Folículos primários:** quando os folículos primordiais sofrem ativação e as células pavimentosas da pré-granulosa passam a ser cuboidais, agora sendo chamadas de células da granulosa, este folículo passa a ser denominado primário.

★ **Folículos secundários:** variam em tamanho por possuírem múltiplas camadas de células da granulosa. Nesses folículos, também é visível uma camada de células da teca externamente à membrana basal. Essas células são responsáveis pela produção dos hormônios andrógenos, que serão convertidos em estrógenos pelas células da granulosa. A zona pelúcida, uma espessa camada de glicoproteínas responsável pela ligação espécie-específica do espermatozoide, também é visível nesses folículos (Figura 3).

★ **Folículos antrais:** eles podem ter diâmetro variado, mas seu tamanho aumenta quando há a formação de um antro cheio de fluido. Os maiores folículos antrais são chamados de pré-ovulatórios; eles possuem camadas de células da granulosa murais (ao redor do folículo) e do *cumulus* (ao redor do ovócito), muitas camadas de células da teca e um grande antro.

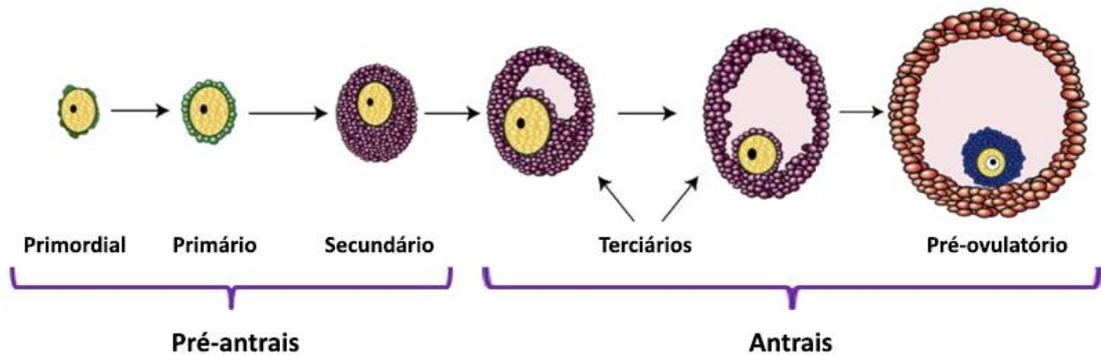


Figura 2: Os estágios de desenvolvimento de folículos ovarianos [adaptado de Telfer e Zelinski (2013)].

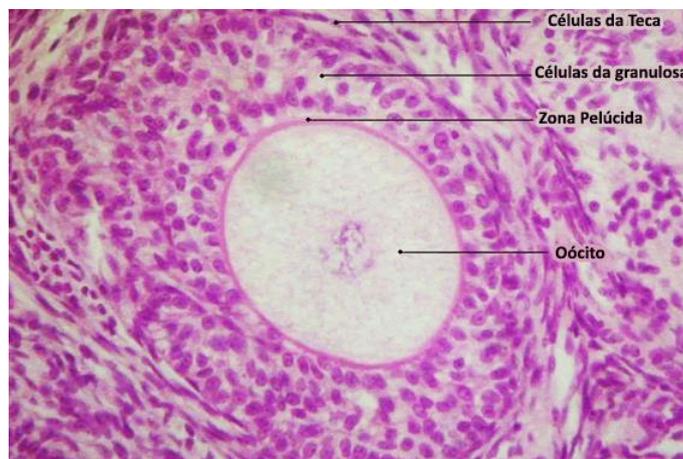


Figura 3: Estrutura de um folículo secundário (Marília, 2013).

Os folículos pré-antrais representam 90 a 95% de toda a população folicular e estão presentes em animais de todas as idades, independentemente da fase do ciclo estral. Deles, apenas 0,1% chega à ovulação e muitos sofrerão atresia .

A Tabela 1 descreve os parâmetros morfométricos de folículos pré-antrais de gatas:

Tabela 1: Diâmetro de folículos pré-antrais e ovócitos de gatas (Carrijo et al., 2010).

Tipo	Folículo (μm)	Ovócito (μm)	Núcleo do ovócito (μm)
Primordial	28,3 \pm 9,1	23,1 \pm 7,2	12,3 \pm 3,7
Primário	41,0 \pm 7,6	30,1 \pm 4,7	15,6 \pm 2,3
Secundário	74,6 \pm 20,3	40,8 \pm 13,4	18,6 \pm 4,1

Os folículos pré-antrais se desenvolvem independentemente de gonadotropinas, ou seja, a fêmea possui em seu ovário folículos primordiais, primários e secundários desde seu nascimento. A partir da maturidade sexual e do amadurecimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), esses folículos passam a ser recrutados para o crescimento e desenvolvimento final. A maioria dos folículos recrutados sofre atresia, e alguns continuam seu crescimento para o estágio pré-ovulatório. Desses, poucos ou, dependendo da espécie, apenas um folículo, serão selecionados, tornando-se dominantes. Este processo é regulado pelo eixo HHG: a partir da liberação do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, a adenohipófise libera o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH), que atuam no processo de recrutamento, seleção e dominância dos folículos ovarianos. O FSH estimula o crescimento e o desenvolvimento dos folículos, enquanto o LH promove, juntamente com o FSH, a maturação dos folículos e posterior ruptura de sua parede para que ocorra a ovulação (Hafez e Hafez, 2004). Os folículos, por sua vez, produzem 17- β -estradiol, que promove alterações no comportamento da fêmea para que ela permita a monta, e prepara o organismo para a ovulação. Mais de 99% dos folículos ovarianos sofre atresia folicular e apenas um pequeno número deles se torna competente e chega à ovulação (Guilbault et al., 1986; Silva, 2003). Portanto, a população total de folículos ovarianos é composta por uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes e um pequeno número de folículos em crescimento (Cahill e Mauléon, 1981).

O CICLO ESTRAL

O ciclo reprodutivo das fêmeas é denominado ciclo estral. Ele pode ser dividido em quatro fases, limitadas por eventos reprodutivos coordenados por hormônios: proestro, estro, metaestro/diestro, com ou sem um período de anestro (Hafez e Hafez, 2004).

A puberdade da gata ocorre entre 4 e 12 meses de idade ou quando atingem de 2,3 a 2,5 kg (Johnston *et al.*, 2001). O proestro na gata dura de 1 a 2 dias e, quando se inicia, ela apresenta comportamentos típicos, friccionando a cabeça e o pescoço contra superfícies e movimentando-se demasiadamente, e ocorre redução da rejeição ao macho. Ronronados, alongamentos e abertura e fechamento das garras são cada vez mais frequentes. O estro nesta espécie dura em média sete dias, e os principais comportamentos desta fase são: agachamento, vocalização, rolamentos e lordose. Ocorre lateralização da cauda para exposição da região perineal e o animal fica altamente receptivo à monta (Michael, 1961; Bristol-Gould e Woodruff, 2006).

A gata é um animal poliéstrico sazonal, com atividade reprodutiva nas estações de dias longos (primavera e verão), e inatividade nas estações de dias curtos (outono e inverno). O estímulo para a liberação de GnRH em animais fotoperiódicos é gerado pela incidência luminosa na retina e a glândula pineal converte as informações recebidas em secreção de melatonina. Quanto menor a incidência de luz, maior a secreção de melatonina. A melatonina é um hormônio antigonadotrópico em felinos, ou seja, a ativação do eixo HHG ocorre nos períodos de maior incidência de luz (Nalbandov, 1976; Hafez e Hafez, 2004). Entretanto, em regiões tropicais, onde não há definição clara das estações do ano, as gatas podem se apresentar poliéstricas contínuas, pois nesses locais não há alteração significativa da duração do dia durante o ano (Michel, 1993).

Ao contrário da maioria dos animais domésticos, a gata é um animal de ovulação induzida pelo coito. Receptores na vagina são estimulados durante a cópula, e o estímulo nervoso resulta na liberação de LH. São necessárias várias cópulas para atingir o pico de LH, mas estímulos visuais ou feromônios também podem induzir a ovulação (Goericke-Pesch, 2010). Caso a gata não ovule, ela entra em um estágio chamado de pós-estro, ou interestro, que dura em média uma semana e é seguido

por novo estro (Figura 4). Porém, caso ela ovule e não ocorra fecundação, o animal entra no estágio de pseudociese, que dura 40 dias (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Caso ocorra fecundação, a gestação dura de 59 a 71 dias. A concentração de progesterona durante os primeiros 14 a 20 dias é similar à da pseudociese e aumenta no decorrer da gestação devido ao contínuo funcionamento do corpo lúteo aliado à síntese de progesterona pela placenta, que começa após 30 dias de gestação. As concentrações plasmáticas de progesterona são basais durante todos os períodos do ciclo. A manutenção da concentração de progesterona elevada por 5 ou 6 dias depois da cópula indica que a ovulação ocorreu (Silva, 2015).

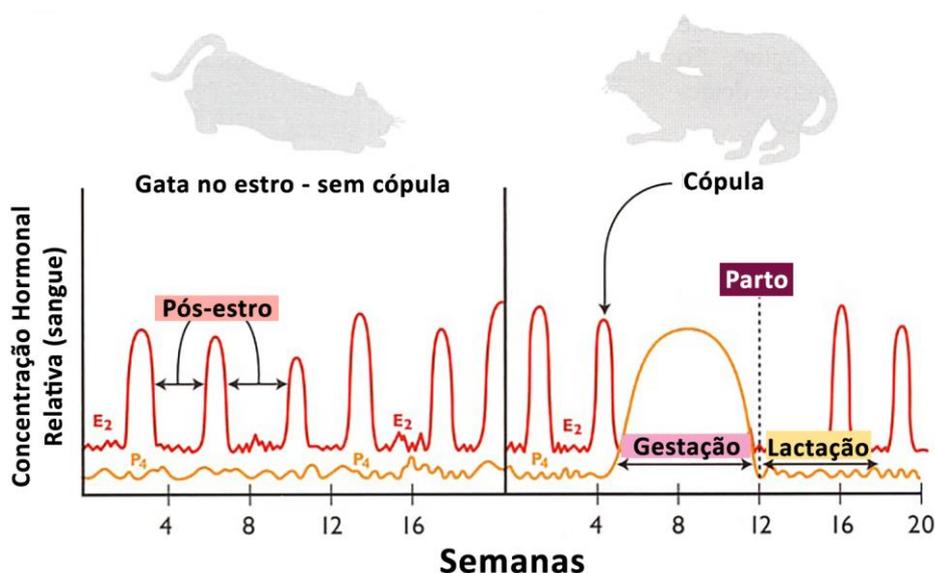


Figura 4: Perfil da ciclicidade reprodutiva de gatas com e sem cópula. E₂ = Estrógeno; P₄ = Progesterona. Adaptado de Senger (2003).

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS

A criopreservação de ovócitos é uma alternativa eficiente para armazenar os ovócitos em excesso e evitar o desenvolvimento de mais embriões do que o necessário para as técnicas de fertilização *in vitro* (FIV). Esta técnica também tem sido amplamente estudada em diversas espécies de animais para a criação de bancos genéticos, visando à preservação de espécies e raças, tanto silvestres quanto de interesse econômico (Santos *et al.*, 2010). Além disso, em humanos, a criopreservação de tecido ovariano é utilizada para manter os ovários de mulheres que passam por

quimioterapia, evitando assim a infertilidade precoce (Porcu *et al.*, 2000). Técnicas para a produção de embriões *in vitro* estão bem desenvolvidas para diversas espécies, principalmente bovinos (Bertolini e Bertolini, 2009; Rodriguez-Martinez, 2012), pequenos ruminantes (Kol, 2004; Amiridis e Fthenakis, 2012) e humanos (Bay *et al.*, 2013; Farhi *et al.*, 2013), mas ainda não há protocolos eficientes para felinos. Por isso, a criopreservação é uma técnica importante para armazenar os gametas destas espécies até que haja protocolos eficientes de reprodução assistida.

A sobrevivência dos ovócitos após a criopreservação pode ser afetada por fatores morfológicos e biofísicos. Entre os fatores morfológicos, são particularmente importantes o estágio de desenvolvimento, a qualidade e o tamanho do ovócito (Fabbri *et al.*, 2000). Quanto aos fatores biofísicos, pode-se citar a relação área de superfície/volume e a formação de gelo intracelular. Quanto maior o ovócito, menor sua sobrevivência após congelamento e descongelamento. A formação de gelo intracelular pode ser evitada pela desidratação adequada da célula, assim é possível reduzir os danos do procedimento de criopreservação (Fabbri *et al.*, 2000).

A criopreservação deve seguir alguns critérios para evitar danos às células. O principal fator de dano é a formação de gelo intracelular, que provoca ruptura da membrana plasmática. O grande desafio para as células durante o processo de congelamento não é sua capacidade de se manter a baixas temperaturas, mas sim o risco de passar por temperaturas intermediárias (-15 a -60 °C), pois é a partir de -15 °C que o gelo começa a se formar no meio exterior. O conteúdo da célula continua descongelado, protegido pela membrana celular. Os eventos físicos seguintes dependem da velocidade de congelamento: se ele é lento o suficiente, a célula perde água para o meio por osmose e concentra os solutos intracelulares o suficiente para evitar supercongelamento e manter o potencial químico da água intracelular em equilíbrio com a água extracelular, e não há formação de cristais de gelo em seu interior (Mazur, 1984). Os riscos deste processo podem ser evitados pela desidratação controlada da célula utilizando-se soluções crioprotetoras, de forma a proteger as células contra desidratação excessiva, danos causados pela redução extrema da temperatura.

Os crioprotetores podem ser divididos em intracelulares (penetrantes) e extracelulares (não-penetrantes). Os intracelulares possuem baixo peso molecular e interagem com os microfilamentos e microtúbulos das células, reduzem o ponto de congelamento da solução e previnem a exposição do ovócito a altas concentrações de eletrólitos intra e extracelulares. Entre eles, estão inclusos o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol, o etilenoglicol (EG) e o glicerol. Já os extracelulares são moléculas grandes que não penetram na membrana plasmática. Desta forma, eles aumentam a concentração de solutos extracelulares, gerando um gradiente osmótico em toda a membrana plasmática, o que leva à saída de água da célula e à desidratação antes do congelamento. Sacarose, trealose, ficoll e soro fetal bovino (SFB) são exemplos de crioprotetores extracelulares (Fabbri *et al.*, 2000; Faustino *et al.*, 2011).

Ovócitos maduros são difíceis de ser criopreservados por sua alta sensibilidade a crioinjúrias. A criopreservação pode afetar propriedades do ovócito como a membrana plasmática, o citoesqueleto, as mitocôndrias e outras organelas relevantes para a sua maturação. Além disso, as células da granulosa e a zona pelúcida têm papel importante no desenvolvimento dos ovócitos, e o estresse provocado pela criopreservação pode causar injúrias que comprometem o folículo como um todo (Ambrosini *et al.*, 2006), podendo afetar a fertilização e o desenvolvimento do embrião (Fabbri *et al.*, 2000). Desta forma, a criopreservação de folículos pré-antrais contendo ovócitos imaturos oferece algumas vantagens sobre ovócitos de folículos antrais para preservar a linhagem feminina dos animais:

- 1) a maior parte dos ovócitos está inclusa em folículos pré-antrais;
- 2) folículos pré-antrais estão presentes no tecido ovariano de animais de qualquer idade e mesmo de animais mortos;
- 3) folículos primordiais são mais resistentes aos danos criogênicos, pois os ovócitos possuem baixo metabolismo e não apresentam fuso mitótico, zona pelúcida e grânulos corticais, além de possuírem baixa concentração de lipídios (Santos *et al.*, 2010).

O primeiro estudo sobre criopreservação de ovócitos foi publicado em 1958, quando foi demonstrada a possibilidade de sobrevivência de ovócitos congelados de camundongos. Em 1977, foi reportado o primeiro estudo com congelamento e FIV de

ovócitos maduros de camundongos que resultou em uma prole viva. Desde então, a criopreservação de ovócitos e tecido ovariano foi relativamente bem sucedida em diversas espécies [revisado por Ambrosini *et al.* (2006); Santos *et al.* (2010)]. No tocante a ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, é possível criopreservar os folículos isoladamente ou *in situ* (no tecido ovariano).

Criopreservar folículos isolados tem como vantagens a ausência de danos por isquemia (que ocorrem durante os primeiros dias de transplante de tecido ovariano), a possibilidade de acompanhar os folículos individualmente e a perfusão facilitada do crioprotetor por ausência de barreiras teciduais, mas suas desvantagens são a perda de folículos durante a manipulação, a incapacidade de restaurar a função ovariana e a falta de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente que garanta sua maturação. Quando criopreservados *in situ*, ou seja, inclusos no tecido ovariano, há maior facilidade de manipulação, facilitando a restauração da função do órgão quando seguido de transplante ou CIV, mas os diferentes tipos celulares no tecido dificultam a preservação do ovário (Faustino *et al.*, 2011).

Duas técnicas podem ser utilizadas para a criopreservação de folículos isolados e tecido ovariano: a vitrificação e o congelamento lento.

A vitrificação é um processo no qual o líquido se torna sólido sem a formação de cristais de gelo; a água fica em um estado chamado vítreo, em que se solidifica, mas não se expande. A taxa de resfriamento, a viscosidade e o volume do meio são fatores interferentes na técnica. São utilizados crioprotetores em alta concentração, de 4 a 6 mol/L, o que aumenta sua toxicidade. Para evitar a formação de cristais de gelo, uma taxa extremamente rápida de resfriamento é utilizada: - 20.000 a 40.000 °C por minuto (Jain e Paulson, 2006). A vitrificação já se mostrou eficiente em folículos isolados de cabras (Santos, 2007; Santos, Tharasanit, *et al.*, 2007; Santos, Van Den Hurk, *et al.*, 2007) e marsupiais (Czarny *et al.*, 2009) e também em tecido ovariano de porcas (Gandolfi *et al.*, 2006), vacas (Kagawa *et al.*, 2009), ovelhas (Santos, Van Den Hurk, *et al.*, 2007), cadelas (Ishijima *et al.*, 2006) e humanos (Amorim *et al.*, 2012; Sheikhi *et al.*, 2013).

Já o congelamento lento se baseia em baixas concentrações de crioprotetores e redução lenta e controlada da temperatura. Ao alcançar -6°C, é induzida a

cristalização do meio crioprotetor. Após este processo, chamado *seeding*, a temperatura gradualmente decresce até alcançar -32°C , e então o material é mergulhado em nitrogênio líquido e armazenado (Jain e Paulson, 2006). Este processo tem as vantagens de utilizar meios menos tóxicos às células e reduzir o choque osmótico, porém não previne a formação de cristais de gelo. O congelamento lento, tanto de folículos isolados quanto de tecido ovariano, já se mostrou eficiente em diversas espécies, entre elas gatas (Jewgenow *et al.*, 1998; Bosch *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2006; Carrijo-Jr, 2009; Leonel *et al.*, 2013), cabras (Rodrigues *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009), vacas (Lucci *et al.*, 2004), ovelhas (Amorim, Rodrigues, *et al.*, 2003; Amorim, Rondina, *et al.*, 2003) e humanos (Oktem *et al.*, 2011).

Em gatas, Lima *et al.* (2006) compararam o uso de 1,5M de etilenoglicol (EG) ou glicerol no congelamento lento de ovário de gatas domésticas e concluíram que o EG promoveu melhor preservação da morfologia dos folículos após o descongelamento. Os autores obtiveram 58% de folículos morfologicamente normais utilizando EG. Posteriormente, Carrijo Jr. (2009) realizou o congelamento lento de tecido ovariano felino utilizando 1,5M de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4% de sacarose em PBS e obteve uma taxa de ~55% de folículos morfologicamente normais. Outro trabalho, realizado em nosso laboratório, comparou os crioprotetores EG e DMSO a 1,5M ou a combinação de ambos (0,75M cada) em M-199 no congelamento lento e obteve uma taxa de ~80% de folículos morfologicamente normais independente do tratamento, mas a ultraestrutura dos folículos criopreservados com DMSO se revelou mais semelhante ao controle. As mitocôndrias estavam com eletrondensidade normal e bem distribuídas; foi possível observar a zona pelúcida e ovócito aderido às células da granulosa, enquanto no congelamento com EG ou EG+DMSO observou-se o descolamento do ovócito das células da granulosa, granulação do citoplasma e áreas vazias na região perinuclear (Leonel, 2013).

Porém, apesar de os folículos se apresentarem morfologicamente normais, isso não significa que eles estejam viáveis. Alguns danos causados pela formação dos cristais de gelo não são visíveis imediatamente após o descongelamento. As células precisam entrar em atividade para que alguns danos sejam expressos. Formas de avaliar tecido ovariano após criopreservação incluem o cultivo *in vitro* (Hasegawa *et*

al., 2006; Isachenko *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2013) e em membrana corioalantoica (CAM) de embriões de galinha (Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013) bem como os transplantes (Donnez e Dolmans, 2014; Jensen *et al.*, 2015). Essas técnicas podem ser utilizadas para avaliar o folículo a curto ou longo prazo, permitindo a expressão dos danos causados pela criopreservação.

