



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



**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE
ERITROPOIETINA NO AUTO-TRANSPLANTE
HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO
CRIOPRESERVADO DE GATAS DOMÉSTICAS**

Cecibel María León Félix

Dissertação de Mestrado

Brasília-DF

2019



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



**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE
ERITROPOIETINA NO AUTO-TRANSPLANTE
HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO
CRIOPRESERVADO DE GATAS DOMÉSTICAS**

Cecibel María León Félix

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

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

Dissertação de Mestrado

Brasília-DF

2019

Dedicado está dissertação à minha família, especialmente a minha mãe Alicia Elvira Félix Romero (*in memoriam*) e a minha irmã Lizbet. Também, a meu pai Dante José León Rosales e meus irmãos Dante David e Josué Alexander.

AGRADECIMENTO

Quero agradecer a todas as pessoas que fizeram possível o presente trabalho. Especialmente a minha assessora Carolina Madeira Lucci pela oportunidade e a confiança para desenvolver o mestrado. Além da orientação no desenvolvimento deste trabalho e a amizade brindada durante o processo. Também a minha irmã Lizbet pela oportunidade de realizar o mestrado e o apoio durante o processo.

Esta dissertação está dedicado a minha mãe Alicia Elvira Félix Romero (*in memoriam*), e à minha irmã Lizbet. Também, à meu pai Dante José León Rosales e meus irmãos Dante David e Josué Alexander. Ao Marco António Rodriguez Martinez e Jesús Enrique Turín Vilca. Os quais foram peças fundamentais durante meu crescimento pessoal e profissional, e aos que amo.

Agradeço à Liudimila Passos Gonçalves, Ana Bárbara Rocha Silva e Marcelle dos Santos Lemos pelo apoio durante as cirurgias no desenvolvimento do presente trabalho.

À Marcella Motta da Costa pela ajuda durante tudo o processo e a amizade ao longo do presente trabalho.

À José Luiz Jivago de Paula Rôlo pelo apoio nas ultrassonografias no decorrer deste trabalho.

Ao professor Rodrigo de Souza Amaral, do Instituto Federal do Amazonas-IFAM, pelo apoio no processamento de dosagem hormonal do presente trabalho. Também, ao professor Osmindo Rodrigues Pires Júnior e à professora Mônica Pereira Garcia, ambos da Universidade de Brasília, pela disponibilidade dos equipamentos.

Às alunas Larissa Vitória Uliana, Ana Lara de Oliveira, Carolina Leme de Azevedo, Júlia Alves Luz, Adyla Cristina Nunes Damasceno e Gabriela Herminio Matos pelo apoio nas diferentes etapas do presente trabalho e a amizade.

À Fernanda Paulini Juliana Lis Mendes de Brito e Vanessa Nicolau de Lima pela amizade brindada.

Agradeço ao CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUÇÃO	13
II. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. FOLICULOGÊNESE	15
2.2. REPRODUÇÃO FELINA	17
Ciclo estral.....	17
2.3. CRIOPRESERVAÇÃO	18
Criopreservação no tecido ovariano de felino.....	20
2.4. TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO	21
2.5. ERITROPOIETINA (EPO)	23
Estrutura	23
Mecanismo de ação	24
2.6. ERITROPOIETINA NO TECIDO OVARIANO	26
III. JUSTIFICATIVA	27
IV. OBJETIVOS	27
Objetivo geral:	27
Objetivos específicos:	27
V. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1. Animais experimentais	28
5.2. Protocolo anestésico e cirurgia	28

5.3. Desenho Experimental.....	29
5.4. Protocolo de congelamento e descongelamento.....	30
5.5. Microscopia de luz	31
5.6. Avaliação do efeito da EPO nos parâmetros hematológicos.....	33
5.7. Avaliação do comportamento de cio	33
5.8. Análise Estatística	33
VI. RESULTADOS	33
VII. DISCUSSÃO	48
VIII. CONCLUSÃO	52
IX. REFERÊNCIAS	53
X. Anexo 1.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da eritropoietina (disponível em: <www.eritropeyetina.com>).24
- Figura 2. Localização dos implantes. Imagem de uma gata em decúbito ventral com 6 fragmentos transplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço (autotransplante heterotópico).29
- Figura 3. Esquema da aplicação de EPO no grupo tratado. D = dias de tratamento, EPO = Eritropoietina (via subcutânea, dose: 500 UI/Kg), OSH = Ovariohisterectomia, T = transplante.30
- Figura 4. Curva de congelamento lento utilizada.31
- Figura 5. Tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Grupo tratado com EPO (A, B, C, D, F, G) e animal controle (H). Tecido ovariano fresco (A) e tecido ovariano criopreservado antes do transplante (B) com folículos morfologicamente normais (seta); dias 7 (C), 49 (G) e 63 (H) pós-transplante com folículos morfologicamente normais; dias 14 (D), 21 (E) e 28 (F) pós-transplante com “Follicle-like structures” (cabeça de seta). Barra = 100µm.36
- Figura 6. As principais degenerações encontradas no tecido ovariano fresco (A) e criopreservado (B, C, D) com coloração Hematoxilina Eosina. Folículos primordial e folículo em crescimento morfologicamente normal (A); folículo primordial com ovócito parcialmente descolado da membrana granulosa (B); folículo primordial com ovócito totalmente descolado da membrana granulosa (C); ovócito retraído (C). Seta indica folículo primordial e a cabeça da seta indica folículo em crescimento. Barra = 50µm.39
- Figura 7. “Follicle-like structures” (seta) no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Dia 28 pós-transplante no animal controle (A) e no grupo tratado com EPO (B). Barra = 100 µm.....41
- Figura 8. Células inflamatórias no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Animal placebo no dia 7 pós-transplante (A) e grupo tratado com EPO no dia 28 pós-transplante (B).