CULTIVO IN VITRO (CIV)

Além do desenvolvimento folicular, o CIV é utilizado para elucidar os mecanismos que regem a ativação folicular e o crescimento de folículos primários e secundários. O meio de cultivo deve conter uma fonte proteica, hormônios, fatores de crescimento, uma substância antibacteriana ou antifúngica e uma substância antioxidante (Ribeiro, 2010; Apparício, 2011). Os meios mais comumente usados são o Minimum Essential Medium (MEM), o Meio 199 (TCM-199), o Waymouth Medium e o McCoy's 5a Medium. Como suplementos, geralmente são usados soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), gonadotropinas, ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), IGF-1 e IGF-2 (Insulin-like Growth Factor 1 e 2), ativina e o 8-bromo cAMP ou a guanosina monofosfato como inibidores de apoptose (Picton *et al.*, 2008; Aerts e Bols, 2010). Independentemente da composição do meio, a osmolaridade deve ficar entre 280 e 310 mOsm/L e o pH deve ficar entre 7,2 e 7,4 para o sucesso do cultivo (Gonçalves *et al.*, 2008). Além de todos esses fatores, deve-se considerar também o tempo de incubação dos ovócitos no meio.

Os sistemas de cultivo também podem ter diferentes formas de contato do folículo com o substrato, podendo ser classificados como bi ou tridimensionais (Figura 5). No sistema bidimensional, o folículo se encontra sobre o substrato, que pode ser a própria placa de cultivo, recoberta ou não por ágar, por componentes da matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina ou Matrigel) ou por células somáticas (células da granulosa, fibroblastos e outras células do estroma ovariano). No sistema tridimensional, o folículo se encontra completamente circundado pelo substrato. Os substratos mais comuns neste tipo de cultivo são o colágeno tipo I e o ágar. O sistema de cultivo pode afetar a forma da célula e, por sua vez, sua função (Gonçalves *et al.*, 2008).

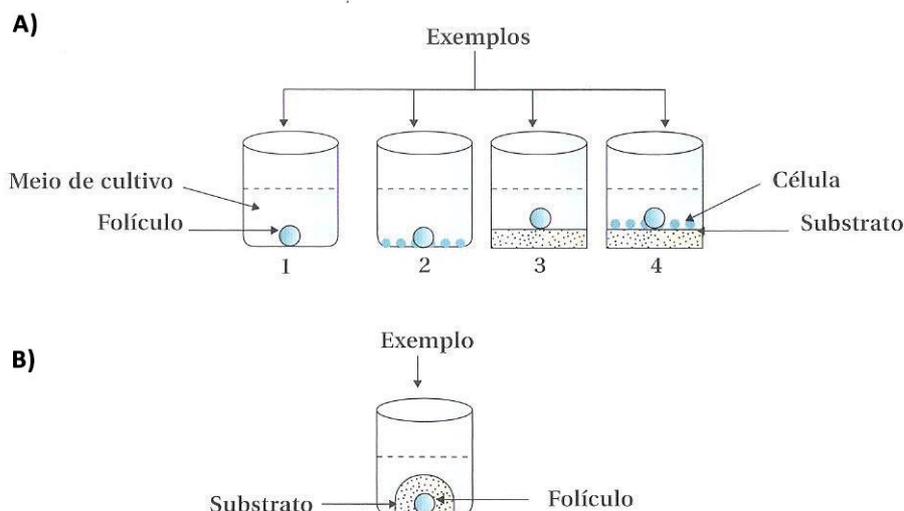


Figura 5: Sistemas de cultivo. A) Sistema bidimensional: 1 - Suporte plástico sem revestimento; 2 – Suporte plástico revestido por células; 3 – Suporte plástico revestido por ágar ou elementos da matriz extracelular; 4 – Suporte plástico revestido por elementos da matriz + células. B) Sistema tridimensional (Gonçalves *et al.*, 2008).

Diversos estudos em roedores têm mostrado eficiência do cultivo *in vitro*, chegando ao nascimento de filhotes (Eppig e O'brien, 1996; O'brien *et al.*, 2003), mas há dificuldade em replicar a técnica em outros animais e humanos. Vários hormônios e fatores de crescimento vêm sendo utilizados com o objetivo de desenvolver os folículos ovarianos *in vitro*. Atualmente, foi verificado que o FSH exerce um efeito anti-apoptótico e suporta o crescimento folicular *in vitro* de folículos isolados de camundongos (Calongos *et al.*, 2008; Nottola *et al.*, 2011), caprinos (Matos *et al.*, 2011; Saraiva *et al.*, 2011; Magalhaes-Padilha *et al.*, 2012), búfalos (Sharma, T. G. *et al.*, 2009) e bovinos (Gutierrez *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2002). Em cadelas, foi observado que o cultivo por 18 dias com concentrações crescentes de FSH manteve a sobrevivência de folículos isolados e aumentou a taxa de crescimento folicular e a formação de antro (Serafim *et al.*, 2010). Em gatas, 100 ng/ml de FSH, 40 ng/ml de hidrocortisona e 1% de insulina, transferrina e selênio (ITS) aumentaram o diâmetro de folículos secundários isolados após uma semana de cultivo (Jewgenow e Pitra, 1993).

Fatores de crescimento também têm sido utilizados em CIV de folículos pré-antrais em tecido ovariano de diversas espécies. O IGF-1 (Fator de Crescimento semelhante à Insulina) se mostrou eficiente para promover a sobrevivência e o crescimento de folículos pré-antrais em bovinos (Gutierrez *et al.*, 2000; Itoh *et al.*, 2002), camundongos (Demeestere *et al.*, 2004) e porcas (Mao *et al.*, 2004). Em gatas, Jewgenow (1996) cultivou folículos pré-antrais pequenos por 5 dias e observou que o bFGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico) induziu a proliferação das células da granulosa, enquanto o IGF-1, modulado pelo EGF (Fator de Crescimento Epidermal), estaria envolvido na ativação dos ovócitos. Esta função do EGF também foi verificada em bovinos por Wandji *et al.* (1996), que também verificaram que o bFGF antagoniza a função do FSH nessa espécie. Outros fatores de crescimento foram utilizados em diversas espécies, como o IGF-2 (Itoh *et al.*, 2002; Hemamalini *et al.*, 2003; Rajarajan *et al.*, 2006), EGF (Fator de Crescimento Epidermal) (Gutierrez *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2002; Hemamalini *et al.*, 2003), TGF- α (Fator de Crescimento e Transformação) (Derrar *et al.*, 2000; Rajarajan *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2010), TGF- β (Fator de Crescimento e Transformação beta) (Wandji *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2010), ativina A (Choi *et al.*, 2008; Telfer *et al.*, 2008; Wongbandue *et al.*, 2013a), GDF-9 (Fator de Crescimento e Diferenciação-9) (Hreinsson *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011), BMP-15 (Proteína Morfogenética Óssea-15) (Celestino *et al.*, 2011), bFGF (Wandji *et al.*, 1996; Zhou e Zhang, 2005; Sharma, G. T. *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010) e FGF-2 (Fator de Crescimento de Fibroblastos) (Matos *et al.*, 2011). Estudos recentes têm sido realizados utilizando meios de cultivo compostos por diversos fatores combinados, como BSA (albumina bovina sérica), ITS, FSH, IGF-I e ativina A em CIV de folículos ovarianos de chitas e gatas (Tanpradit *et al.*, 2013; Wongbandue *et al.*, 2013b).

O CIV também pode ser usado como forma de avaliar a sobrevivência folicular após a criopreservação. Em macacas, foi observado que folículos secundários cultivados por 48 horas após a criopreservação do tecido ovariano mantém sua viabilidade e capacidade de produção hormonal (Ting *et al.*, 2011). Em caprinos, o cultivo de tecido ovariano por 24 horas após vitrificação em superfície sólida

utilizando uma solução de sacarose a 0,1M e 10% SFB demonstrou a preservação da morfologia de 72% dos folículos pré-antrais (Carvalho *et al.*, 2011).

Em camundongos, cultivo e maturação *in vitro* de folículos isolados após vitrificação foram bem sucedidos utilizando IGF-1 e EGF (Lin *et al.*, 2008). Em outro estudo, o fator inibitório de leucemia (LIF) aumentou o crescimento de folículos pré-antrais frescos e vitrificados de camundongos (Haidari *et al.*, 2008). Alguns estudos demonstraram o nascimento de filhotes a partir de folículos criopreservados de camundongos (Liu *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2006).

Poucos estudos realizaram o cultivo *in vitro* de tecido ovariano felino. Jewgenow *et al.* Jewgenow *et al.* (1998) estudaram a eficiência de DMSO, glicerol, propanodiol e etilenoglicol no congelamento de folículos pré-antrais isolados de gatas e verificaram a viabilidade folicular por meio de Azul de Trypan e Hoechst 33258. O cultivo foi realizado por 18 horas e por 7 dias e pelo menos 150 folículos saudáveis puderam ser recuperados após criopreservação e cultivo *in vitro* por uma semana. Em outro trabalho, Jewgenow & Göritz (1995) verificaram que a criopreservação reduziu a viabilidade dos folículos ovarianos de gatas em 60%. Após um longo período sem publicações nesta linha de pesquisa, novos estudos estão emergindo, mas não há consenso sobre o melhor método para cultivo de folículos pré-antrais felinos. Um estudo recente reportou que 85% dos folículos pré-antrais incluídos em tecido ovariano de gatas domésticas, leopardos chineses (*Panthera pardus japonensis*) e leões africanos (*Panthera leo*) estavam degenerados após 14 dias em cultivo (Wiedemann *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços alcançados nas técnicas de CIV, ainda há muitos obstáculos para que o folículo imaturo alcance a competência necessária para a produção de embriões e de proles saudáveis. Esta não é uma tarefa fácil, considerando os sistemas complexos que regulam o desenvolvimento do ovócito. Ainda é um desafio avaliar a capacidade que os atuais sistemas de cultivo possuem para suportar a funcionalidade dos folículos criopreservados (Telfer e Zelinski, 2013). Além disso, por ser um sistema complexo, é necessário o desenvolvimento de protocolos espécie-específicos para que o CIV não subavale os métodos de criopreservação.

TRANSPLANTES

A avaliação *in vivo* é outro método para determinar a função do tecido ovariano criopreservado (Gunasena, Villines, *et al.*, 1997). Os transplantes ovarianos são classificados de acordo com o animal receptor como auto (mesmo indivíduo), iso (animal geneticamente idêntico), alo (outro indivíduo da mesma espécie) ou xenotransplante (de outra espécie) (Andrade *et al.*, 2004). Esta técnica é dificultada por barreiras imunológicas quando enxertos ovarianos são transplantados de uma espécie para outra; por isso, o autotransplante e o xenotransplante em camundongos SCID têm sido bastante utilizados (Paris *et al.*, 2004). Além disso, O tecido ovariano pode ser transplantado de volta à região de origem (ortotópico) ou em outros locais (heterotópico) (Demeestere *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2011). A escolha do local de transplante é um fator essencial para a futura viabilidade e competência do ovócito.

Sabe-se também que a maior perda de folículos acontece durante a revascularização e a reperfusão do tecido transplantado (Smitz, 2004), sendo o tempo de revascularização o maior fator limitante para a sobrevivência de folículos primordiais em enxertos transplantados. Este período de isquemia-reperfusão depende de diversos fatores, como tamanho e local do transplante e presença de fatores angiogênicos [revisado por Macedo *et al.* (2011)].

Youm *et al.* (2014) compararam o autotransplante de tecido ovariano em camundongos em quatro locais diferentes – músculo das costas, tecido adiposo da coxa, cápsula renal e subcutâneo – e verificaram que a cápsula renal é o melhor sítio de transplante em modelos murinos, enquanto o tecido subcutâneo não foi favorável ao desenvolvimento folicular. Em humanos, o transplante ortotópico já resultou em vários nascimentos, enquanto o transplante heterotópico, apesar de resultar em restauração da função endócrina, pode não promover um ambiente ideal para o desenvolvimento folicular (Donnez e Dolmans, 2014). Em gatas, o autotransplante para o subcutâneo da parede abdominal foi pouco eficaz, pois grande parte dos fragmentos não foi recuperada, provavelmente pela reabsorção ou deposição de gordura no local de transplante (Crestana *et al.* 2006). Em nosso laboratório, o autotransplante de tecido ovariano felino fresco para a região subcutânea dorsal do pescoço se mostrou eficaz, com 100% de recuperação dos fragmentos e mais de 90%

de folículos morfológicamente normais (FMN) em quase todos os fragmentos até 63 dias de transplante (Leonel, 2013).

Kagawa *et al.* (2009) utilizaram o autotransplante como forma de avaliar a eficiência da vitrificação em ovários de bovinos e verificaram a restauração da função ovariana. Em ovelhas, foi realizado autotransplante heterotópico ou ortotópico após congelamento lento; além de alguns animais apresentarem cio, ovócitos foram recuperados para FIV, o que resultou na produção *in vitro* de embriões (Aubard *et al.*, 1999). Em cabras, fragmentos de ovário medindo 1 mm³ foram autotransplantados após criopreservação para a curvatura menor do corno uterino esquerdo de fêmeas castradas. Os fragmentos desenvolveram folículos pré-ovulatórios e houve comportamento de estro e aumento do estrogênio sanguíneo (Santos *et al.*, 2009).

Em coelhas, ovários inteiros foram autotransplantados após congelamento lento e, após uma semana, ocorreu restauração da função ovariana (Chen *et al.*, 2000). Em outro estudo, após criopreservação e autotransplante de ovários de coelhas, os ovócitos foram fertilizados e os embriões chegaram até o estágio de blastocisto (Chao *et al.*, 2008). Também foi relatado nascimento de filhotes vivos após fertilização *in vitro* de ovócitos coletados de autotransplante heterotópico de tecido ovariano fresco em camundongos (Gunasena, Lakey, *et al.*, 1997), ovinos (Gosden *et al.*, 1994) e macaco Rhesus (Lee *et al.*, 2004) (Lee *et al.*, 2004).

Em humanos, há estudos que mostram desenvolvimento de corpos lúteos e folículos pré-ovulatórios (Sanchez *et al.*, 2007), e foram reportados mais de 60 nascimentos após transplante ortotópico de tecido ovariano até o presente momento (Lotz *et al.*, 2016). Amorim *et al.* (2012) fizeram transplante de tecido ovariano humano em camundongos SCID como forma de avaliar a criopreservação e observaram que a vitrificação preservou a morfologia e a sobrevivência folicular, além de sua habilidade de retomar a foliculogênese, após uma semana de transplante. Um estudo mais recente mostrou a viabilidade do tecido ovariano humano 5 anos após criopreservação por meio de autotransplante. O tecido transplantado restabeleceu o ciclo menstrual em cinco meses e aumentou os níveis de 17- β -estradiol no sangue (Isachenko *et al.*, 2013).

A vitrificação de tecido ovariano foi testada em cadelas e a funcionalidade dos ovários foi verificada por meio de transplante em camundongos SCID. Após quatro semanas, o tecido transplantado estava fortemente aderido aos ovários dos camundongos. Por meio de reação de PCNA, observou-se a multiplicação das células da granulosa (Ishijima *et al.*, 2006).

Até o presente momento, há apenas um estudo com transplante de tecido ovariano felino após criopreservação, no qual os autores realizaram xenotransplante para camundongos NOD SCID após criopreservação e detectaram folículos antrais após 67 dias. Os fragmentos estavam bem vascularizados e a marcação por PCNA verificou proliferação das células foliculares (Bosch *et al.*, 2004).

Apesar dos avanços obtidos com a resposta tecidual nos transplantes ovarianos, muitos fatores que colaboram com o desenvolvimento folicular ainda precisam ser elucidados (Macedo *et al.*, 2011). A taxa de sobrevivência folicular após o transplante ainda é muito baixa e precisa de melhorias (Grynberg *et al.*, 2012). Além disso, o transplante apresenta algumas desvantagens, como: 1) o uso de procedimentos invasivos em animais; 2) a necessidade de mão-de-obra treinada para microcirurgias; 3) o tempo para observação dos resultados; 4) o alto custo; e 5) as dificuldades para controlar as condições experimentais (Ribatti *et al.*, 2000).

CULTIVO EM MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÕES DE GALINHA (CAM)

O cultivo em CAM é um procedimento intermediário entre o cultivo *in vitro* e os transplantes. Ele é vantajoso por ter baixos custos e ser de simples execução, permitindo avaliação em larga escala. Além disso, a matriz extracelular da CAM é similar ao peritônio, um dos locais de escolha para transplante ortotópico de fragmentos ovarianos em animais e humanos.

A membrana corioalantoica de embriões de galinha (Figura 6) é uma membrana extraembrionária mediadora da troca de gases e nutrientes até o nascimento do animal. Sua principal função é ser um órgão respiratório para o embrião, mas ela também tem papel no armazenamento de excretas, transporte de eletrólitos (sódio e cloreto) do saco alantoico e mobilização de cálcio da casca para iniciar a mineralização dos ossos (Ribatti, 2010b). Ela consiste em ectoderma

(interface com o ar e a casca), estroma (tecido conjuntivo frouxo) e endoderma (interface com alantoide) e tem espessura de aproximadamente 200 μm (Figura 7).

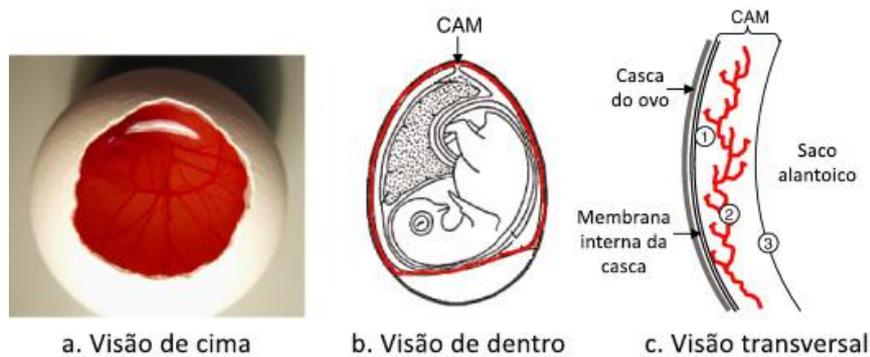


Figura 6: Visão da CAM. a) Imagem após abertura do ovo no dia 10 de incubação; b) localização ao redor do embrião (em vermelho) e em contato direto com a casca no dia 12 de incubação; c) seção transversal no dia 10-12 de incubação. 1: epitélio coriônico; 2: mesoderma com vasos em vermelho; 3: epitélio alantoico [Adaptado de Vargas et al. (2007)].

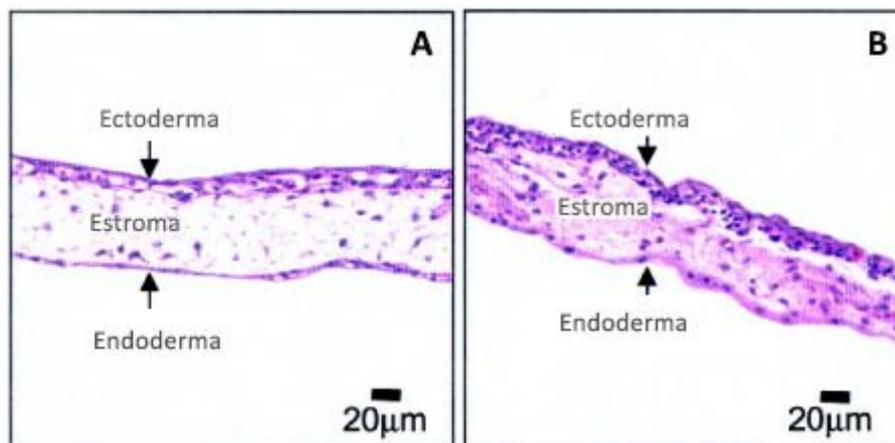


Figura 7: Histologia normal da CAM. A) Cinco dias após a abertura do ovo; B) Onze dias após a abertura do ovo – densidade do estroma aumentada [Adaptado de Valdes et al. (2002b)].

O tecido transplantado em CAM é rapidamente vascularizado e a falta de um sistema imune antes do 17º dia de incubação previne a rejeição do tecido (Ribatti et al., 1996; Ribatti, 2010b). Esse método é amplamente utilizado para estudos de angiogênese e desenvolvimento de tumores (Ribatti et al., 1996; Deryugina e Quigley,

2008; Ribatti, 2010a; Lokman *et al.*, 2012), regeneração muscular (Nakada *et al.*, 1998) e respostas a biomateriais (Valdes *et al.*, 2002a).

O cultivo de tecido ovariano em CAM foi primeiramente reportado por Cushman *et al.* (2002), que questionaram quais os fatores necessários para sustentar o crescimento *in vitro* após a ativação dos folículos. Para responder a esta pergunta, eles cultivaram fragmentos de tecido ovariano bovino por até 10 dias em CAM e compararam com o cultivo *in vitro*. Eles verificaram que não houve ativação dos folículos cultivados em CAM, mas ocorreu vascularização dos fragmentos, enquanto o CIV promoveu a ativação dos folículos primordiais e o aumento do diâmetro dos folículos. No mesmo estudo, foi feito um *crossover* de fragmentos *in vitro* e *in ovo*, no qual foi observado que os folículos mantêm sua capacidade de ativação quando cultivados em CAM. Posteriormente, um estudo realizado por Gigli *et al.* (2005) com camundongos mostrou que o hormônio antimülleriano produzido pelas gônadas dos embriões de galinha é o responsável por inibir a ativação dos folículos cultivados em CAM.

Em humanos, Martinez-Madrid *et al.* (2009) cultivaram fragmentos ovarianos de mulheres em CAM traumatizada por até 5 dias e verificaram proliferação das células da granulosa pela marcação com o anticorpo anti-Ki67. Em outro estudo, Isachenko *et al.* (2012) compararam o cultivo *in vitro* e em CAM de fragmentos ovarianos criopreservados com e sem medula. Utilizando imunohistoquímica, com marcação anti-fator de Von-Willebrand (fator VIII) e anti-desmina, eles observaram a neovascularização dos fragmentos com medula cultivados *in ovo*, o que favoreceu o cultivo dos folículos neste sistema. O mesmo grupo verificou a viabilidade de tecido ovariano após criopreservação por 5 anos utilizando o cultivo em CAM por 5 dias e o autotransplante. Neste estudo, foi observado que 88% dos folículos primordiais estavam degenerados após o cultivo em CAM, mas houve restauração da função ovariana do tecido autotransplantado (Isachenko *et al.*, 2013).

Apesar de terem sido publicados poucos estudos, o cultivo de tecido ovariano em CAM já se mostrou uma alternativa para a avaliação dos procedimentos de criopreservação de tecido ovariano. Além de ser um procedimento menos invasivo que os xenotransplantes, essa técnica permite obter informações valiosas a respeito

do tempo e da distribuição espacial de danos isquêmicos e do estabelecimento da neovascularização (Martinez-Madrid *et al.*, 2009).

JUSTIFICATIVA

A extinção animal tem ocorrido em uma taxa muito mais alta que a especiação, principalmente devido a impactos humanos (caça furtiva, destruição de habitat) e doenças (Cites, 2014). A conservação animal tem como objetivo o entendimento e a sustentação da biodiversidade, pois o desaparecimento de uma espécie pode comprometer o funcionamento de todo o ecossistema (Comizzoli *et al.*, 2009). Com exceção do gato doméstico, todos os outros felídeos estão presentes na Lista Vermelha da IUCN para espécies ameaçadas de extinção (Iucn, 2014). O gato doméstico é um excelente modelo para estudos reprodutivos visando os felídeos selvagens devido à sua proximidade filogenética (Swanson, 2003).

Pouco se sabe sobre o comportamento folicular em CIV de tecido ovariano de gatas e não há relatos sobre seu cultivo em CAM. Os três sistemas citados (CAM, CIV e transplante) possuem diferentes vantagens e desvantagens: o CIV suporta a ativação de folículos primordiais, mas neste sistema não ocorre vascularização do tecido, o que pode ser observado no cultivo em CAM. Já o autotransplante heterotópico é o meio mais fisiológico em que os fragmentos podem se desenvolver, ou seja, o próprio organismo do animal supre as necessidades fisiológicas do tecido ovariano. Desta forma, esses sistemas podem prover informações importantes sobre o desenvolvimento folicular de gatas, o que é essencial para avaliar também a eficiência dos protocolos de criopreservação para essas espécies.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Testar as técnicas de cultivo *in vitro*, cultivo em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM) e autotransplante heterotópico para avaliação de tecido ovariano de gatas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ★ Realizar o cultivo de tecido ovariano fresco de gatas e *in vitro* e em CAM para determinar se podem ser utilizadas para avaliar a criopreservação;
- ★ Verificar a eficiência da criopreservação de tecido ovariano de gatas por meio do autotransplante heterotópico.

REFERÊNCIAS

AERTS, J. M.; BOLS, P. E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reprod Domest Anim**, v. 45, n. 1, p. 171-9, Feb 2010. ISSN 1439-0531 (Electronic) 0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19210660> >.

ALMEIDA, A. P. et al. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. **Small Ruminant Research**, v. 100, n. 2-3, p. 169-176, 2011. ISSN 09214488.

AMBROSINI, G. et al. Oocytes cryopreservation: state of art. **Reprod Toxicol**, v. 22, n. 2, p. 250-62, Aug 2006. ISSN 0890-6238 (Print) 0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787736> >.

AMIRIDIS, G. S.; FTHENAKIS, G. C. Special issue: Reproductive Health Management of Sheep and Goats. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 3-4, p. 125-212, 2// 2012. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432012000358> >.

AMORIM, C. A. et al. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 5, p. 1291-1298.e2, 11// 2012. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028212018456> >.

AMORIM, C. A. et al. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, v. 79, Supplement 1, n. 0, p. 682-686, 2003. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028202048203> >.

AMORIM, C. A. et al. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 735-742, 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0300089X> >.

ANDRADE, E. R. et al. Cultivo in vivo de folículos pré-antrais - Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-72, 2004.

APPARÍCIO, M. M., G.Q.; MOTHEO, T.F.; PADILHA, L.; ALVES, A.E.; PIRES-BUTLER, E.A.; VICENTE, W.R.R. . Maturação in vitro de oócitos caninos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 16-25, 2011.

AUBARD, Y. et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. **Hum Reprod**, v. 14, n. 8, p. 2149-54, Aug 1999. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438442> >.

BAY, B.; MORTENSEN, E. L.; KESMODEL, U. S. Assisted reproduction and child neurodevelopmental outcomes: a systematic review. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 3, p.

844-853, 9// 2013. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213006444> >.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning: from artificial insemination to cloning. **Rev. Med. Vet. Zoot.**, v. 56, p. 184-194, 2009.

BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 581-94, Jan 15 2004. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662154> >.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5-13, Jul 1 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://000238627100003 >.

BYSKOV, A. G.; LINTERN-MOORE, S. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. **J Anat**, v. 116, n. Pt 2, p. 207-17, Nov 1973. ISSN 0021-8782 (Print) 0021-8782 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4783416> >.

CAHILL, L. P.; MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **J Reprod Fertil**, v. 61, n. 1, p. 201-206, January 1, 1981 1981. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/61/1/201.abstract> >.

CALONGOS, G. et al. Comparison of urinary and recombinant follicle-stimulating hormone in in vitro growth, maturation, and fertilization of mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 5 Suppl, p. 1482-9, May 2008. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854805> >.

CARRIJO-JR, O. A. **Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas domésticas**. 2009. (Doutorado). Biologia Animal, Universidade de Brasília

CARRIJO JR., O. A. **Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas domésticas**. 2009. 105 (Doutorado). Doutorado em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília.

CARRIJO, O. A., JR. et al. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 2, p. 152-60, 2010. ISSN 1422-6421 (Electronic) 1422-6405 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546511> >.

CARVALHO, A. A. et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 933-41, Sep 15 2011. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719087> >.

CELESTINO, J. J. et al. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. **Mol Cell Endocrinol**, v. 338, n. 1-2, p. 1-9, May 16 2011. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333714> >.

CHAO, L. et al. Normal developmental competence to the blastocyst stage is preserved in rabbit ovarian tissue following cryopreservation and autografting to the mesometrium. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, n. 4, p. 466-73, 2008. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462608> >.

CHEN, S. U. et al. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. **Fertil Steril**, v. 74, n. 4, p. 804-8, Oct 2000. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020527> >.

CHOI, J. et al. Effect of activin A and insulin-like growth factor-I on in vitro development of preantral follicles isolated from cryopreserved ovarian tissues in the mouse. **Cryobiology**, v. 57, n. 3, p. 209-15, Dec 2008. ISSN 1090-2392 (Electronic) 0011-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789915> >.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2014. Acesso em: 01/26/2015.

COMIZZOLI, P. et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 47-52, 2009. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01373.x> >.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. **Hum Reprod**, v. 17, n. 1, p. 48-54, Jan 2002. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756361> >.

CZARNY, N. A.; HARRIS, M. S.; RODGER, J. C. Dissociation and preservation of preantral follicles and immature oocytes from female dasyurid marsupials. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, n. 5, p. 640-8, 2009. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486600> >.

DEMEESTERE, I. et al. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. **Biol Reprod**, v. 70, n. 6, p. 1664-9, Jun 2004. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960488> >.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 6, p. 649-65, Nov-Dec 2009. ISSN 1460-2369 (Electronic) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474206> >.

DERRAR, N.; PRICE, C. A.; SIRARD, M. A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 587-98, Sep 1 2000. ISSN 0093-691X (Print)

0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071133> >.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Chapter 2 Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Models to Quantify Angiogenesis Induced by Inflammatory and Tumor Cells or Purified Effector Molecules. v. 444, p. 21-41, 2008. ISSN 00766879.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 8, p. 1188-1197, 11// 2014. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693414001953> >.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 197-207, January 1, 1996 1996. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/54/1/197.abstract> >.

ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **J Anim Sci**, v. 25, n. 3, p. 800-805, August 1, 1966 1966. Disponível em: < <http://www.journalofanimalscience.org/content/25/3/800.abstract> >.

FABBRI, R. et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 169, n. 1-2, p. 39-42, Nov 27 2000. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11155952> >.

FARHI, A. et al. Maternal and neonatal health outcomes following assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, n. 5, p. 454-461, 5// 2013. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648313000576> >.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 3-15, 2011.

GANDOLFI, F. et al. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v. 85 Suppl 1, p. 1150-6, Apr 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616087> >.

GIGLI, I. et al. Evidence for a role for anti-Mullerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. **Mol Reprod Dev**, v. 71, n. 4, p. 480-8, Aug 2005. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895366> >.

GOERICKE-PESCH, S. Reproduction Control in Cats: New Developments in Non-Surgical Methods. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 7, p. 539-546, July 1, 2010 2010. Disponível em: < <http://jfm.sagepub.com/content/12/7/539.abstract> >.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIREDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. ROCA, 2008. ISBN 9788572417440. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=YUtG4HX3RoMC> >.

GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **J Reprod Fertil**, v. 101, n. 3, p. 619-23, Aug 1994. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7966017> >.

GRYNBERG, M. et al. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. **Fertility and sterility**, v. 97, n. 6, p. 1260-1268, 2012. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028212004979?showall=true> >.

GUILBAULT, L. A. et al. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **J Reprod Fertil**, v. 78, n. 1, p. 127-35, Sep 1986. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3761263> >.

GUNASENA, K. T. et al. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. **Biol Reprod**, v. 57, n. 2, p. 226-31, Aug 1997. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241035> >.

GUNASENA, K. T. et al. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Hum Reprod**, v. 12, n. 1, p. 101-6, Jan 1997. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043912> >.

GUPTA, P. S. P. et al. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology**, v. 57, n. 7, p. 1839-1854, 4/15/ 2002. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02006945> >.

GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol Reprod**, v. 62, n. 5, p. 1322-8, May 2000. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775183> >.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução In: (Ed.). **Reprodução Animal**. 7: Manole, 2004. cap. 33-54,

HADARI, K.; SALEHNIA, M.; REZAZADEH VALOJERDI, M. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 6, p. 2389-97, Dec 2008. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462725> >.

HASEGAWA, A. et al. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4 Suppl, p. 1182-92, Oct 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963048> >.

HEMAMALINI, N. C. et al. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 50, n. 1-2, p. 11-22, 10// 2003. ISSN 0921-4488. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092144880300110X> >.

HREINSSON, J. G. et al. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 1, p. 316-21, Jan 2002. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788667> >.

ISACHENKO, V. et al. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32549, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479331> >.

ISACHENKO, V. et al. Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**, England, v. 13, n. 2, p. 228-234, 2006. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=16895638&lang=pt-br&site=ehost-live> >.

ISACHENKO, V. et al. Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture. **Cryobiology**, v. 66, n. 3, p. 233-238, 6// 2013. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122401300028X> >.

ISHIJIMA, T. et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **J Reprod Dev**, v. 52, n. 2, p. 293-9, Apr 2006. ISSN 0916-8818 (Print) 0916-8818 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394621> >.

ITOH, T. et al. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium1. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1099-1105, 2002/10/01 2002. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1099> >. Acesso em: 2013/08/17.

IUCN. The Red List of IUCN. 2014. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/> >. Acesso em: 01/26/2015.

JAIN, J. K.; PAULSON, R. J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 1037-1046, Oct 2006. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://000241289300001 >.

JENSEN, A. K.; KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, C. Y. Chapter 7 - Ovarian Tissue Cryopreservation for Fertility Preservation. In: ANDERSON, R. A. e SPEARS, N. (Ed.). **Cancer Treatment and the Ovary**. Boston: Academic Press, 2015. p.93-107. ISBN 978-0-12-801591-9.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 889-95, Mar 1996. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727850> >.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 4, p. 285-297, 1995. Disponível em: <

[http://www.animalreproductionscience.com/article/0378-4320\(95\)01397-I/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/0378-4320(95)01397-I/abstract) >.
Acesso em: 2014/07/15.

JEWGENOW, K.; PARIS, M. C. Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 93-100, Jul 1 2006. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620936> >.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J Reprod Fertil**, v. 112, n. 1, p. 39-47, Jan 1998. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538328> >.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, n. 2, p. 527-35, Feb 1993. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727231> >.

JEWGENOW, K. et al. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. **International Zoo Yearbook**, v. 45, n. 1, p. 124-132, 2011. ISSN 1748-1090. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1090.2010.00124.x> >.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.; OLSON, P. N. The Feline Estrous Cycle. In: SAUNDERS (Ed.). **Canine and Feline Theriogenology**. 1. Philadelphia, 2001. p.396-405.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. In: COOGAN, G. (Ed.). **Histologia Básica**. 10. Rio de Janeiro, 2004. p.433-440.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 4, p. 568-77, Apr 2009. ISSN 1472-6491 (Electronic) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401001> >.

KOL, S. Assisted Reproductive Technology (ART). In: EDITOR-IN-CHIEF: LUCIANO, M. (Ed.). **Encyclopedia of Endocrine Diseases**. New York: Elsevier, 2004. p.269-277. ISBN 978-0-12-475570-3.

LEE, D. M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 137-138, 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/428137a> >.

LEONEL, E. C. R. **Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas**. 2013. 80 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília

LEONEL, E. C. R. et al. **Effects Of Three Different Cryoprotectant Solutions On The Cryopreservation Of Feline Preantral Follicles Included In Ovarian Tissue**. The 3rd International Congress in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue and Organs (CRYO). Berlim 2013.

LIMA, A. K. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1664-6, Oct 2006. ISSN 0093-691X (Print)
0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530815> >.

LIN, T.-C.; KUO, T.-C.; LEE, W.-T. EGF and IGF-1 improve maturation of the in-vitro grown cumulus-oocyte-complexes from vitrification preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. S292, 2008.

LIU, J. et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biol Reprod**, v. 64, n. 1, p. 171-8, Jan 2001. ISSN 0006-3363 (Print)
0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133672> >.

LOKMAN, N. A. et al. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an In Vivo Model to Study the Effect of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Metastasis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 9959-70, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949841> >.

LOTZ, L. et al. Ovarian tissue cryopreservation and retransplantation – what do patients think about it? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 4, p. 394-400, 2016. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.012> >. Acesso em: 2016/04/14.

LUCCI, C. M. et al. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1101-14, Apr 15 2004. ISSN 0093-691X (Print)
0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15036998> >.

MACEDO, M. F. D.; BEZERRA, M. B.; VICENTE, W. R. R. Transplante ovariano: aplicações na reprodução de animais domésticos, silvestres e humanos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

MAGALHAES-PADILHA, D. M. et al. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 206-13, Jan 1 2012. ISSN 1879-3231 (Electronic)
0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924471> >.

MAO, J. et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. **J Anim Sci**, v. 82, n. 7, p. 1967-75, Jul 2004. ISSN 0021-8812 (Print)
0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15309943> >.

MARÍLIA, F.-F. D. M. D. Roteiro de Estudo de Ovogênese. 2013. Disponível em: < <http://www.famema.br/ensino/embriologia/ovogeneseroteiro.php> >. Acesso em: 18 de setembro.

MARTINEZ-MADRID, B. et al. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 1, p. 285-92, Jan 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291379> >.

MARTINS, F. S. et al. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the in vitro development and survival of goat preantral follicles. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 8, p. 728-36, Aug 2010. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20640385> >.

MARTINS, F. S. et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, n. 8, p. 916-24, 2008. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007556> >.

MATOS, M. H. et al. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Res Vet Sci**, v. 90, n. 3, p. 404-11, Jun 2011. ISSN 1532-2661 (Electronic) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728192> >.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125-42, Sep 1984. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6383068> >.

MICHAEL, R. P. Observations Upon the Sexual Behaviour of the Domestic Cat (*Felis catus* L.) under Laboratory Conditions. **Behaviour**, v. 18, n. 1/2, p. 1-24, 1961. ISSN 00057959. Disponível em: < <http://www.jstor.org/stable/4532981> >.

MICHEL, C. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. **Lab Anim**, v. 27, n. 3, p. 278-80, Jul 1993. ISSN 0023-6772 (Print) 0023-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8366675> >.

NAKADA, K. et al. Skeletal muscle regeneration induced by chorio-allantoic grafting. **J Muscle Res Cell Motil**, v. 19, n. 2, p. 169-77, Feb 1998. ISSN 0142-4319 (Print) 0142-4319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9536443> >.

NALBANDOV, A. V. **Reproductive physiology of mammals and birds. The comparative physiology of domestic and laboratory animals and man.** 3. 1976. 334

NOTTOLA, S. A. et al. Ultrastructure of isolated mouse ovarian follicles cultured in vitro. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, p. 3, 2011. ISSN 1477-7827 (Electronic) 1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232101> >.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682-1686, May 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/68/5/1682.abstract> >.

OKTEM, O. et al. Vitrified human ovaries have fewer primordial follicles and produce less antimüllerian hormone than slow-frozen ovaries. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 8, p. 2661-2664.e1, 2011. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211000057?showall=true> >.

PARIS, M. C. et al. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 277-91, Jan 15 2004. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662128> >.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1193-210, Apr 1 2001. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327680> >.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703-15, Dec 2008. ISSN 1741-7899 (Electronic) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074213> >.

PORCU, E. et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 169, n. 1-2, p. 33-7, Nov 27 2000. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11155951> >.

RAJARAJAN, K. et al. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1-2, p. 204-212, 2006. ISSN 09214488.

RIBATTI, D. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an In Vivo Assay to Study Antiangiogenesis. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 482-513, 2010a. ISSN 1424-8247.

_____. **The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis**. Springer, 2010b. ISBN 9789048138456. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=m-t7rwlthrwC> >.

RIBATTI, D. et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 40, n. 6, p. 1189-97, Dec 1996. ISSN 0214-6282 (Print) 0214-6282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032025> >.

_____. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 73-82, Jul 2000. ISSN 1389-2010 (Print) 1389-2010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467363> >.

RIBEIRO, A. P. C. P., E.A.; APPARÍCIO, M.; ALVES, A.E.; CARARETO, R.; VICENTE, W.R.R. Maturação in vitro de oócitos caninos: aspectos fisiológicos e sua relação com a evolução da técnica. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 1, p. 50-57, 2010.

RODRIGUES, A. P. R. et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1-3, p. 103-111, 2005. ISSN 0921-

4488. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448804001191>>.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 21-26, 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01961.x>>.

SAHA, S. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 63, n. 1-2, p. 27-39, Oct 2 2000. ISSN 0378-4320 (Print) 0378-4320 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967238>>.

SANCHEZ, M. et al. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. **Hum Reprod**, v. 22, n. 3, p. 786-91, Mar 2007. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110398>>.

SANTOS, R. R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation.** Ridderkerk: Ridderprint, 2007. 144 Disponível em: <
http://books.google.com/books?id=zH_qPgAACAAJ>.

SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010. ISSN 0378-4320. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010003830>>.

SANTOS, R. R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 4 Suppl, p. 1455-8, Apr 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722611>>.

SANTOS, R. R. et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, n. 1, p. 167-176, Jan 2007. ISSN 0302-766X. Disponível em: <<Go to ISI>://000242359300015 >.

SANTOS, R. R. et al. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 53-64, May 2007. ISSN 0378-4320. Disponível em: <<Go to ISI>://000245371600006 >.

SARAIVA, M. V. et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 19, n. 3, p. 205-14, Aug 2011. ISSN 1469-8730 (Electronic) 0967-1994 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205389>>.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition.** Pullman, WA: Current Conceptions, 2003. ISBN 0965764818 9780965764810.

SERAFIM, M. K. B. et al. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 749-755, 9/15/ 2010. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10001883> >.

SHARMA, G. T.; DUBEY, P. K.; KUMAR, G. S. Effects of IGF-1, TGF-alpha plus TGF-beta1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. **Growth Horm IGF Res**, v. 20, n. 4, p. 319-25, Aug 2010. ISSN 1532-2238 (Electronic) 1096-6374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726112> >.

SHARMA, G. T.; DUBEY, P. K.; MEUR, S. K. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system. **Anim Reprod Sci**, v. 114, n. 1-3, p. 115-24, Aug 2009. ISSN 1873-2232 (Electronic) 0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095385> >.

SHARMA, T. G.; DUBEY, P. K.; MEUR, S. K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. **Livestock Science**, v. 123, n. 2-3, p. 300-305, 8// 2009. ISSN 1871-1413. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114130800379X> >.

SHEIKHI, M. et al. Preservation of human ovarian follicles within tissue frozen by vitrification in a xeno-free closed system using only ethylene glycol as a permeating cryoprotectant. **Fertility and sterility**, v. 100, n. 1, p. 170-177.e2, 2013. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028213004196?showall=true> >.

SILVA, J. R. V. B., A.F.; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J.R. . Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciênc Rural**, v. 33, p. 913-919, 2003.

SILVA, L. D. M. Fisiologia Reprodutiva de Gatas. In: VICENTE, W. R. R. e APPARÍCIO, M. (Ed.). **Reprodução e Obstetrícia em Cães e Gatos**. 1. São Paulo: MedVet, 2015. cap. 4, p.458. ISBN 978-85-62451-28-7.