Seta branca indica células inflamatórias mononucleares e seta laranja indica células gigantes (B). Barra = 50, 100µm.	42
Figura 9. Visão geral do processo inflamatório no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Animal controle (A, C) e grupo tratado com EPO (B, D). Dia 7 (A, B), 14 (C, D) pós-transplante. Barra = 200µm.	42
Figura 10. Vasos sanguíneos no tecido ovariano do grupo tratado com EPO no dia 28 pós-transplante (A) com coloração Hematoxilina Eosina. Seta preta indica capilar, seta branca indica vaso sanguíneo de pequeno calibre, seta laranja indica vaso sanguíneo de médio calibre, seta verde indica vaso sanguíneo de grande calibre. Barra = 200µm.	44
Figura 11. Visão geral do tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina indicando os vasos sanguíneos (seta). Animal controle (A, C, E, G, I) e no grupo tratado com EPO (B, D, F, H, J). Dia 7 (A, B), 14 (C, D), 28 (E, F), 49 (G, H) e 63 (I, J) pós-transplante. Barra = 400µm.	45
Figura 122. Histologia de tecido ovariano (grupo tratado com EPO) com coloração tricotômica de Gomori. (A) tecido ovariano fresco; (B) tecido ovariano criopreservado antes do transplante; dias 7 (C), 14 (D), 21 (E), 28 (F), 49 (G) e 63 (H) pós-transplante. Os pontilhados delimitam o tecido ovariano após o transplante, o cor verde indica as fibras colágenas. Barra = 400µm. ..	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características morfométricas dos folículos pré-antrais de gatas.....	15
Tabela 2. Método de classificação do processo inflamatório (em +) no tecido ovariano:	32
Tabela 3. Método de classificação da presença de vasos sanguíneos (em +) no tecido ovariano	32
Tabela 4. Método de classificação da área (em +) ocupada por tecido conjuntivo no tecido ovariano: 33	
Tabela 5. Número de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem de folículos morfológicamente normais encontrados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (não recebeu EPO) (n=1).	34
Tabela 6. Número (Média ± DP) de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem (média ± DP) de folículos morfológicamente normais encontrados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no grupo tratado com EPO (n=4).	35
Tabela 7. Número (somatório) de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem de folículos morfológicamente normais (calculada a partir do somatório) achados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO. 38	
Tabela 8. Número total de folículos degenerados (Média ± DP) e porcentagem dos três principais tipos de degenerações observados no tecido fresco, tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.....	40
Tabela 9. Número de “Follicle-like structures” (FLS) encontrados no tecido pós-transplantado no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.....	41
Tabela 10. Classificação da intensidade (em +) de processo inflamatório observado no tecido pós-transplantado no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.	43
Tabela 11. Classificação da presença (em +) de vasos sanguíneos no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO. 43	
Tabela 12. Classificação da área (em +) ocupada por tecido conjuntivo no tecido ovariano fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO	46

LISTA DE ABREVIACOES

ACPs – Crioprotetores

BFU-E - Burst Forming Unit Erythroid

CFU-E - Colony Forming Unit Erythroid

DMSO – dimetilsulfoxido

EG - Etilenoglicol

EPO - Eritropoietina

FeLV - Vírus da leucemia felina

FIV - Vírus da imunodeficiência felina

FLS - Follicle-like structures

FMN – Folículo morfologicamente normal

HIF - Fator induzível por hipóxia

IUCN - União Internacional para Conservao da Natureza e Recursos Naturais

Jak - Janus quinases

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PROH - propanodiol

rEPO – Receptor de eritropoietina

SDF-1 - Fator derivado de células do estroma-1

SOD - Superóxido dismutase

STATs - Signal transducers and activators of transcription

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFC - Fator de crescimento do endotélio vascular - C