SMITZ, J. Oocyte developmental competence after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 363, n. 9412, p. 832-3, Mar 13 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031021> >.

SOTO-SUAZO, M. Z., T. M. . Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 147-160, 2005.

SWANSON, W. F. Research in Nondomestic Species: Experiences in Reproductive Physiology Research for Conservation of Endangered Felids. **ILAR Journal**, v. 44, n. 4, p. 307-316, January 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/44/4/307.abstract> >.

TANPRADIT, N. et al. **Survival of cheetah (*Acinonyx jubatus*) preantral follicles after ovarian cortex tissues cryopreservation.** 3rd International Congress on Controversies in Cryopreservation of stem cells, reproductive cells, tissue and organs (Cryo). Berlin, Germany 2013.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod**, v. 23, n. 5, p. 1151-8, May 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326514> >.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523-1533, 5// 2013. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213004597> >.

TING, A. Y. et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Hum Reprod**, v. 26, n. 9, p. 2461-72, Sep 2011. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705370> >.

VALDES, T. I.; KREUTZER, D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **J Biomed Mater Res**, v. 62, n. 2, p. 273-82, Nov 2002a. ISSN 0021-9304 (Print) 0021-9304 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209948> >.

_____. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 2, p. 273-282, 2002b. ISSN 1097-4636. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.10152> >.

VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 11, p. 1162-76, Sep 30 2007. ISSN 0169-409X (Print) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870202> >.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 817-32, Mar 1996. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727844> >.

WIEDEMANN, C.; ZAHMEL, J.; JEWGENOW, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 37, 2013. ISSN 1746-6148 (Electronic) 1746-6148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433001> >.

WONGBANDUE, G.; JEWGENOW, K.; CHATDARONG, K. Effects of thyroxin (T4) and activin A on in vitro growth of preantral follicles in domestic cats. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 824-32, Mar 15 2013a. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439008> >.

_____. **Optimization of alginate gel concentration for in vitro growing of cat preantral follicle in three-dimensional culture system.** 3rd International Congress on Controversies in Cryopreservation of stem cells, reproductive cells, tissue and organs (Cryo). Berlin, Germany 2013b.

YOUM, H. W. et al. Transplantation of mouse ovarian tissue: Comparison of the transplantation sites. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 854-861, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.026> >. Acesso em: 2015/10/05.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 90, n. 3-4, p. 265-72, Dec 2005. ISSN 0378-4320 (Print) 0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298274> >.

CAPÍTULO 1: CULTIVO DE TECIDO OVARIANO FRESCO DE GATAS *IN VITRO* E EM MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÕES DE GALINHA (CAM)¹

RESUMO

O cultivo *in vitro* (CIV) e os procedimentos de transplante são protocolos essenciais empregados na avaliação da sobrevivência e do desenvolvimento de folículos ovarianos após criopreservação. O cultivo em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM) é um método intermediário que proporciona informações importantes sobre o desenvolvimento folicular e não foi reportado em cultivo de tecido ovariano de gatas. O objetivo deste estudo foi comparar o cultivo de tecido ovariano fresco de gatas *in vitro* e em CAM para determinar se estes métodos são adequados para avaliar a eficácia da criopreservação de tecido ovariano. Para isso, ovários de oito gatas foram cortados em cubos de 3 mm³, cultivados *in vitro* e em CAM por até 5 dias, processados para histologia e avaliados quanto à morfologia, proliferação celular e distribuição de fibras conjuntivas. A maioria (87,5%) dos folículos observados eram primordiais ao longo de todo o cultivo. A porcentagem de folículos primordiais na população de folículos morfologicamente normais (FMN) foi sempre maior que 80%, com exceção do dia 3 de cultivo em CAM, mas o número de FMN reduziu do dia 0 (600/777 folículos) para o dia 5 em CAM (91/171) e CIV (296/686). Não foi observada proliferação celular ao longo do cultivo. Adicionalmente, ambos os métodos mostraram um aumento do tecido conjuntivo a cada dia que o tecido permaneceu em cultivo. Foi observada vascularização durante o cultivo em CAM, porém sem associação com a viabilidade folicular. Apesar de ambos os sistemas terem

¹ Este capítulo é referente ao artigo aceito para publicação na revista *Theriogenology* intitulado "Culture of domestic cat ovarian tissue *in vitro* and in the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)" (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.038). Autoria: J.M.V. Vilela, E.C.R. Leonel, L. D'Oliveira, R.E.G. Paiva, A.L. Miranda-Vilela, C.A. Amorim, A. Pic-Taylor, C.M. Lucci.

demonstrado manter as porcentagens de folículos morfologicamente normais, nenhum deles foi capaz de promover crescimento e/ou desenvolvimento folicular. Assim, mais estudos são necessários para encontrar métodos alternativos para o desenvolvimento de folículos pré-antrais e para melhorar os métodos de CIV em gatas para que eles possam ser adequados para avaliar a criopreservação.

INTRODUÇÃO

Tecnologias de reprodução assistida são consideradas ferramentas importantes para a conservação de animais ameaçados de extinção (Jewgenow *et al.*, 1997; Lermen *et al.*, 2009). Com exceção do gato doméstico, todos os outros felídeos estão presentes na Lista Vermelha da IUCN para espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2015), principalmente devido a impactos humanos (caça furtiva, destruição de habitat) e doenças (CITES, 2014). Devido à proximidade filogenética entre as espécies, o gato doméstico é um excelente modelo para estudos de reprodução felina, contribuindo para o entendimento da fisiologia reprodutiva dos felídeos apesar das diferenças entre espécies (Swanson, 2003).

A criopreservação e utilização de tecido ovariano tem sido estudada por várias décadas na expectativa de aproveitar o potencial ovocitário contido nos folículos pré-antrais. Técnicas de cultivo *in vitro* e transplante têm sido utilizadas para avaliar a retomada do desenvolvimento do tecido após a criopreservação, uma vez que algumas lesões foliculares não detectadas pós-descongelamento podem ser expressas somente após um curto período em atividade (Faustino *et al.*, 2011).

Apesar de grandes esforços, os sistemas de cultivo *in vitro* (CIV) ainda não estão bem desenvolvidos, pelo menos para a maioria das espécies animais. Há várias dificuldades para o estabelecimento de um sistema de CIV que permita o desenvolvimento de folículos pré-antrais, como um longo período natural de crescimento requerido por essas estruturas para atingir o estágio antral, um período em que vários fatores de crescimento e hormônios estão envolvidos (Telfer, 1998; Andrade *et al.*, 2004; Telfer e Zelinski, 2013). O transplante de tecido ovariano é provavelmente a melhor ferramenta para avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento folicular por ser a forma mais próxima da condição fisiológica. Porém, transplantes envolvem o uso de animais imunossuprimidos ou imunodeficientes (xenotransplante) ou a disponibilidade do mesmo animal do qual o tecido foi removido (autotransplante) (Demeestere *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2011). Por outro lado, o CIV pode ser completamente realizado em laboratório sem o uso de animais, apesar de não mimetizar o ambiente fisiológico do tecido. De fato, as células só podem obter os nutrientes e fatores de crescimento disponíveis no meio de cultivo, e todas as trocas

necessárias são feitas por difusão, já que não há vasos sanguíneos (Isachenko *et al.*, 2012). O cultivo em membrana corioalantoica de embriões de galinha (CAM) pode ser considerado um método intermediário para avaliação do tecido, uma vez que permite o reestabelecimento do suprimento sanguíneo e permite ao tecido acesso a fatores de crescimento disponíveis para o desenvolvimento do embrião de galinha. Além disso, a falta de um sistema imune antes do dia 17 do desenvolvimento do embrião impede a rejeição do transplante (Ribatti, 2010b). Este sistema já foi utilizado para cultivo de tecido ovariano de bovinos (Cushman *et al.*, 2002), camundongos (Gigli *et al.*, 2005) e humanos (Martinez-Madrid *et al.*, 2009; Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013). Apesar de ser um sistema menos controlado que o CIV, não é tão invasivo quanto o transplante e envolve uma implementação mais simples.

Apesar de haver resultados satisfatórios de CIV em alguns mamíferos (Liu *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2006; Isachenko *et al.*, 2006; Haidari *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2011; Isachenko *et al.*, 2012), poucos estudos foram reportados em gatas (Jewgenow e Pitra, 1993; Jewgenow e Göritz, 1995; Jewgenow, 1996; Jewgenow *et al.*, 1998; Wiedemann *et al.*, 2013; Wongbandue *et al.*, 2013b) e o sistema ainda não é bem estabelecido. O cultivo em CAM foi realizado em tecido ovariano de camundongos (Gigli *et al.*, 2005), vacas (Cushman *et al.*, 2002; Gigli *et al.*, 2005) e humanos (Isachenko *et al.*, 2006; Martinez-Madrid *et al.*, 2009; Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013). Em gatas, ele foi testado como modelo para o estudo do crescimento de fibrossarcoma vacinal felino (Zabielska *et al.*, 2012), mas nunca foi testado em tecido ovariano. Por isso, o objetivo deste trabalho foi comparar o cultivo *in vitro* e em CAM de tecido ovariano fresco de gatas domésticas e determinar sua adequação para avaliar a eficácia dos métodos de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DE OVÁRIOS

Ovários de oito gatas saudáveis de 1 a 5 anos de idade em interestro foram coletados em uma clínica veterinária após ovariectomia eletiva e transportados ao laboratório em solução salina 0,9% a 36 °C em no máximo 1 hora. No laboratório, eles foram lavados com álcool 70%, o tecido adiposo e os ligamentos foram retirados. O tecido foi cortado em fragmentos cúbicos de 3mm³ e 21 fragmentos foram utilizados de cada animal.

DESENHO EXPERIMENTAL

Se não especificado, os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os fragmentos ovarianos de cada animal foram distribuídos nos seguintes grupos de tratamento (Figura 8):

★ Controle: Um fragmento foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% para análises histológicas e imunohistoquímicas.

★ Cultivo *in vitro*: Dez fragmentos de cada animal foram cultivados em placa de 96 poços por até 5 dias em uma estufa (*TE-399, Tecnal, Brasil*) a 37,5 °C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em ar. Cada poço continha 1 fragmento e 350 µL de meio TCM-199 suplementado com 0,23 mM piruvato de sódio, 2 mM L-Glutamina, 10% soro fetal bovino (SFB), ITS (6,25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 6,25 ng/ml), 100 U/mL penicilina, 0,1 mg/mL estreptomicina e 2,3 µg/mL FSH (Folltropin®V) [meio-base adaptado de Wongbandue *et al.* (2013b)]. A cada dois dias, 175 µL do meio foram trocados por meio fresco.

★ Cultivo em CAM: Dez fragmentos de cada animal foram cultivados conforme descrito por Martinez-Madrid *et al.* (2009): ovos de galinha embrionados (doados pela Asa Alimentos S.A.) foram incubados a 37°C em umidade relativa de 60% com rotação contínua (incubadora *Premium Ecologica IP130*). No 3º dia de incubação, uma janela retangular (1 x 1,5cm) foi feita na casca do ovo. Foram retirados 2 ml de albúmen utilizando uma agulha calibre 21 pela ponta larga do ovo. A janela foi coberta por uma fita adesiva para prevenir desidratação e os ovos foram recolocados na incubadora sem rotação. No dia 10 da incubação, uma pequena área da CAM foi

traumatizada, encostando-se um fragmento de 1 cm² de papel de seda estéril na superfície do epitélio e removendo-o imediatamente. Os fragmentos de tecido ovariano foram então inseridos com uma pinça cirúrgica estéril na CAM traumatizada, um fragmento por ovo.

Para ambos os cultivos, a cada dia após a inserção dos fragmentos, até o 5º dia de cultivo, dois fragmentos foram retirados e fixados em paraformaldeído 4% por 4 horas em temperatura ambiente para análises histológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas. Após a retirada dos fragmentos ovarianos da CAM, os embriões de galinha foram eutanasiados por decapitação. Os procedimentos de cultivo em CAM foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob UnBDOC nº 30115/2013.

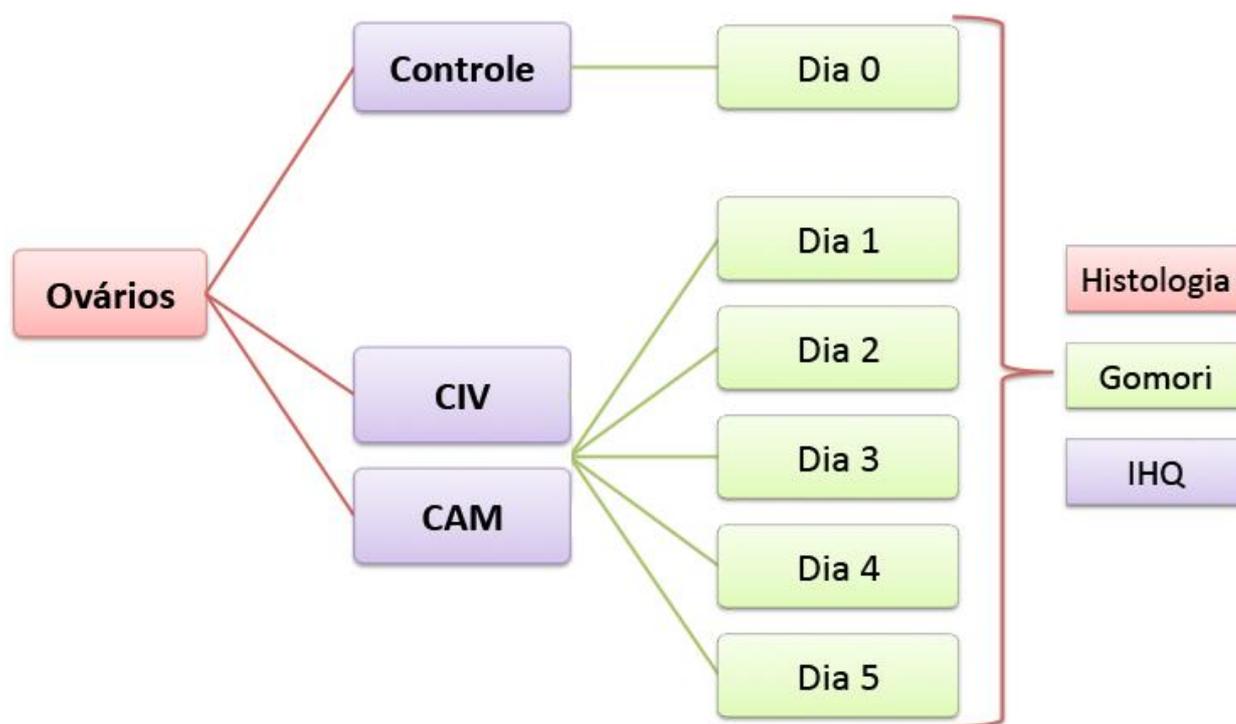


Figura 8: Desenho experimental. IHQ = Imunohistoquímica.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos do tecido ovariano provenientes dos diferentes sistemas de cultivo foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e embebidos em Paraplast. Foram feitos cortes semi-seriados com 4 µm de espessura e um a cada quatro cortes

foram montados e corados com hematoxilina e eosina (HE) ou Tricrômico de Gomory e examinados em microscópio de luz.

Para calcular o número de folículos em 1mm³ de tecido ovariano, foi utilizado o fator de correção descrito por Gougeon e Chainy (1987):

$$N1 = \frac{No \times St \times Ts}{So \times dn}$$

Onde N1 = número total de folículos calculados por classe; No = número total de folículos observados no ovário; St = número de cortes no ovário; Ts = espessura do corte (µm); So = número total de cortes observados; e dn = diâmetro médio do núcleo do ovócito para cada classe folicular (Carrijo *et al.*, 2010).

Os folículos foram classificados como primordiais (quando apresentavam apenas células da granulosa achatadas ao redor do ovócito) ou em crescimento (quando apresentavam células cuboidais ao redor do ovócito, organizadas em uma ou mais camadas), e como morfológicamente normais (FMN) ou degenerados. Os FMN apresentam-se esféricos e intactos, com distribuição uniforme das células da granulosa e ovócito esférico. Apenas folículos apresentando núcleo do ovócito visível foram contados.

IMUNOHISTOQUÍMICA

O marcador de proliferação Ki67 foi utilizado para identificar proliferação das células da granulosa. Secções foram desparafinizadas em xilol e rehidratadas em concentrações decrescentes de álcool. Após o bloqueio das peroxidases endógenas com 3% H₂O₂ diluídos em metanol por 30 minutos, os cortes foram incubados por 30 minutos em leite em pó desnatado a 5% diluído em PBS para bloquear os sítios de ligação inespecíficos antes da incubação com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-Ki67 (diluição 1:25, clone MIB1, ref M7240, Dako) *overnight* a 4 °C. As lâminas foram então incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente com anticorpos de cabra anti-camundongo (diluição 1:200 em BSA 1M, IgG - HRP - HRO conjugated, ref sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, EUA) seguida de avidina por 45 minutos a 37 °C (ImmunoCruz, Rabbit ABC Staining System Kit, ref. sc-2018, Santa Cruz Biotechnology,

EUA). Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como cromógeno (K3468, Dako). Em seguida, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas com bálsamo do Canadá (ref 1003, Dinâmica, Brasil). O controle negativo consistiu na solução de diluição sem o anticorpo primário. Folículos com pelo menos uma célula da granulosa marcada com Ki67 foram considerados proliferativos.

Para vascularização, foi utilizado o anticorpo anti-alfa-actina (mouse monoclonal, 1A4, diluição 1:100, sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). A recuperação antigênica foi realizada com a imersão dos cortes em tampão citrato 10 mM, pH 6,0, a 93 °C por 20 minutos. Em seguida, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ em metanol (10%) durante 20 minutos. O bloqueio de reações a proteínas inespecíficas foi feito com leite em pó desnatado 5% por 30 a 60 minutos. Os cortes foram incubados a 4 °C *overnight* com o anticorpo primário diluído em albumina sérica bovina (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA) e após incubados com polímero EnVision TM + Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA). Os cortes foram revelados com solução de diaminobenzidina (DAB – K3468, Dako) e contracorados com hematoxilina de Mayer. Próstata de camundongo foi utilizada como controle positivo. O controle negativo consistiu na solução de diluição sem o anticorpo primário.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS[®] versão 17.0. Variáveis quantitativas foram testadas para distribuição normal utilizando o teste Shapiro-Wilk e transformadas para arcsen√% quando não apresentavam distribuição normal. Possíveis diferenças entre os grupos foram investigadas por ANOVA ou o teste Kruskal-Wallis (para dados não distribuídos normalmente, mesmo após transformação), seguidos pelo teste de Bonferroni (comparações múltiplas) ou Mann-Whitney U (comparações 2 a 2). O teste T ou teste de Wilcoxon (dados não distribuídos normalmente) foi utilizado para verificar as diferenças entre CAM e CIV (comparações pareadas). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A taxa de sobrevivência dos embriões de galinha foi de 75,58% (130 de 172) após a inserção dos fragmentos de ovário. A morte dos embriões foi detectada pela aparência fosca do saco vitelino. Foram analisados fragmentos de ovário oriundos apenas de ovos viáveis.

Um total de 6291 folículos ovarianos foram analisados: 5720 primordiais e 574 folículos em crescimento. Foi observado que os folículos primordiais foram sempre a maioria (90,9%) de todos os folículos encontrados em todos os grupos. Houve um decréscimo geral na porcentagem de folículos morfológicamente normais (FMN), tanto primordiais quando em crescimento, durante o cultivo (Tabela 2). Entretanto, diferenças significativas foram observadas apenas para CIV comparado ao controle (dia 0), do dia 2 em diante para folículos primordiais, e nos dias 2 e 3 para folículos em crescimento. As porcentagens de FMN em crescimento nos dias 4 e 5 do CIV não foram diferentes do dia 0 ($P < 0,05$), provavelmente devido ao baixo número de folículos encontrados nos fragmentos ovarianos. Por outro lado, o número total de FMN em crescimento nesses dias foi significativamente diferente ($P < 0,05$) do controle (dia 0). Nenhuma diferença foi observada entre as porcentagens de FMN (primordiais ou em crescimento) em fragmentos ovarianos cultivados em CAM e o controle ($P > 0,05$). Também não houve diferença estatística entre as porcentagens e o número de folículos em CAM e CIV durante o cultivo.

Tabela 2: Porcentagem (média \pm desvio padrão) e número de FMN primordiais e em crescimento, em relação ao total, no controle (Dia 0) e durante os 5 dias de cultivo in vitro (CIV) e em CAM.

Tratamento	Dia	% FMN Primordiais	% FMN em crescimento	Total
Controle	0	79 \pm 8 (600/777)	89 \pm 16 (35/44)	821
	1	60 \pm 24 (351/637)	69 \pm 32 (31/43)	680
	2	38 \pm 20 (127/285)	59 \pm 39 (19/43)	328
CAM	3	60 \pm 26 (110/191)	65 \pm 5 (55/86)	277
	4	60 \pm 30 (165/340)	57 \pm 37 (29/43)	383
	5	53 \pm 41 (91/171)	44 \pm 62 (15/18)	189
CIV	1	56 \pm 20 (501/864)	54 \pm 39 (39/78)	942
	2	53 \pm 12* (314/581)	43 \pm 35* (28/51)	632
	3	49 \pm 18* (379/745)	47 \pm 34* (58/119)	864
	4	46 \pm 17* (222/443)	14 \pm 22 (4/51)	468
	5	42 \pm 18* (296/686)	46 \pm 45 (11/24)	710

* indica diferença significativa em relação ao controle (Dia 0) na porcentagem de FMN ($P < 0,05$).

Considerando apenas os FMN, folículos primordiais também estavam presentes em maior número (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre CAM e CIV ou entre os dias de cultivo ($P > 0,05$). A porcentagem de folículos primordiais na população de FMN foi sempre maior que 80%, com exceção do dia 3 de cultivo em CAM, onde houve uma maior variação entre as amostras e muitos fragmentos não apresentavam nenhum folículo. Além disso, no dia 3, tanto em CIV quanto em CAM, a porcentagem de folículos em crescimento foi maior que no controle, apesar de não ter sido observada diferença estatística ($P > 0,05$).

Tabela 3: Porcentagem (Média \pm desvio padrão) e número de folículos primordiais e em crescimento, considerando apenas FMN, em controle (Dia 0) e durante 5 dias de cultivo in vitro (IVC) e em CAM.

Tratamento	Dia	% Primordiais/FMN	% Em Crescimento/FMN
Controle	0	94 \pm 4 (600/635)	6 \pm 4 (35/635)
	1	92 \pm 8 (351/382)	8 \pm 8 (31/382)
	2	88 \pm 10 (127/146)	12 \pm 10 (19/146)
CAM	3	66 \pm 29 (110/165)	34 \pm 29 (55/165)
	4	81 \pm 20 (165/194)	19 \pm 20 (29/194)
	5	91 \pm 16 (91/106)	9 \pm 16 (15/106)
CIV	1	94 \pm 7 (501/540)	6 \pm 7 (39/540)
	2	90 \pm 14 (314/342)	10 \pm 14 (28/342)
	3	86 \pm 23 (379/437)	14 \pm 23 (58/437)
	4	95 \pm 10 (222/226)	5 \pm 10 (4/226)
	5	97 \pm 5 (296/307)	3 \pm 5 (11/307)

O número estimado de folículos em 1 mm³ de tecido ovariano é apresentado na Tabela 4. O número de folículos primordiais cultivados em CAM nos dias 2, 3 e 5 foi significativamente menor ($P < 0,05$) que no controle. Não houve outras diferenças estatísticas.

Tabela 4: Número estimado (média \pm DP) de folículos primordiais e em crescimento, em 1 mm³ de tecido ovariano.

Tratamento	Dia	Primordiais	Em Crescimento
Controle	0	377 \pm 305	15 \pm 16
	1	299 \pm 288	15 \pm 20
CAM	2	101 \pm 132*	13 \pm 23
	3	86 \pm 149*	24 \pm 41
	4	156 \pm 334	11 \pm 16
	5	68 \pm 85*	4 \pm 11
CIV	1	379 \pm 331	30 \pm 45
	2	285 \pm 182	21 \pm 22
	3	360 \pm 145	35 \pm 42
	4	157 \pm 157	8 \pm 15
	5	303 \pm 536	10 \pm 16

* indica diferença significativa em relação ao controle (Dia 0) ($P < 0,05$).

As alterações mais frequentemente observadas nos folículos primordiais foram ovócito com núcleo picnótico, citoplasma do ovócito retraído e folículo destacado do estroma. Outros sinais de degeneração foram ovócito destacado das células da granulosa, vacúolos citoplasmáticos e desorganização/picnose das células da granulosa (Figura 9).

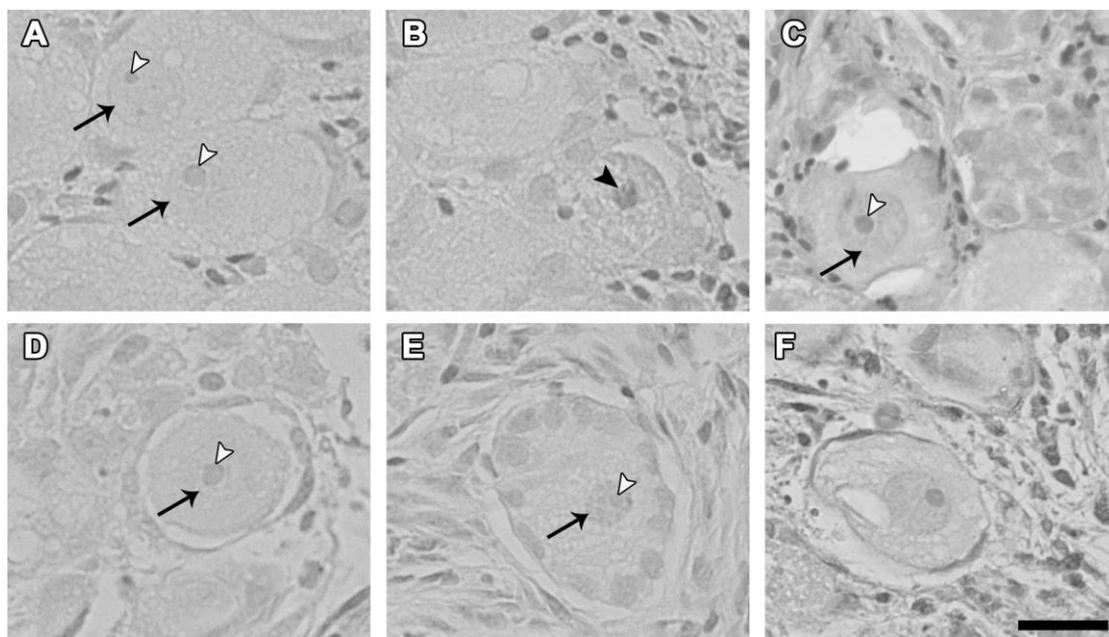


Figura 9: Alterações mais observadas nos folículos ovarianos em CIV e CAM. Setas pretas indicam o núcleo do ovócito; pontas de seta brancas indicam o nucléolo. A) Folículos primordiais morfologicamente normais. B) Folículo primordial com núcleo do ovócito picnótico (ponta de seta preta). C) Folículo primordial com citoplasma do ovócito retraído. D) Folículo primordial com citoplasma do ovócito destacado das células da granulosa. E) Folículo em crescimento descolado do estroma. F) Folículo primordial apresentando vacúolos no ovócito e descolado do estroma. Barra = 10 μ m.

A Figura 10 mostra imagens representativas de fragmentos não cultivados (controle) e cultivados *in vitro* e em CAM corados em HE (A-C), marcados com anti-Ki67 (D-F) e corados com tricrômico de Gomori (G-I). Enquanto FMN eram abundantes no dia 0 (controle – Figura 10A), poucos folículos foram encontrados no dia 5 do cultivo em CAM (Figura 10B) e muitos folículos degenerados foram observados em CIV (Figura 10C). Além disso, foi observado um aumento da vascularização do tecido cultivado por 5 dias em CAM (Figura 10B), o que obviamente não foi observado em CIV (Figura 10C). No dia 0 (controle – Figura 10D), foi possível observar a proliferação das células da granulosa em folículos em crescimento, marcadas pelo anticorpo Ki67.

Durante o cultivo, entretanto, não foi observada nenhuma célula marcada com o anticorpo, tanto em CAM quanto em CIV (Figura 10E e F). O tricrômico de Gomori mostrou que os fragmentos apresentaram cada vez mais tecido conjuntivo ao longo do cultivo, independentemente do sistema (Figura 10G, H e I).

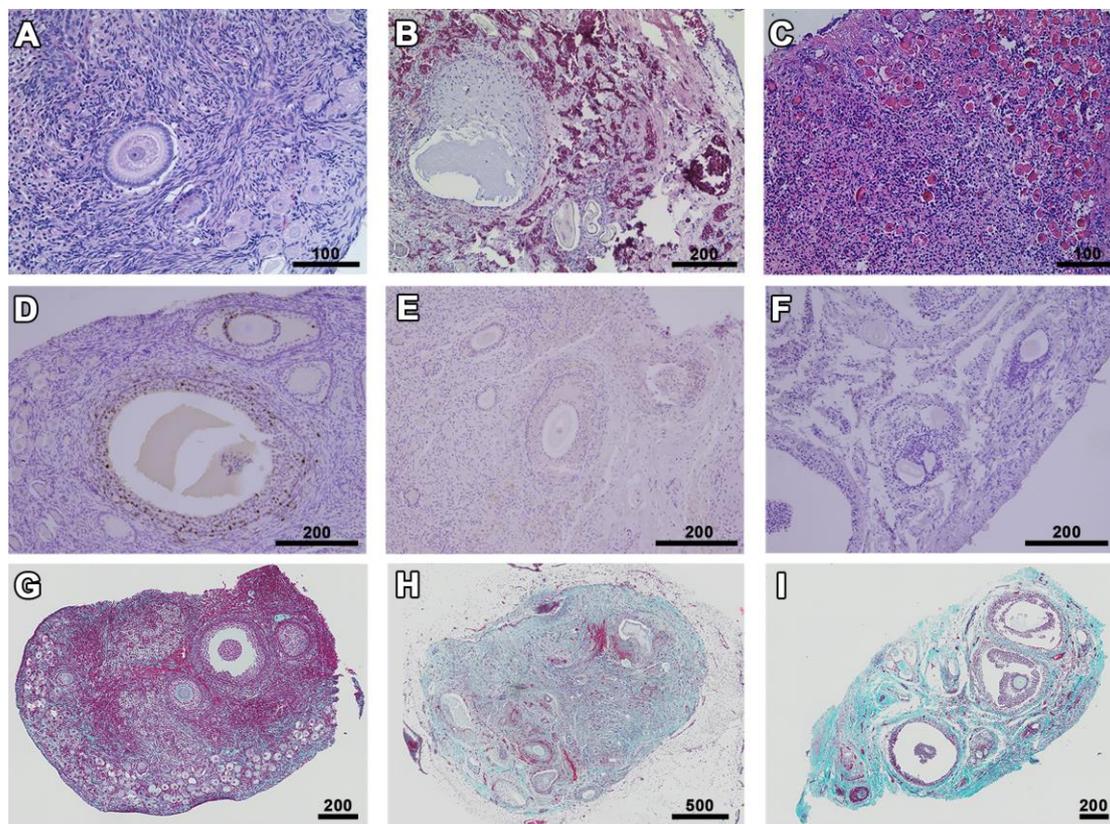


Figura 10: A, B e C: Aspecto geral do tecido ovariano no dia 0 (controle – A) e dia 5 em CAM (B) e CIV (C). Folículos ovarianos raramente foram encontrados após 5 dias de cultivo em CAM. D, E e F: Proliferação celular marcada com anticorpo Ki67 no dia 0 (controle – D), dia 4 de cultivo em CAM (E) e dia 3 de CIV (F). Células da granulosa proliferativas estão marcadas em marrom. G, H e I: Coloração por tricrômico de Gomori no dia 0 (controle - G); e dia 4 do cultivo em CAM (H) e CIV (I). Núcleos corados em roxo; vasos sanguíneos corados em vermelho; tecido conjuntivo corado em azul. Barra = escala em μm .

Vasos sanguíneos foram observados desde o dia 1 do cultivo, mas a CAM aderiu ao tecido ovariano no dia 2. Vasos sanguíneos de galinha foram observados permeando o tecido ovariano de gata cultivado em CAM nos dias 4 e 5, como foi confirmado pela marcação com anti-alfa-actina, contendo hemácias nucleadas (Figura 11).

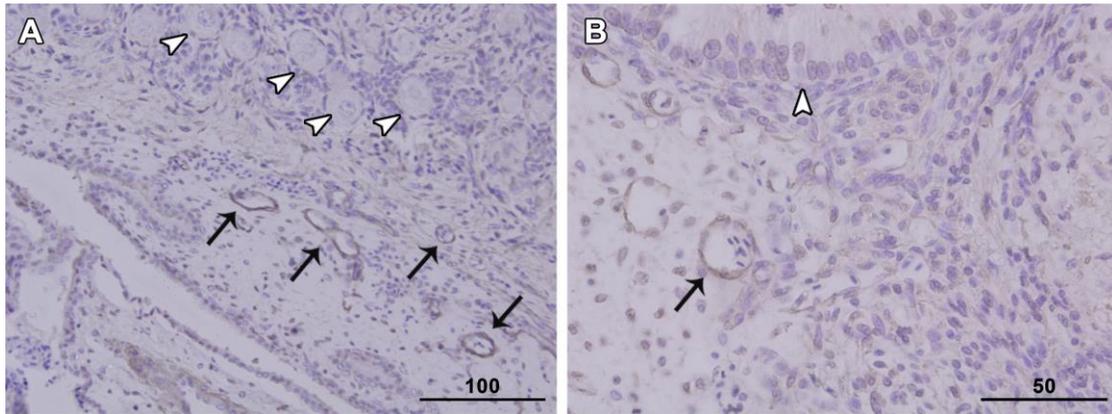


Figura 11: Vasos sanguíneos marcados com anti-alfa-actina (setas pretas) permeando o tecido ovariano, próximos a folículos ovarianos (pontas de seta brancas).

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo comparando o cultivo de tecido ovariano de gatas *in vitro* e em CAM. O cultivo de tecido ovariano em CAM já foi realizado em camundongos, bovinos (Cushman *et al.*, 2002; Gigli *et al.*, 2005) e humanos (Martinez-Madrid *et al.*, 2009; Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013), mostrando que folículos primordiais sobreviveram até 5 dias *in ovo*. No presente estudo, folículos primordiais representaram 81-97% de todos os folículos morfologicamente normais em todos os dias de cultivo. Porém, houve uma redução visível no número estimado de folículos em 1 mm³ de tecido ovariano cultivado em CAM nos dias 2, 3 e 5 comparados ao controle (dia 0), mostrando que, apesar de a proporção de folículos primordiais normais permanecer constante, a maioria dos folículos não sobreviveu *in ovo*. Isto também foi observado por Gigli *et al.* (2005), que reportaram uma queda significativa no número de folículos (primordiais, primários e secundários) em tecido ovariano de camundongo, tanto após 2 dias em CAM quanto cultivado 2 dias *in ovo* seguido por 8 dias *in vitro*. Por outro lado, Cushman *et al.* (2002) realizaram cultivo de tecido ovariano bovino em CAM por 5 dias e o número de folículos não foi alterado em seu experimento. Martinez-Madrid *et al.* (2009) observaram que, após 5 dias de cultivo em CAM, tecido ovariano humano apresentou um aumento na porcentagem de folículos intermediários e primários. Porém, no seu estudo, não foi reportado o número total de folículos contados.

No presente estudo, foi observada uma notável variação individual na resposta do fragmento ao cultivo, especialmente nos dias 3 e 5 do cultivo em CAM, quando o número de folículos foi dramaticamente reduzido em comparação com o controle (Dia 0) (Tabela 2). Além disso, muitos fragmentos não apresentavam nenhum folículo. O dia 3 do cultivo em CAM também apresentou um aumento no número e porcentagem de FMN em crescimento, somados a uma queda na porcentagem de FMN primordiais, sugerindo ativação e desenvolvimento folicular. Entretanto, as análises estatísticas não mostraram diferenças significativas e esses resultados não foram mantidos nos dias 4 e 5 em CAM.

Era esperado que o cultivo em CAM fosse mais efetivo devido à possibilidade de crescimento vascular fisiológico e possível presença de nutrientes e fatores de crescimento naturais. De fato, foi observada neovascularização no tecido nos dias 4 e 5 de cultivo em CAM, confirmada pela imuno-histoquímica e pela presença de hemácias de galinha (nucleadas) no tecido ovariano. A vascularização foi induzida pelo processo de cicatrização causado pela traumatização da CAM antes da inserção dos fragmentos (Martinez-Madrid *et al.*, 2009). Este fato está de acordo com a literatura para cultivo de tecido ovariano humano em CAM pela mesma duração do presente estudo (Martinez-Madrid *et al.*, 2009; Isachenko *et al.*, 2012). Todavia, o número reduzido de folículos, a ausência de proliferação celular e o aumento do tecido conjuntivo observados no presente estudo sugerem que esse sistema não foi eficiente para manter ou promover o desenvolvimento de folículos ovarianos de gatas.

Existem vários estudos a respeito dos fatores de angiogênese presentes na CAM [revisado por Ribatti *et al.* (2001)], sendo alguns deles importantes para o desenvolvimento folicular, tais como o Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (bFGF) e o Fator de Crescimento e Transformação β (TGF- β). Apesar de a relevância fisiológica do bFGF para a função ovariana ainda estar sob investigação, algumas evidências sugerem que este fator pode ter um papel central no suporte do crescimento e desenvolvimento das células da granulosa-luteínicas (Gospodarowicz, 1989). Muitos fatores de crescimento da superfamília TGF- β possuem funções conhecidas na foliculogênese. Porém, pouco se sabe sobre seu papel em ovários de gatas. O TGF- β , juntamente com a ativina e diversas proteínas morfogênicas ósseas

(BMPs), está envolvido em ações parácrinas nas células da teca para atenuar a produção de andrógenos dependente de LH em folículos antrais pequenos e médios (Glister *et al.*, 2005). Em gatas, este fator de crescimento pode atuar nas populações de folículos intermediários e antrais, ativando a via de sinalização Smad (Bristol e Woodruff, 2004). Outro fator de crescimento presente na CAM é o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (IGF-I) (De Pablo *et al.*, 1993), que é conhecido por aumentar a sensibilidade das células da granulosa a gonadotropinas no ovário de mamíferos (Behl e Kaul, 2002), mas não há estudos específicos sobre este fator em gatas. Não é conhecido se os fatores de crescimento presentes na CAM compartilham da mesma sequência de aminoácidos necessária para o crescimento e desenvolvimento folicular em gatas. Portanto, diferenças entre as espécies também podem impactar os resultados encontrados no presente estudo. Gigli *et al.* (2005) sugeriram que o hormônio anti-mulleriano (AMH) presente nas gônadas de embriões de galinha inibe a ativação folicular em tecido ovariano de camundongos e bovinos. É possível que o mesmo fator esteja afetando o desenvolvimento de folículos de gatas no cultivo em CAM, mas outros estudos precisam ser realizados para compreender quais fatores podem influenciar o desenvolvimento do tecido ovariano de gatas em CAM.

A porcentagem de FMN reduziu em relação ao controle (Tabela 2). No dia 3 do CIV, assim como em CAM, houve um aumento da porcentagem de FMN em crescimento, com uma redução concomitante nos folículos primordiais, apesar de não ser estatisticamente significativa (Tabela 3). Diversos outros estudos reportaram crescimento folicular *in vitro* em outras espécies. Entretanto, a maioria deles estava testando diferentes hormônios/fatores de crescimento, como Hormônio do Crescimento (GH) (Tanpradit e Chatdarong, 2011; Wongbandue *et al.*, 2013b), IGF-I, Fator de Crescimento Epidermal (EGF), bFGF (Jewgenow e Pitra, 1993; Jewgenow, 1996; 1998; Rajarajan *et al.*, 2006; Sharma, G. T. *et al.*, 2009) e ativina-A (Telfer *et al.*, 2008; Tanpradit e Chatdarong, 2011; Wongbandue *et al.*, 2013b).

Apesar de os resultados em CAM e CIV não terem sido diferentes estatisticamente ($P > 0,05$), o cultivo em CAM mostrou um número muito menor de folículos que o CIV no presente estudo. Além disso, a variação entre os fragmentos,

bem como o número de fragmentos que não apresentaram nenhum folículo, também foram maiores em CAM. Esses resultados sugerem que o CIV é uma melhor opção para avaliar a sobrevivência folicular e seu desenvolvimento inicial do que o cultivo em CAM. Quando Isachenko *et al.* (2013) compararam o cultivo em CAM e o autotransplante de tecido ovariano humano após criopreservação, eles observaram que 88% dos folículos primordiais estavam degenerados após 5 dias de cultivo em CAM, enquanto o tecido autotransplantado restabeleceu o ciclo menstrual espontaneamente e aumentou a concentração sérica de 17- β estradiol de 19 para 220 pg/mL em cinco meses. O autotransplante e o xenotransplante também já mostraram resultados promissores em outros estudos (Bosch *et al.*, 2004; Santos, 2007; Donnez e Dolmans, 2014).

Em gatas, após um longo período sem publicações nesta linha de pesquisa, novos estudos estão emergindo, mas não há consenso sobre o melhor método para cultivo de folículos pré-antrais felinos. Estudos recentes têm utilizado o cultivo *in vitro* para avaliar a criopreservação do tecido ovariano nesta espécie. Wiedemann *et al.* (2013) reportaram que 85% dos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano criopreservado de gatas domésticas, leopardos chineses e leões africanos estavam degenerados após 14 dias em CIV. Além disso, no mesmo estudo, houve uma redução significativa no número de folículos contados durante o cultivo. O meio de cultivo utilizado pelos autores foi o mesmo descrito por Telfer *et al.* (2008), que reportaram que, em tecido ovariano de humanos cultivado sem ativina por 4 dias, mais de 90% dos folículos apresentaram sinais de degeneração. Assim, é possível que o meio utilizado no presente experimento e na literatura (Wiedemann *et al.*, 2013) não tenha sido adequado para sustentar o desenvolvimento de folículos de gatas. Como há pouca informação sobre a foliculogênese em gatas (Göritz *et al.*, 1996; Bristol e Woodruff, 2004), ainda há dificuldades para o desenvolvimento de um meio de cultivo adequado. Adicionalmente, o próprio processo de criopreservação pode ter influenciado na grande perda folicular após cultivo observada na literatura (Wiedemann *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi investigar a eficiência do CIV e do cultivo em CAM de tecido ovariano de gatas, e verificar se estes poderiam ser utilizados como

ferramentas para avaliar os protocolos de criopreservação em tecido ovariano felino. Nenhum dos sistemas foi capaz de promover crescimento e/ou desenvolvimento folicular em tecido ovariano fresco. Além disso, o cultivo em CAM promoveu uma redução drástica no número total de folículos. Como o próprio processo de criopreservação provoca injúrias no tecido, os resultados obtidos mostram que é necessário aprimorar estas técnicas de desenvolvimento folicular em felinos, em especial o CIV, para que possam ser confiáveis como método de avaliação de protocolos de criopreservação. Enquanto isso, é necessário lançar mão de métodos alternativos, como os transplantes.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. R. et al. Cultivo in vivo de folículos pré-antrais - Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-72, 2004.