RESUMO

A criopreservação e transplante de tecido ovariano são métodos que permitem a conservação de gametas femininos. No entanto, no processo de transplante há um período inicial de isquemia que afeta a sobrevivência e o desenvolvimento dos folículos, o que é especialmente prejudicial para os tecidos criopreservados. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da eritropoietina (EPO) em tecido ovariano de gata criopreservado e autotransplantado para um sítio periférico. Para isso, cinco gatas adultas (n=5) foram utilizadas. Quatro delas foram tratadas com EPO (500 UI/Kg/dia, sc) durante sete dias (três dias antes, no mesmo dia e três dias após a ovariectomia) e uma delas não recebeu EPO (controle). Todas as gatas foram submetidas a ovariectomia e pequenos fragmentos de tecido ovariano foram retirados e criopreservados (congelamento lento com 1,5M DMSO). Após 3 dias, os tecidos ovarianos foram descongelados e transplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço da mesma gata de origem (autotransplante heterotópico). Os enxertos foram retirados após 7, 14, 21, 28, 49 e 63 dias, processados para histologia e corados com hematoxilina-eosina e tricômico de Gomori. O número de folículos morfolologicamente normais após a criopreservação do tecido ovariano, tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO, apresentou uma redução significativa. No dia 7 pós-transplante, as porcentagens de folículos primordiais morfolologicamente normais foram de 45,1% (32/71) no animal controle e de 86% (54/63) no grupo tratado com EPO. Do dia 14 em diante, muito poucos folículos foram encontrados no tecido transplantado. Não obstante, nos dias 28, 49 e 63 pós-transplante ainda foram observados alguns folículos morfolologicamente normais. O grupo tratado com EPO apresentou “follicle-like structures” em todos os dias pós-transplante avaliados, e em maior número em comparação com o animal controle, exceto no dia 28 pós-transplante. O processo inflamatório foi menor no grupo tratado com EPO nos dias 7 e 14 pós-transplante. Vasos sanguíneos foram observados em todos os dias após o transplante, mas nos dias 7, 14 e 63 pós-transplante o grupo tratado com EPO apresentou uma maior quantidade de vasos sanguíneos. O grupo tratado com EPO apresentou menor área de fibrose no córtex do tecido ovariano, nos dias 7, 49 e 63 pós-transplante. Em conclusão, a EPO permitiu obter uma melhor sobrevivência folicular, uma maior vascularização e menor área de fibrose no dia 7 pós-transplante, não obstante, a morte folicular massiva foi mantida nos outros dias de transplante do tecido criopreservado.

Palavras-chave: Ovário, eritropoietina, criopreservação, felinos, folículos pré-antrais.

ABSTRACT

Ovarian tissue cryopreservation and transplantation are methods that allow the conservation of female gametes. However, in the process of transplantation there is an initial period of ischemia, which affects the survival and development of the follicles, which is especially deleterious for cryopreserved tissues. The objective of the present study is to evaluate the effect of erythropoietin (EPO) in cat ovarian tissue cryopreserved and autografted to a peripheral site. Five adult cats (n=5) were used. Four of them were treated with EPO (500 UI/Kg/day, Sc) during seven days (three days before, on the same day and three days after the ovariectomy), and the other one cat received no medication. All cats were submitted to ovariectomy and small pieces of ovarian tissue were taken and cryopreserved (slow freezing with 1.5M DMSO). After 3 days, the ovarian tissue pieces were thawed and transplanted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck of the same cat (autografting). The grafts were removed after 7, 14, 21, 28, 49 and 63 days and processed for histology and stained with hematoxylin-eosin and Gomori's trichrome. The number of morphologically normal follicles after cryopreservation of ovarian tissue in both sham-animal and EPO-treated group showed a significant reduction. Day 7 post-transplantation, the percentage of morphologically normal primordial follicles were 45.1 % (32/71) in the sham-animal and 86% (54/63) in the EPO-treated group. From the 14th day onwards, very few follicles were found in the transplanted tissue. However, on days 28, 49 and 63 post-transplantation, a few morphologically normal follicles were still observed. The EPO-treated group showed follicle-like structures in all post-transplant days evaluated, and in greater numbers in compared to sham-animal, except on day 28 post-transplant. The inflammatory process was lower in the EPO-treated group on days 7 and 14 post-transplantation. Blood vessels were observed every day after transplantation, but on days 7, 24 and 63 post-transplantation the EPO-treated group showed amount of blood vessels. The EPO-treated group had a lower area of fibrosis in the ovarian cortex on day 7, 49 and 63 post-transplantation. In conclusion, EPO allowed a better follicular survival a greater vascularization and a more area of fibrosis on day 7 post-transplantation. However, massive follicular death was maintained on the other day of cryopreserved tissue transplantation.