BEHL, R.; KAUL, R. Insulin like growth factor 1 and regulation of ovarian function in mammals. **Indian J Exp Biol**, v. 40, n. 1, p. 25-30, Jan 2002. ISSN 0019-5189 (Print) 0019-5189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12561963> >.

BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 581-94, Jan 15 2004. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662154> >.

BRISTOL, S. K.; WOODRUFF, T. K. Follicle-Restricted Compartmentalization of Transforming Growth Factor β Superfamily Ligands in the Feline Ovary. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 846-859, March 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/70/3/846.abstract> >.

CARRIJO, O. A., JR. et al. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 2, p. 152-60, 2010. ISSN 1422-6421 (Electronic) 1422-6405 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546511> >.

CARVALHO, A. A. et al. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 933-41, Sep 15 2011. ISSN 1879-3231 (Electronic) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719087> >.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2014. Acesso em: 01/26/2015.

CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. **Hum Reprod**, v. 17, n. 1, p. 48-54, Jan 2002. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756361> >.

DE PABLO, F. et al. IGF-I and the IGF-I receptor in development of nonmammalian vertebrates. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, n. 4, p. 427-433, 1993. ISSN 1098-2795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080350418> >.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 6, p. 649-65, Nov-Dec 2009. ISSN 1460-2369 (Electronic) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474206> >.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 8, p. 1188-1197, 11// 2014. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693414001953> >.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 3-15, 2011.

GIGLI, I. et al. Evidence for a role for anti-Mullerian hormone in the suppression of follicle activation in mouse ovaries and bovine ovarian cortex grafted beneath the chick chorioallantoic membrane. **Mol Reprod Dev**, v. 71, n. 4, p. 480-8, Aug 2005. ISSN 1040-452X (Print) 1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895366> >.

GLISTER, C.; RICHARDS, S. L.; KNIGHT, P. G. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) -4, -6, and -7 Potently Suppress Basal and Luteinizing Hormone-Induced Androgen Production by Bovine Theca Interna Cells in Primary Culture: Could Ovarian Hyperandrogenic Dysfunction Be Caused by a Defect in Thecal BMP Signaling? **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1883-1892, 2005. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2004-1303> >.

GÖRITZ, F.; JEWGENOW, K.; MEYER, H. H. D. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 1, p. 117-124, January 1, 1996 1996. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/106/1/117.abstract> >.

GOSPODAROWICZ, D. Fibroblast Growth Factor: Involvement in Early Embryonic Development and Ovarian Function. **Semin Reprod Med**, v. 7, n. 01, p. 21-28, // 15.03.2008 1989. ISSN 1526-8004.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 433-442, November 1, 1987 1987. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/81/2/433.abstract> >.

HADARI, K.; SALEHNIA, M.; REZAZADEH VALOJERDI, M. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and nonvitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 6, p. 2389-97, Dec 2008. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462725> >.

HASEGAWA, A. et al. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4 Suppl, p. 1182-92, Oct 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963048> >.

ISACHENKO, V. et al. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32549, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479331> >.

ISACHENKO, V. et al. Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**, England, v. 13, n. 2, p. 228-234, 2006. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=16895638&lang=pt-br&site=ehost-live> >.

ISACHENKO, V. et al. Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture. **Cryobiology**, v. 66, n. 3, p. 233-238, 6// 2013. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122401300028X> >.

IUCN. The Red List of IUCN 2015. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/> >. Acesso em: 12/04/2015.

JEWGENOW, K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 889-95, Mar 1996. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727850> >.

_____. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1567-77, Jun 1998. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732020> >.

JEWGENOW, K. et al. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 33-39, 1997 1997. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/9404269> >.

JEWGENOW, K.; GÖRITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterisation before and after culture. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 4, p. 285-297, 1995. Disponível em: < [http://www.animalreproductionscience.com/article/0378-4320\(95\)01397-I/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/0378-4320(95)01397-I/abstract) >. Acesso em: 2014/07/15.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J Reprod Fertil**, v. 112, n. 1, p. 39-47, Jan 1998. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538328> >.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, n. 2, p. 527-35, Feb 1993. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727231> >.

LERMEN, D. et al. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1030-1033, 2009. ISSN 1365-294X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x> >.

LIN, T.-C.; KUO, T.-C.; LEE, W.-T. EGF and IGF-1 improve maturation of the in-vitro grown cumulus-oocyte-complexes from vitrification preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. S292, 2008.

LIU, J. et al. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. **Biol Reprod**, v. 64, n. 1, p. 171-8, Jan 2001. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133672> >.

MACEDO, M. F. D.; BEZERRA, M. B.; VICENTE, W. R. R. Transplante ovariano: aplicações na reprodução de animais domésticos, silvestres e humanos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

MARTINEZ-MADRID, B. et al. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 1, p. 285-92, Jan 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291379> >.

RAJARAJAN, K. et al. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1-2, p. 204-212, 2006. ISSN 09214488.

RIBATTI, D. **The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis**. Springer, 2010b. ISBN 9789048138456. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=m-t7rwlthrwC> >.

RIBATTI, D. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 4, p. 317-324, 2001. ISSN 1097-0185. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ar.10021> >.

SANTOS, R. R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation**. Ridderkerk: Ridderprint, 2007. 144 Disponível em: < http://books.google.com/books?id=zH_qPgAACAAJ >.

SHARMA, G. T.; DUBEY, P. K.; MEUR, S. K. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system. **Anim Reprod Sci**, v. 114, n. 1-3, p. 115-24, Aug 2009. ISSN 1873-2232 (Electronic) 0378-4320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095385> >.

SWANSON, W. F. Research in Nondomestic Species: Experiences in Reproductive Physiology Research for Conservation of Endangered Felids. **ILAR Journal**, v. 44, n. 4, p. 307-316, January 1, 2003. Disponível em: < <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/44/4/307.abstract> >.

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

TELFER, E. E. In vitro models for oocyte development. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 451-60, Jan 15 1998. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732026> >.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod**, v. 23, n. 5, p. 1151-8, May 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326514> >.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523-1533, 5// 2013. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213004597> >.

WIEDEMANN, C.; ZAHMEL, J.; JEWGENOW, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 37, 2013. ISSN 1746-6148 (Electronic) 1746-6148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433001> >.

WONGBANDUE, G.; JEWGENOW, K.; CHATDARONG, K. **Optimization of alginate gel concentration for in vitro growing of cat preantral follicle in three-dimensional culture system.** 3rd International Congress on Controversies in Cryopreservation of stem cells, reproductive cells, tissue and organs (Cryo). Berlin, Germany 2013b.

ZABIELSKA, K. et al. Derivation of feline vaccine-associated fibrosarcoma cell line and its growth on chick embryo chorioallantoic membrane – a new in vivo model for veterinary oncological studies. **Veterinary Research Communications**, v. 36, n. 4, p. 227-233, 2012. ISSN 1573-7446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-012-9535-9> >.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO FELINO PELO AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO

RESUMO

Quase todos os felídeos estão ameaçados de extinção, com exceção do gato doméstico, que se tornou um excelente modelo para estudos reprodutivos por sua proximidade filogenética com as outras espécies. A criopreservação de tecido ovariano tem o potencial para preservar os gametas de mamíferos e tem se tornado uma importante ferramenta para o estabelecimento de bancos genéticos e estudos reprodutivos. Este estudo teve como objetivo avaliar o processo de criopreservação de tecido ovariano de gatas por meio do autotransplante heterotópico. Para isso, quatro gatas foram submetidas a ovariectomia e os ovários foram cortados e criopreservados. Após uma semana, foram autotransplantados para a região dorsal do pescoço e retirados após 7, 14, 28, 49 e 63 dias, processados para histologia e corados com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. Foram realizadas análises imunohistoquímicas para proliferação celular, vascularização e apoptose celular. A porcentagem de folículos morfologicamente normais primordiais e em crescimento nas amostras de tecido fresco (Grupo Controle) foram de 87,8% e 96,7%, respectivamente, e imediatamente após o descongelamento (Controle Crio) de 73,7% e 100%, respectivamente, e não foram significativamente diferentes entre si. O número total de folículos primordiais reduziu drasticamente após o transplante; no dia 0, foram observados 491 folículos primordiais, enquanto no dia 7 após o transplante foram observados apenas 31 folículos nas 4 gatas. Além disso, a maioria deles estava degenerado. Folículos em crescimento quase não foram vistos após o transplante. Nenhum folículo morfologicamente normal foi encontrado a partir de 49 dias de transplante. Tanto imediatamente após o descongelamento (Controle Crio) quanto nos dias 7, 14 e 28 após o transplante os folículos encontrados estavam vivos. Nos fragmentos de Controle e Controle Crio, a maioria dos folículos (primordiais e em crescimento) apresentavam proliferação das células da granulosa. Dois folículos antrais foram encontrados aos 28 dias em uma das gatas e se mostraram vivos e

proliferativos. A principal degeneração encontrada em todos os transplantes foram estruturas foliculares apresentando células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito. Houve um aumento das fibras colágenas a partir dos 7 dias de transplante. A vascularização do tecido foi observada após 7 dias de transplante, e vasos sanguíneos calibrosos foram facilmente observados nos dias 49 e 63 após transplante. Em conclusão, apesar de ter sido observado o desenvolvimento de 2 folículos antrais, houve uma grande perda folicular após o transplante de tecido ovariano de gatas previamente criopreservado. Nossa hipótese é que a junção dos danos causados pela criopreservação com a dificuldade dos folículos de sobreviver ao período de isquemia-reperusão após os transplantes pode ter levado aos resultados do presente estudo.

INTRODUÇÃO

A extinção animal tem ocorrido em uma taxa muito mais alta que a especiação, principalmente devido a impactos humanos (caça furtiva, destruição de habitat) e doenças (Cites, 2014). A conservação animal tem como objetivo o entendimento e a sustentação da biodiversidade, pois o desaparecimento de uma espécie pode comprometer o funcionamento de todo o ecossistema (Comizzoli *et al.*, 2009). Com exceção do gato doméstico, todos os outros felídeos estão presentes na Lista Vermelha da IUCN para espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2015). O gato doméstico é um excelente modelo para estudos reprodutivos visando os felídeos selvagens devido à sua proximidade filogenética (Swanson, 2003). Além da preservação dos habitats, tecnologias de reprodução assistida, como inseminação artificial, fertilização *in vitro* e manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), são consideradas ferramentas importantes para a conservação de animais ameaçados de extinção (Jewgenow *et al.*, 1997; Lermen *et al.*, 2009). Dentre essas ferramentas, a criobiologia tem tido papel chave na formação de bancos genéticos e estudos reprodutivos (Comizzoli, 2015).

A criopreservação de tecido ovariano visando o melhor aproveitamento de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais é uma alternativa promissora e tem sido estudada em diversas espécies (Ambrosini *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010; Jewgenow *et al.*, 2011). Em gatas, Lima *et al.* (2006) compararam o uso de 1,5M de etilenoglicol (EG) ou glicerol no congelamento lento de ovário de gatas domésticas e concluíram que o EG promoveu melhor preservação da morfologia dos folículos após o descongelamento. Os autores obtiveram 58% de folículos morfologicamente normais (FMN) utilizando EG. Posteriormente, Carrijo Jr. (2009) realizou o congelamento lento de tecido ovariano felino utilizando 1,5M de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4% de sacarose em PBS e obteve uma taxa de ~55% de FMN. Outro trabalho, realizado em nosso laboratório, comparou os crioprotetores EG e DMSO a 1,5M ou a combinação de ambos (0,75M cada) em M-199 no congelamento lento e obteve uma taxa de ~80% de FMN, independente do tratamento, mas a ultraestrutura dos folículos criopreservados com DMSO se revelou mais semelhante ao controle. As mitocôndrias estavam com eletrondensidade normal e bem distribuídas; foi possível observar a

zona pelúcida e ovócito aderido às células da granulosa, enquanto no congelamento com EG ou EG+DMSO observou-se o descolamento do ovócito das células da granulosa, granulação do citoplasma e áreas vazias na região perinuclear (Leonel, 2013).

Porém, apesar de os folículos se apresentarem morfológicamente normais, isso não significa que eles estejam viáveis. Alguns danos causados pela formação dos cristais de gelo não são visíveis imediatamente após o descongelamento. Algumas lesões foliculares não detectadas imediatamente pós-descongelamento podem ser expressas somente após um período em atividade (Faustino *et al.*, 2011). Formas de avaliar tecido ovariano após criopreservação incluem o cultivo *in vitro* (Hasegawa *et al.*, 2006; Isachenko *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2013) e em membrana corioalantoica (CAM) de embriões de galinha (Isachenko *et al.*, 2012; Isachenko *et al.*, 2013) bem como os transplantes (Donnez e Dolmans, 2014; Jensen *et al.*, 2015).

O cultivo *in vitro* e em CAM ainda não foi bem estabelecido em gatas (vide capítulo 1). Já os transplantes de tecido ovariano têm mostrado resultados promissores em diversas espécies [revisado por Demeestere *et al.* (2009); Macedo *et al.* (2011); Grynberg *et al.* (2012)]. Em gatas, Gosden *et al.* (1994) realizaram xenotransplante de tecido ovariano fresco em camundongos SCID por até 9 meses e encontraram folículos antrais de até 3 mm de diâmetro. Fassbender *et al.* (2007) realizaram xenotransplante em ratos nude e obtiveram 54,5% de sobrevivência folicular após 4 semanas, além de observarem folículos antrais e complexos *cumulus* ovócito. Em nosso laboratório foi realizado autotransplante heterotópico de tecido ovariano fresco de gatas e 3 de 5 gatas apresentaram folículos antrais em 28, 49 e 63 dias pós-transplante (Leonel, 2013). Há apenas um estudo com transplante de tecido ovariano felino após criopreservação, no qual os autores realizaram xenotransplante para camundongos NOD SCID e detectaram folículos antrais após 67 dias (Bosch *et al.*, 2004). Baseado nesses resultados, o presente estudo teve como objetivo avaliar o processo de criopreservação de tecido ovariano de gatas por meio do autotransplante heterotópico.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade de Brasília (Protocolo 76940/2012). Quatro gatas adultas sem raça definida, negativas para síndrome de imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV), vermifugadas e clinicamente saudáveis foram mantidas em gaiolas individuais (80x60x45cm) com água e ração comercial *ad libitum*.

PROCEDIMENTO DE OVARIOHISTERECTOMIA

Após um mês de adaptação e observação clínica, os animais foram submetidos a ovariectomia bilateral em uma clínica veterinária local. Previamente à cirurgia, os animais foram mantidos em jejum por 12h e então foram anestesiados com acepromazina (0,2 mg/Kg) e meperidina (5 mg/Kg) aplicadas via intramuscular. A anestesia foi induzida com ketamina (3 mg/Kg) e midazolam (0,5 mg/Kg) por via intravenosa e mantida com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% (Cunha *et al.*, 2002; Schiochet *et al.*, 2007). Antibiótico profilático (enrofloxacina, 5 mg/Kg) e anti-inflamatório (cetoprofeno, 2 mg/Kg) foram administrados via intramuscular previamente ao procedimento cirúrgico. A ovariectomia foi realizada de acordo com a técnica de Fossum (2007).

Após a cirurgia, os ovários foram limpos de tecido adiposo e ligamentos e cortados em oito fragmentos de aproximadamente 1x1x5mm. Um fragmento foi imediatamente fixado em paraformaldeído 4% como controle (Dia 0). Os outros sete fragmentos foram levados ao laboratório em M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a aproximadamente 15 °C em 40 minutos.

CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DOS FRAGMENTOS

No laboratório, os fragmentos foram criopreservados conforme descrito por Leonel (2013). Resumidamente, as amostras foram colocadas em pares dentro de criotubos contendo 1 mL M-199 com 1,5M de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% SFB e 0,4% sacarose. Os criotubos foram equilibrados a 10 °C por 10 minutos e transferidos para um congelador programável (Dominium K, Biocom, Brazil), onde foram resfriados

a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidos nesta temperatura por 15 minutos para o *seeding*. Após o *seeding*, eles foram resfriados a $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então imersos em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 12).

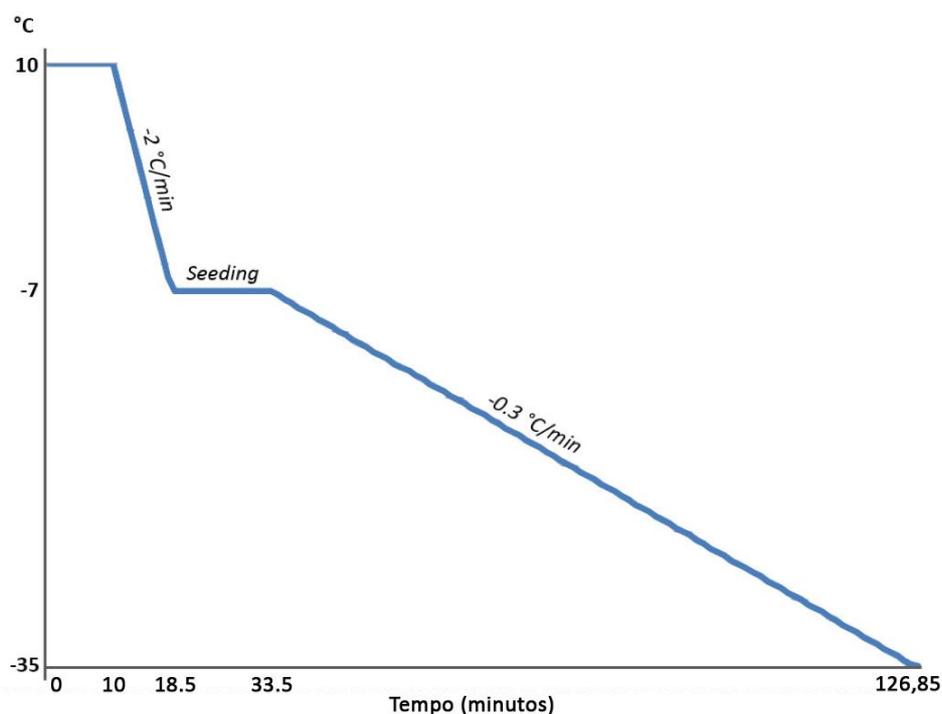


Figura 12: Curva de congelamento lento.

Após 7 dias, as amostras foram descongeladas. Primeiro, os criotubos foram mantidos a temperatura ambiente por 1 minuto e então mergulhados em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o completo descongelamento. Para remoção dos crioprotetores, cada amostra foi lavada três vezes, por 5 minutos cada, em M-199 contendo 10% SFB e concentrações decrescentes de sacarose (0,4%, 0,2% e 0) e DMSO (0,75M, 0,375M e 0). Imediatamente após o descongelamento, um fragmento foi fixado em paraformaldeído 4% (Controle Crio).

AUTOTRANSPLANTES

Os outros seis foram rapidamente lavados em solução de iodo 1% e três vezes em solução salina 0,9% estéril, e então autotransplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço das gatas (Figura 13). A técnica de autotransplantes foi

realizada conforme Leonel (2013). Cada gata recebeu 5 mg/Kg de vitamina E intramuscular no dia do transplante. Os fragmentos foram removidos após 7, 14, 28, 49 e 63 dias, quando foram fixados em paraformaldeído 4% por 4 horas em temperatura ambiente para análises. Para o transplante e a remoção dos fragmentos, as gatas foram anestesiadas com ketamina (5 mg/Kg) e xilazina (0,5 mg/Kg) intramuscular.

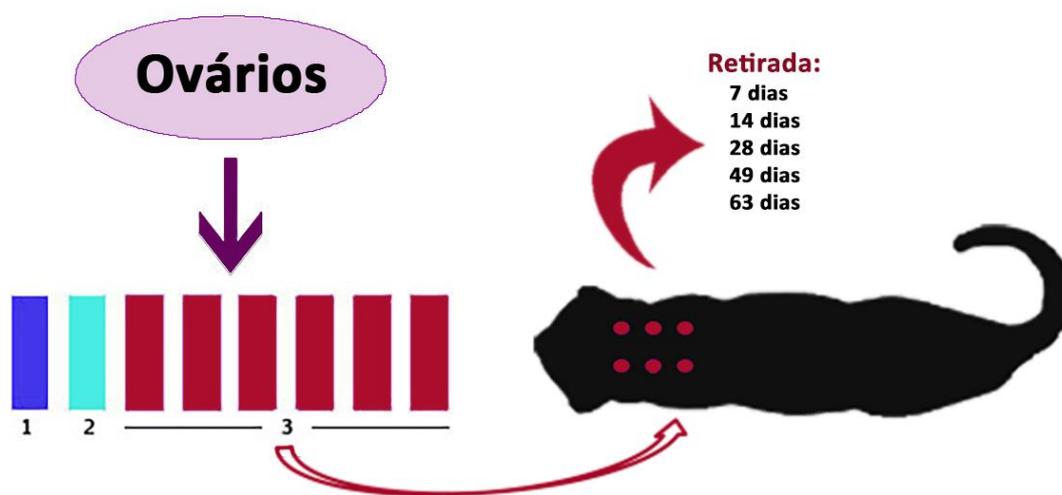


Figura 13: Fragmentos ovarianos autotransplantados. 1) Controle (Dia 0). 2) Controle Crio. 3) Transplantes após congelamento/descongelamento.

ANÁLISES HISTOLÓGICAS, HISTOQUÍMICAS E IMUNOHISTOQUÍMICAS

As amostras de tecido ovariano foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e três banhos de etanol 100%), diafanizadas em xilol e embebidas e incluídas em Paraplast. Os blocos foram cortados (4 μ m) e 1 a cada 4 cortes foi corado com hematoxilina e eosina (HE). Dos cortes remanescentes, alguns foram selecionados para coloração com tricrômico de Masson e para imunohistoquímica.

Nos cortes corados com HE, os folículos foram classificados como primordiais (quando apresentava apenas células da granulosa achatadas ao redor do ovócito) ou em crescimento (quando apresentavam células cuboidais ao redor do ovócito, organizadas em uma ou mais camadas), e como morfológicamente normais ou

degenerados. Folículos morfológicamente normais (FMN) apresentavam uma distribuição uniforme das células da granulosa e um ovócito esférico.

A coloração com tricrômico de Masson foi utilizada para verificar áreas fibróticas nos fragmentos, nas quais as fibras colágenas do tecido conjuntivo são coradas em verde. O ensaio de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) e os anticorpos anti-Ki67 e anti-CD31 foram realizados para identificar apoptose, proliferação celular e vascularização, respectivamente.

O ensaio de TUNEL foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Vanacker *et al.* (2012): As lâminas foram desparafinizadas com Histosafe (Yvsolab SA, Bélgica) e reidratadas em 2-propanol e então tratadas com uma solução de trabalho de 20 µg/ml de proteinase K em 10mM de Tris-HCl, pH 7,5, por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. Quebras de DNA foram detectadas utilizando o kit *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red (Roche)*. Após lavar em PBS, as lâminas foram incubadas com a mistura para reação de TUNEL: 50 µl da solução de enzima TdT e 450 µl da solução tampão por 60 minutos a 37 °C em câmara úmida protegida da luz, seguida por lavagem em PBS sem cálcio e magnésio. Tecido de tonsila humana foi utilizado como controle positivo e o controle negativo foi incubado com a solução marcadora sem a enzima TdT. As lâminas foram cobertas com o meio *Vectashield Mounting Medium* com 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories) e examinadas sob microscópio de fluorescência (Leica, Alemanha). As células positivas para TUNEL (fluorescência vermelha) foram visualizadas aplicando ondas de excitação na faixa de 520-560 nm e coletando emissão de 570-620 nm, respectivamente. As ondas de excitação e emissão do DAPI (fluorescência azul) foram de 360 nm e 460 nm, respectivamente. Os folículos foram classificados de acordo com Martinez-Madrid *et al.* (2004), observando a porcentagem de células mortas (fluorescência vermelha) em relação a todas as células identificadas no tecido (fluorescência azul).

O marcador de proliferação Ki67 foi utilizado para identificar proliferação das células da granulosa porque ele está presente apenas nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose). A proliferação celular foi analisada como previamente descrito por Dolmans *et al.* (2007): as lâminas foram desparafinizadas com Histosafe (Yvsolab SA, Bélgica) e reidratadas em 2-propanol. A atividade da peroxidase endógena foi

bloqueada pela incubação das lâminas em 3% H₂O₂ em água por 30 minutos à temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato por 75 minutos a 98 °C seguida de incubação com soro de cabra por 30 minutos para bloquear ligações inespecíficas. As lâminas foram então incubadas *overnight* com IgG de camundongo anti-Ki67 humano (4 °C, diluição 1:50; clone MIB-1, REF M7240, Dako, Glostrup, Dinamarca) e anticorpo secundário de cabra anti-camundongo (Dako, K4001). Diaminobenzidina (DAB – Dako) foi usado como cromógeno e os núcleos foram contracolorados com hematoxilina. Endométrio proliferativo humano foi utilizado como controle positivo. O controle negativo consistiu em incubação da amostra em solução sem o anticorpo primário. Folículos com pelo menos uma célula da granulosa marcada com Ki67 foram considerados proliferativos.

O anticorpo anti-CD-31 foi utilizado para análise de vascularização, uma vez que essa proteína marca a presença de células endoteliais no tecido. O mesmo protocolo descrito acima foi realizado, utilizando anticorpo de coelho anti-CD31 humano (PECAM-1 human clone EP3095, mAb, Epitomics, Ref 2530-1) e anticorpo secundário de cabra anti-coelho (Dako, K4003). Ovário de camundongo foi utilizado como controle positivo. O controle negativo consistiu em incubação da amostra em solução sem o anticorpo primário.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS versão 17.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram testados para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram distribuição normal, possíveis diferenças entre os grupos analisados foram investigadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS

ASPECTO MACROSCÓPICO DOS FRAGMENTOS

No dia 7, os fragmentos ainda não estavam aderidos ao tecido subcutâneo e foram facilmente removidos. Já no dia 14, os fragmentos estavam bem aderidos, com exceção de um. A partir do dia 28, todos os fragmentos estavam bem aderidos ao

tecido subcutâneo e envoltos em uma cápsula fibrosa. Do dia 14 em diante, os fragmentos recuperados estavam menores do que quando transplantados e a maioria tinha forma arredondada. Os fragmentos eram palpáveis externamente, mas a partir do dia 28, foi difícil identificá-los em meio ao tecido subcutâneo para retirá-los. Após 63 dias, apenas dois de 24 fragmentos não foram recuperados. Foi realizado ultrassom para verificar se os fragmentos ainda estavam presentes no local de transplante e eles não foram encontrados, sugerindo que foram reabsorvidos.

ASPECTO MICROSCÓPICO DOS FRAGMENTOS

O número e a porcentagem total de FMN e degenerados está apresentado na Tabela 5. O número e a porcentagem de folículos primordiais e em crescimento morfológicamente normais nas amostras dos grupos Controle e Controle Crio não foram significativamente diferentes. O número total de folículos primordiais reduziu drasticamente após o transplante. Além disso, a maioria deles estava degenerado. Folículos em crescimento quase não foram vistos após o transplante. A porcentagem de FMN em todos os dias avaliados pós-transplante foi sempre significativamente menor em relação aos grupos Controle e Controle Crio ($P < 0,05$). O ensaio de TUNEL mostrou que tanto imediatamente após o descongelamento (Controle Crio) quanto nos dias 7, 14 e 28 após o transplante os folículos encontrados não foram marcados pelo teste de TUNEL, sem células da granulosa marcadas em vermelho (Figura 14). Nos fragmentos de Controle e Controle Crio, a maioria dos folículos (primordiais e em crescimento) foi positiva para Ki67 (Figura 15).

Tabela 5: Número e porcentagem de folículos primordiais e em crescimento encontrados em tecido fresco (controle), após a congelamento/descongelamento (controle crio) e nos dias 7, 14, 28, 49 e 63 dias após o transplante.

Tipo	Grupos	Normais		Degenerados		Total
		N	%	N	%	
Primordiais	Controle	491	87,8	68	12,2	559
	Controle Crio	471	73,7	168	26,3	639
	Dia 7	31	31,3	68	68,7	99
	Dia 14	2	3,3	59	96,7	61
	Dia 28	11	26,8	30	73,2	41
	Dia 49	0	0,0	10	100,0	10
	Dia 63	0	0,0	9	100,0	9
	Em Crescimento	Controle	29	96,7	1	3,3
Controle Crio		36	100,0	0	0,0	36
Dia 7		2	40,0	3	60,0	5
Dia 14		0		0		0
Dia 28		2	100,0	0	0,0	2
Dia 49		0		0		0
Dia 63		0		0		0

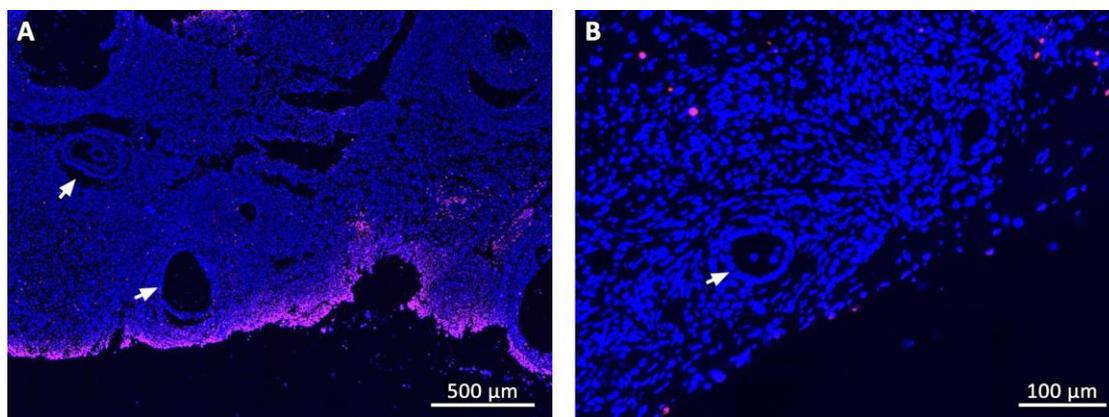


Figura 14: Imagens representativas do ensaio de TUNEL mostrando o aspecto geral do tecido no Controle Crio (A) e no dia 14 (B) após transplante. Células mortas marcadas em fluorescência vermelha. Setas brancas apontam para folículos ovarianos.

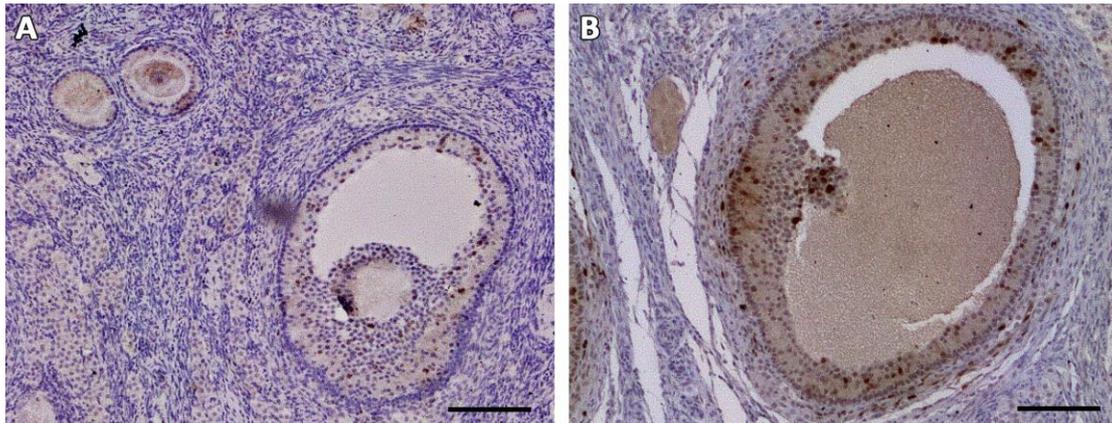


Figura 15: Marcação com Ki67 em folículos nos grupos Controle (A) e Controle Crio (B). Barra = 100 μ m.

Um achado comum foram estruturas foliculares apresentando células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito, o que foi considerado um tipo de degeneração. Esta degeneração foi observada em todos os grupos, conforme mostrado na Tabela 6. Apesar de não haver a presença do ovócito, foi confirmado pelo Ki67 que esses grupos de células estavam proliferando (Figura 16). Outras degenerações observadas foram núcleo do ovócito picnótico, ovócito com vacúolos citoplasmáticos, citoplasma do ovócito retraído ou descolado e folículo descolado do estroma.

Tabela 6: Porcentagem de estruturas foliculares com células da granulosa justapostas e sem ovócito (CGJ) em relação aos folículos degenerados encontrados (% CGJ/F. Deg) e ao total de folículos contados (% CGJ/F. Total).

Dia	% CGJ/F, Deg	% CGJ/F, Total
Controle	1,4 (1/69)	0,2 (1/589)
Controle Crio	8,9 (15/168)	2,2 (15/675)
7	63,4 (45/71)	43,3 (45/104)
14	100 (59/59)	96,7 (59/61)
28	100 (30/30)	69,8 (30/43)
49	100 (10/10)	100 (10/10)
63	100 (9/9)	100 (9/9)

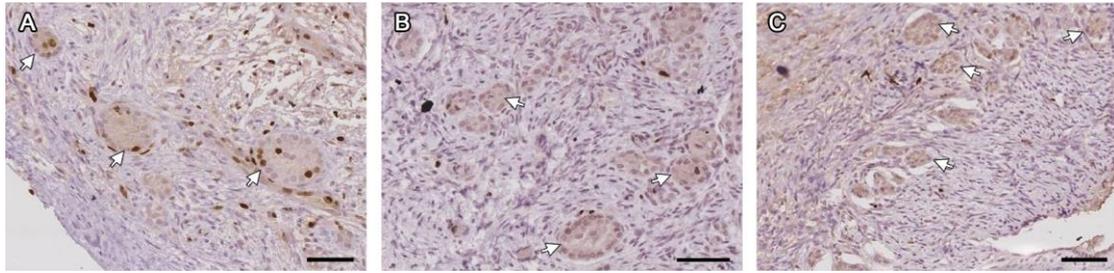


Figura 16: Estruturas foliculares com células da granulosa justapostas e sem ovócito (setas) com células marcadas com Ki67 (marrom) nos dias 7 (A), 14 (B) e 28 (C) após transplante. Barra = 200 μ m.

Em um animal, dois folículos antrais foram encontrados no dia 28 após o transplante (Figura 17A e B). Nenhum deles estava em processo de apoptose, como confirmado pelo ensaio de TUNEL (Figura 17C e D), e suas células da granulosa estavam proliferando, como confirmado pelo Ki67 (Figura 17E e F). Em coloração HE, foi possível observar que um dos folículos antrais estava em início de processo degenerativo. Em todos os outros animais, nenhum FMN em crescimento foi encontrado após 14 dias (Tabela 5).

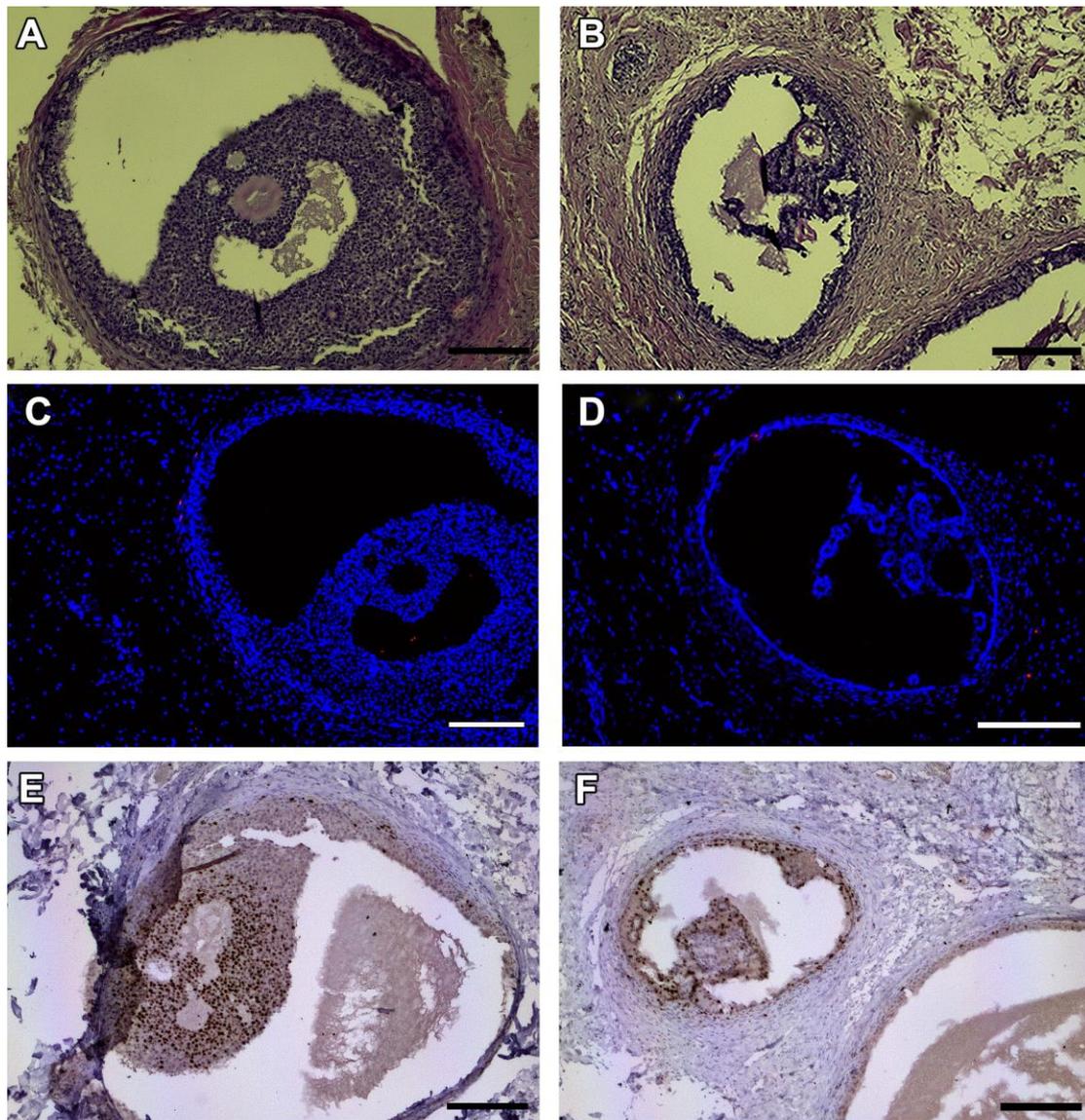


Figura 17: Folículos antrais encontrados em um animal no dia 28 após transplante. A e B) Coloração HE. C e D) Ensaio de TUNEL mostrando não haver células mortas (não há fluorescência vermelha). E e F) Marcação com Ki67 mostrando células da granulosa proliferativas marcadas em marrom. Barra = 200 μ m.

A coloração com tricrômico de Masson mostrou uma diferença entre os controles (Controle e Controle Crio – Figura 18A e B) e os transplantes. A partir de 7 dias após transplante, a maior parte do tecido estromal era constituída de fibras colágenas (coradas em verde) e, especialmente nas áreas centrais dos transplantes, sua celularidade foi consideravelmente reduzida (Figura 18C-G). Contudo, a marcação com Ki67 mostrou que as células estromais ainda estavam proliferando (Figura 18H) em todos os fragmentos. O ensaio de TUNEL mostrou que não havia células mortas

no Controle, enquanto no Controle Crio, a periferia do tecido apresentou células mortas (Figura 14A), sugerindo que esta região sofreu danos durante o processo de congelamento.

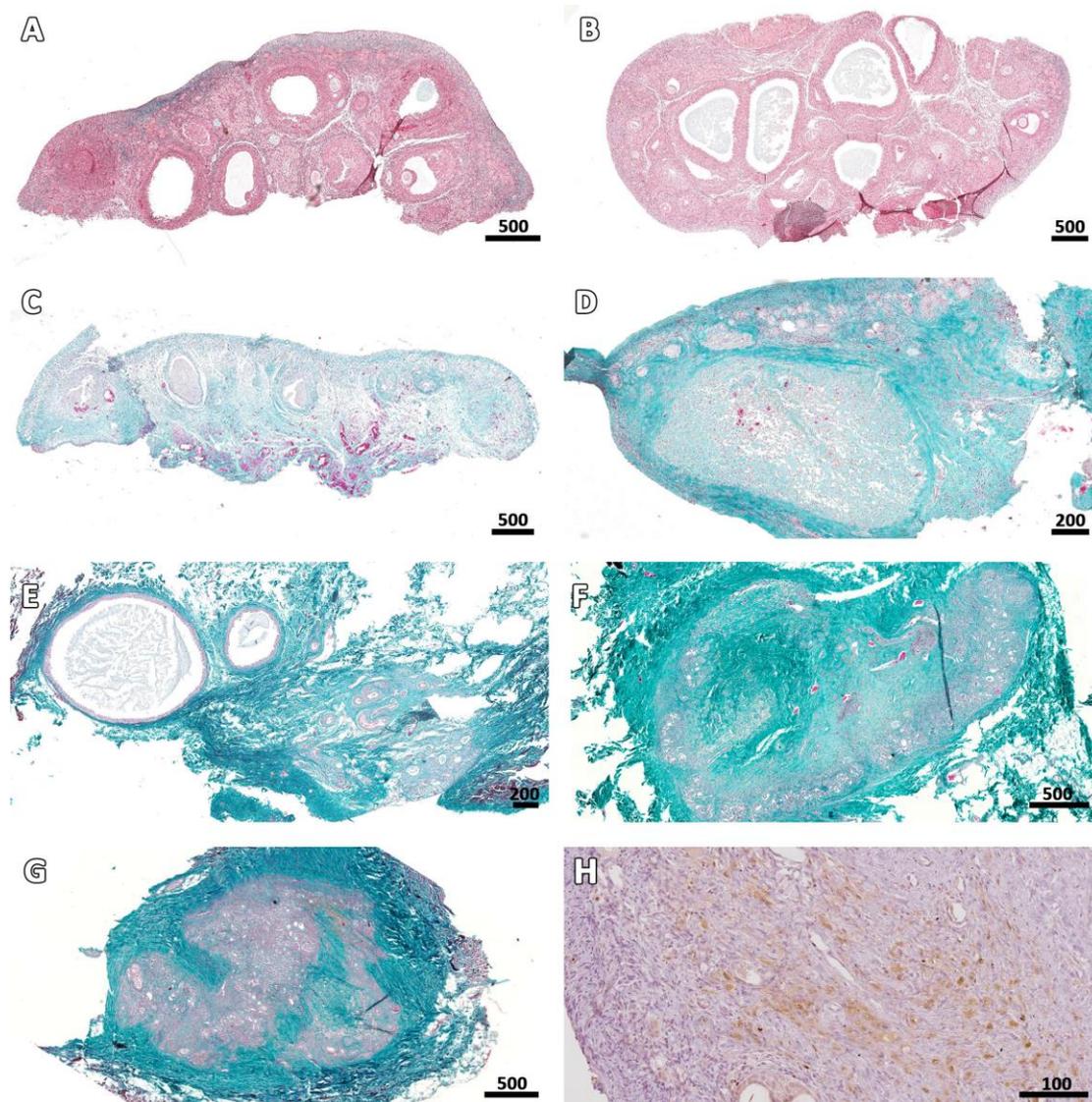


Figura 18: A-G) Coloração com tricrômico de Masson mostrando o aumento da matriz extracelular (fibras colágenas – marcadas em verde) do tecido conjuntivo nos grupos Controle (A), Controle Crio (B) e aos 7 (C), 14 (D), 28 (E), 49 (F) e 63 (G) dias após o transplante. H) Marcação com Ki67 mostrando a proliferação das células do estroma no dia 28 após o transplante. Barras: escala em μm .

A vascularização do tecido foi observada após 7 dias de transplante, conforme marcação pelo CD31 (Figura 19A), e vasos sanguíneos calibrosos foram facilmente observados em cortes corados com HE nos dias 49 e 63 após transplante (Figura 19B).

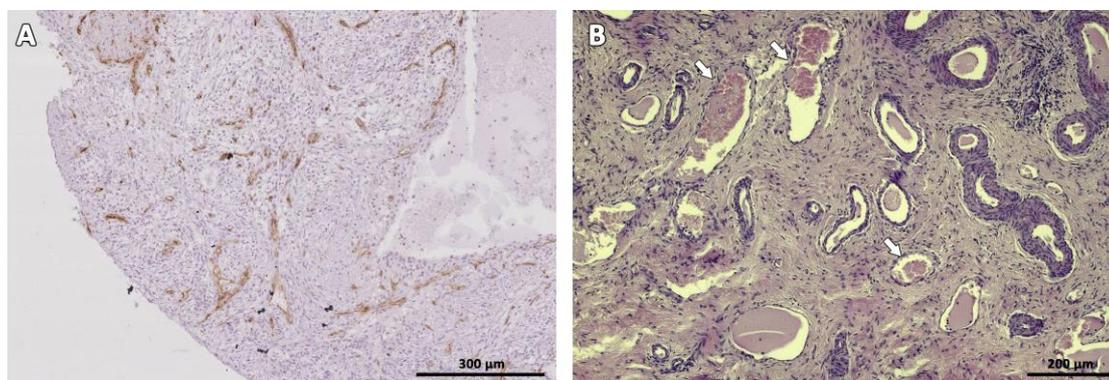


Figura 19: Vascularização do tecido nos dias 7 (A) e 63 (B) após o transplante. Setas brancas apontam para vasos calibrosos observados em coloração HE aos 63 dias de transplante.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado que o número e a porcentagem de folículos morfologicamente normais encontrados não diferiram entre o controle e o controle da criopreservação, ao contrário do que foi observado por Lima *et al.* (2006), Carrijo Jr. (2009) e Leonel (2013), que verificaram uma redução significativa na porcentagem de FMN após a criopreservação de tecido ovariano de gatas. Nossos resultados são similares aos encontrados por Leonel (2013), que observou uma média de 78% de folículos primordiais morfologicamente normais após o congelamento e descongelamento com DMSO.

Entretanto, a morfologia não significa necessariamente viabilidade folicular. A criopreservação pode afetar propriedades do ovócito e das células da granulosa que comprometam o folículo como um todo (Ambrosini *et al.*, 2006). O número de folículos observados após os transplantes no presente experimento divergiu muito do encontrado por Leonel (2013), que encontrou mais de 90% de folículos morfologicamente normais (FMN) a partir de 28 dias de transplante de tecido ovariano fresco e uma média de 181 folículos por fragmento em todos os dias de transplante. Aos 7 dias, a porcentagem média de FMN em tecido fresco transplantado foi de 68,66% (Leonel, 2013), enquanto no presente estudo, aproximadamente 30%

dos folículos eram morfológicamente normais e foram encontrados apenas 104 folículos no total, nas 4 gatas. O número de folículos reduziu ainda mais a partir dos 14 dias. A diferença na recuperação folicular entre os transplantes de tecido fresco e criopreservado pode estar refletindo as injúrias provocadas pela criopreservação do tecido.

Em gatas, Bosch *et al.* (2004) realizaram xenotransplante de tecido ovariano após criopreservação e encontraram folículos antrais 67 dias após o transplante e a luteinização de folículos após administração exógena de eCG e hCG. Neste estudo, a curva de congelamento foi diferente do presente experimento e os transplantes foram realizados na cápsula renal de camundongos NOD SCID. Além disso, os autores utilizaram EG como crioprotetor e não DMSO. Esses fatores podem explicar as diferenças encontradas em relação ao presente estudo. Ainda assim, os autores observaram uma grande redução da densidade folicular dos transplantes (11,1 folículos/0,1mm³) em relação aos controles (114,5 folículos/0,1mm³). Estes dados são semelhantes aos do presente experimento, em que foi observada uma grande redução do número de folículos em todos os transplantes. Já é sabido que a criopreservação causa uma série de injúrias ao tecido, assim como a isquemia inicial dos transplantes. Nossa hipótese é que a junção dos danos causados pela criopreservação com a dificuldade dos folículos de sobreviver ao período de isquemia-reperfusão após os transplantes pode ter levado à grande perda folicular observada no presente estudo.

O transplante de tecido ovariano já foi utilizado como forma de avaliação da criopreservação e demonstrou a restauração da função ovariana e o desenvolvimento de folículos ovarianos em vacas (Kagawa *et al.*, 2009), cabras (Santos *et al.*, 2009) e coelhas (Chen *et al.*, 2000). Foi possível observar o desenvolvimento de embriões a partir de tecido ovariano criopreservado e transplantado em coelhas (Chao *et al.*, 2008) e ovelhas (Aubard *et al.*, 1999) e o nascimento de filhotes vivos em macaco Rhesus (Lee *et al.*, 2004) e camundongos (Gunasena, Villines, *et al.*, 1997). Comparando com os resultados em outras espécies, a criopreservação em felinos parece ter resultados inferiores. Até o momento, os estudos em felinos têm sido realizados utilizando protocolos de outras espécies (Jewgenow *et al.*, 1998;

Wiedemann *et al.*, 2013). É possível que esses protocolos não sejam adequados para felídeos, sendo necessários mais estudos para definir protocolos específicos.

Foi possível observar também que os fibroblastos do estroma ovariano permaneceram vivos e proliferativos ao longo de todo o transplante. Os fibroblastos são células extremamente proliferativas e resistentes a isquemia. Em cultivo *in vitro*, nas primeiras duas semanas, a maior parte das células não fibroblásticas morrem, enquanto os fibroblastos continuam a proliferar como o tipo celular predominante (Varga *et al.*, 2005). No presente estudo, foi observado um aumento das fibras conjuntivas e uma redução da celularidade, especialmente nas áreas centrais dos transplantes. A redução da celularidade do estroma também foi observada 67 dias após xenotransplante de tecido ovariano de gatas em camundongos NOD SCID (Bosch *et al.*, 2004).

Mesmo com a baixa recuperação folicular, foi observado um aumento da vascularização em todos os dias de transplante, podendo ser observados vasos sanguíneos calibrosos aos 49 e 63 dias de transplante. Sabe-se que a maior perda de folículos ocorre durante o período de isquemia antes da reperfusão e revascularização do tecido (Aubard *et al.*, 1999). Esse período é diferente entre as espécies, sendo de 48 horas em ratos (Dissen *et al.*, 1994), 7 dias em ovelhas (Gosden *et al.*, 1994) e 5 dias em humanos (Torrents *et al.*, 2003; Van Eyck *et al.*, 2010). Não é conhecido o tempo requerido para a revascularização do tecido ovariano felino após transplante. É possível que o tempo necessário para este evento em gatas seja mais semelhante a ovelhas e humanos do que a ratos. Estudos são necessários para elucidar este processo.

A principal degeneração encontrada foram células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito. Esta degeneração também foi observada por Leonel (2013) a partir de 7 dias pós-transplante de tecido ovariano fresco de gatas. A degeneração do ovócito foi reportada como sinal de atresia mais frequente em folículos pré-antrais em outros estudos (Hirshfield, 1983; Jorio *et al.*, 1991; Figueiredo *et al.*, 1994; Braw-Tal e Yossefi, 1997). Foi reportado que o ovócito desaparece completamente nos folículos pré-antrais, enquanto as células da granulosa continuam

se proliferando (Figueiredo *et al.*, 1994; Braw-Tal e Yossefi, 1997), mostrando que o ovócito é muito mais sensível a condições adversas que as células da granulosa.

Apesar de a maioria dos folículos ovarianos não ter sobrevivido ao transplante após criopreservação, uma gata apresentou dois folículos antrais aos 28 dias de transplante, que se mostraram vivos e proliferativos pelas análises imunohistoquímicas. O tempo necessário para a formação de folículos antrais em gatas não é conhecido, mas em cultivo *in vitro*, 50% dos folículos secundários avançados de gatas isolados apresentaram cavidade antral após 14 dias (Songsasen *et al.*, 2012). Em camundongos, Liu *et al.* (2002) reportaram que, após duas semanas de transplante de tecido criopreservado, os folículos primordiais que sobreviveram foram recrutados para crescimento. Considerando que os folículos em crescimento são mais susceptíveis às condições de hipóxia antes da reperfusão do tecido (Krohn, 2013), é provável que os folículos antrais encontrados aos 28 dias de transplante no presente estudo sejam derivados de folículos secundários que se desenvolveram após o transplante.

Em conclusão, apesar dos resultados obtidos no presente trabalho mostrarem que o aproveitamento dos folículos pré-antrais ainda foi baixo após a criopreservação, a obtenção de folículos antrais vivos e proliferativos mostra que é possível haver desenvolvimento folicular em tecido ovariano de gatas após criopreservação e transplante. Além disso, foi observada revascularização do tecido. Por isso, vale a pena investir na otimização destas técnicas. Além disso, é importante obter conhecimento sobre o período de isquemia-reperfusão em transplantes de tecido ovariano de gatas.

REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, G. et al. Oocytes cryopreservation: state of art. **Reprod Toxicol**, v. 22, n. 2, p. 250-62, Aug 2006. ISSN 0890-6238 (Print)
0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787736> >.
- AUBARD, Y. et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. **Hum Reprod**, v. 14, n. 8, p. 2149-54, Aug 1999. ISSN 0268-1161 (Print)
0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438442> >.
- BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 581-94, Jan 15 2004. ISSN 0093-691X (Print)
0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662154> >.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 165-171, January 1, 1997 1997. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/109/1/165.abstract> >.
- CARRIJO JR., O. A. **Estimativa da população, caracterização morfométrica e ultraestrutural e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas domésticas**. 2009. 105 (Doutorado). Doutorado em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília.
- CHAO, L. et al. Normal developmental competence to the blastocyst stage is preserved in rabbit ovarian tissue following cryopreservation and autografting to the mesometrium. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, n. 4, p. 466-73, 2008. ISSN 1031-3613 (Print)
1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462608> >.
- CHEN, S. U. et al. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. **Fertil Steril**, v. 74, n. 4, p. 804-8, Oct 2000. ISSN 0015-0282 (Print)
0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11020527> >.
- CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2014. Acesso em: 01/26/2015.
- COMIZZOLI, P. Biotechnologies for wildlife fertility preservation. **Animal Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 73-78, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2527/af.2015-0011> >.
- COMIZZOLI, P. et al. Advances in Reproductive Science for Wild Carnivore Conservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 47-52, 2009. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01373.x> >.
- CUNHA, J. M. C. C. P. D.; 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. ISSN 0103-8478. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000100012&nrm=iso >.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 6, p. 649-65, Nov-Dec 2009. ISSN 1460-2369 (Electronic) 1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19474206> >.

DISSEN, G. A. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 1146-1154, 1994. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo.134.3.8119153> >.

DOLMANS, M.-M. et al. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. **Reproduction**, v. 134, n. 2, p. 253-262, August 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/134/2/253.abstract> >.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 28, n. 8, p. 1188-1197, 11// 2014. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693414001953> >.

FASSBENDER, M. et al. High-Resolution Ultrasonography of Xenografted Domestic Cat Ovarian Cortex. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 5, p. 1023-1034, 2007.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 3-15, 2011.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 41, n. 6, p. 1333-1346, 1994. ISSN 0093-691X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90492-2](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(94)90492-2) >. Acesso em: 2016/04/14.

FOSSUM, T. W. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In: ELSEVIER (Ed.). **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. São Paulo, 2007. p.729-745.

GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **J Reprod Fertil**, v. 101, n. 3, p. 619-23, Aug 1994. ISSN 0022-4251 (Print) 0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7966017> >.

GRYNBERG, M. et al. Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. **Fertility and sterility**, v. 97, n. 6, p. 1260-1268, 2012. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028212004979?showall=true> >.

GUNASENA, K. T. et al. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Hum Reprod**, v. 12, n. 1, p. 101-6, Jan 1997. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043912> >.

HASEGAWA, A. et al. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4 Suppl, p. 1182-92, Oct 2006. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963048> >.

HIRSHFIELD, A. N. Compensatory ovarian hypertrophy in the long-term hemicastrate rat: size distribution of growing and atretic follicles. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 2, p. 271-278, March 1, 1983 1983. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/28/2/271.abstract> >.

ISACHENKO, V. et al. Comparison of in vitro- and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32549, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479331> >.

ISACHENKO, V. et al. Effective method for in-vitro culture of cryopreserved human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**, England, v. 13, n. 2, p. 228-234, 2006. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=16895638&lang=pt-br&site=ehost-live> >.

ISACHENKO, V. et al. Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture. **Cryobiology**, v. 66, n. 3, p. 233-238, 6// 2013. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122401300028X> >.

IUCN. The Red List of IUCN 2015. 2015. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/> >. Acesso em: 12/04/2015.

JENSEN, A. K.; KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, C. Y. Chapter 7 - Ovarian Tissue Cryopreservation for Fertility Preservation. In: ANDERSON, R. A. e SPEARS, N. (Ed.). **Cancer Treatment and the Ovary**. Boston: Academic Press, 2015. p.93-107. ISBN 978-0-12-801591-9.

JEWGENOW, K. et al. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 33-39, 1997 1997. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/9404269> >.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J Reprod Fertil**, v. 112, n. 1, p. 39-47, Jan 1998. ISSN 0022-4251 (Print)
0022-4251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538328> >.

JEWGENOW, K. et al. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. **International Zoo Yearbook**, v. 45, n. 1, p. 124-132, 2011. ISSN 1748-1090. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1090.2010.00124.x> >.

JORIO, A.; MARIANA, J. C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 26, n. 3, p. 239-250, 1991/12/01 1991. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209190050A> >.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reprod Biomed Online**, v. 18, n. 4, p. 568-77, Apr 2009. ISSN 1472-6491 (Electronic) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401001> >.

KROHN, P. L. Transplantation of the Ovary. In: (Ed.). **The Ovary**: Elsevier Science, v.II, 2013. cap. 3, p.101-128. ISBN 9781483259758.

LEE, D. M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 137-138, 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/428137a> >.

LEONEL, E. C. R. **Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas**. 2013. 80 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília

LERMEN, D. et al. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1030-1033, 2009. ISSN 1365-294X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x> >.

LIMA, A. K. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1664-6, Oct 2006. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530815> >.

LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 605-611, March 1, 2002. Disponível em: < <http://humrep.oxfordjournals.org/content/17/3/605.abstract> >.

MACEDO, M. F. D.; BEZERRA, M. B.; VICENTE, W. R. R. Transplante ovariano: aplicações na reprodução de animais domésticos, silvestres e humanos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

MARTINEZ-MADRID, B. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 5, p. 1390-1394, 11// 2004. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028204022630> >.

SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432010003830> >.

SANTOS, R. R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 4 Suppl, p. 1455-8, Apr 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722611> >.

SCHIOCHET, F. et al. Ovário-histerectomia laparoscópica em uma gata com fetos mumificados – relato de caso. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 563-564, 2007.

SONGSASEN, N. et al. The domestic dog and cat as models for understanding the regulation of ovarian follicle development in vitro. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47, n. Suppl 6, p. 13-18, 2012. ISSN 0936-6768 1439-0531. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579211/> >.

SWANSON, W. F. Research in Nondomestic Species: Experiences in Reproductive Physiology Research for Conservation of Endangered Felids. **ILAR Journal**, v. 44, n. 4, p. 307-316, January 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/44/4/307.abstract> >.

TORRENTS, E. et al. Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 5, p. 471-481, September 1, 2003 2003. Disponível em: < <http://humupd.oxfordjournals.org/content/9/5/471.abstract> >.

VAN EYCK, A.-S. et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 5, p. 1676-1685, 3/15/ 2010. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001502820901070X> >.

VANACKER, J. et al. Transplantation of an alginate–matrigel matrix containing isolated ovarian cells: First step in developing a biodegradable scaffold to transplant isolated preantral follicles and ovarian cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6079-6085, 9// 2012. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212005327> >.

VARGA, J.; BRENNER, D.; PHAN, S. H. **Fibrosis Research: Methods and Protocols**. Humana Press, 2005. ISBN 9781592599400. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=tuJcCEVaLYUC> >.

WIEDEMANN, C.; ZAHMEL, J.; JEWGENOW, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 37, 2013. ISSN 1746-6148 (Electronic) 1746-6148 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433001> >.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira etapa do trabalho, foram realizados cultivo de tecido ovariano felino fresco *in vitro* e em CAM para determinar se estes métodos são adequados para avaliar a eficácia da criopreservação de tecido ovariano, visto que o CIV ainda não está bem estabelecido para esta espécie e o CAM ainda não havia sido testado. Os resultados indicaram que esses sistemas não foram adequados para o cultivo de tecido ovariano fresco, portanto, também não seriam eficazes para a avaliação da criopreservação, uma vez que o tecido criopreservado geralmente sofre danos que serão expressos somente após um período em atividade após o descongelamento. Desta forma, os transplantes permanecem como uma alternativa mais viável para avaliar a criopreservação.

Na segunda etapa do trabalho, foi realizado autotransplante de tecido ovariano felino para avaliar a eficiência da criopreservação. Os resultados mostraram que a sobrevivência folicular após criopreservação e transplante foi muito baixa, provavelmente devido à junção das injúrias causadas pela criopreservação com os danos provocados pelo período de isquemia-reperusão do tecido nos primeiros dias de transplante. Porém, foi possível observar a revascularização do tecido e o desenvolvimento de dois folículos antrais aos 28 dias pós-transplante, mostrando que é possível haver desenvolvimento folicular de tecido transplantado após a criopreservação. Para isso, devem ser otimizadas tanto as técnicas de criopreservação quanto de transplante do tecido ovariano felino.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, o cultivo em CAM não parece promissor para tecido ovariano de felinos, mas o cultivo *in vitro* pode ser otimizado para melhor desenvolvimento dos folículos ovarianos de gatas e para avaliação do tecido após criopreservação. Para isso, podem ser testadas outras substâncias no meio de cultivo, como a ativina-A, o bFGF, o GDF-9 e outros fatores de crescimento que já se mostraram eficientes em outras espécies; também podem ser estudados sistemas de CIV em 3-D com matrizes em gel.

O processo de criopreservação ainda não foi bem estabelecido em felinos. Os protocolos utilizados hoje são os mesmos para diversas espécies e os felinos possuem diferentes características de foliculogênese que podem influenciar nos resultados encontrados. Por isso, a otimização do protocolo de criopreservação deve ser estudada, sendo observadas as diferenças entre as espécies para melhores resultados. Podem ser testados outros crioprotetores em diferentes concentrações e curvas de congelamento.

As técnicas de transplante também podem ser otimizadas, considerando a alteração dos locais para transplante e da própria técnica cirúrgica. Também é importante conhecer o período de isquemia-revascularização, o que pode ser feito pelo estudo dos primeiros 7 dias de transplante. Posteriormente, estudar a aplicação de drogas que favoreçam a vascularização e reduzam o período de isquemia do tecido transplantado pode ser interessante para a otimização do protocolo de transplante após a criopreservação.