Keywords: Ovary, erythropoietin, cryopreservation, felines, preantral follicles.

I. INTRODUÇÃO

A população de felinos selvagens está diminuindo devido às atividades humanas (caça, comércio ilegal, etc.) e à destruição do seu habitat natural pela ação do homem ou da natureza. A família *Felidae* é integrada por 38 espécies de felinos selvagens e uma espécie de felino doméstico. De acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais de 2018 (IUCN¹) das 38 espécies de felinos selvagens, 5 encontram-se classificadas como ameaçadas de extinção, 13 como vulneráveis, 7 como quase ameaçadas e 13 em estado pouco preocupante. No Brasil, os felinos selvagens como o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), onça-pintada (*Panthera onca*), onça-parda (*Puma concolor*) estão na categoria de vulnerável, enquanto os felinos jaguarundi (*Puma yagouarondi*) e o gato-do-mato (*Leopardus trigrinus*) estão na categoria de ameaçada de extinção.

Em resposta à ameaça de extinção das espécies selvagens, medidas diretas estão sendo realizadas como a prevenção das invasões e destruições de seus habitats naturais e aplicação de técnicas de reprodução assistidas como a criopreservação de gametas e embriões. A criopreservação permite a conservação de germoplasma para um uso imediato ou futuro na recuperação dos animais selvagens.

Os felinos selvagens e os gatos domésticos têm uma relação filogenética próxima, o que permite que as características morfológicas, biológicas e fisiológicas sejam semelhantes (O'Brien & Johnson, 2005). Isso torna os gatos domésticos modelos biológicos ideais para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida (como por exemplo protocolos de criopreservação de gametas e gônadas, inseminação artificial, produção de embriões) (Wiedemann *et al.*, 2012) a serem usadas em felinos selvagens.

Atualmente, os trabalhos de investigação em transplante de tecido ovariano fresco ou criopreservação em gatas vêm apresentando resultados positivos na recuperação da funcionalidade do ovário (Gosden *et al.*, 1994; Bosch *et al.*, 2004; Leonel *et al.*, 2018b). Além disso, Wiedemann *et al.* (2012) trabalhou com xenotransplante de ovário criopreservado de leões obtendo também bons resultados, possibilitando que no futuro seja possível desenvolver melhores protocolos em criopreservação e transplante do tecido ovariano com a finalidade de obter descendência das espécies selvagens em perigo de extinção ou extintos.

¹ Link de acesso: <http://www.iucnredlist.org>, acesso em 05/11/2018

No entanto, no período inicial após o transplante sem anastomose vascular ocorrem danos isquêmicos no tecido ovariano, que leva a uma perda considerável de folículos no tecido (Liu *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2004; Ishijima *et al.*, 2009; Hirayama *et al.*, 2011; Commin *et al.*, 2012; Vilela, 2016). Por essa razão, pesquisas com diferentes medicamentos ou hormônios estão sendo realizadas para reduzir o período de isquemia inicial após o transplante (Nugent *et al.*, 1998; Karaca *et al.*, 2009; Soleimani *et al.*, 2011; Sayyah - Melli *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Mahmoodi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Kulusari *et al.*, 2017). A hipótese deste trabalho é que o hormônio glicoproteico eritropoietina reduz o tempo em que os vasos sanguíneos são formados após o transplante e conseqüentemente o tecido ovariano de gata criopreservado e autotransplantado apresentará um menor dano e retomará a funcionalidade.

II. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. FOLICULOGÊNESE

Os ovários das gatas estão localizados na parte alta e dorsal da região lombar na cavidade abdominal (Konig e Liebich, 2011). A unidade funcional do ovário são os folículos, que desempenham a função de liberação de ovócito (exócrina) e esteroidogênese (endócrina) (Hafez e Hafez, 2004). A parte central do ovário, denominada medula ou zona vascular, é composta por tecido conjuntivo fibroelástico, vasos sanguíneos e nervos. A parte externa do ovário, denominada córtex ou zona parenquimatosa, é onde se encontram os folículos ovarinos, corpos lúteos e corpos albicans (Hafez e Hafez, 2004), onde acontece a foliculogênese.

A foliculogênese compreende a multiplicação e diferenciação das células somáticas do folículo primordial a folículo antral, mantendo o ovócito imaturo no processo. Os folículos são categorizados em folículos pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) (Tabela 1) e antrais (folículo terciário) (Carrijo *et al.*, 2010). No ovário fresco de gata, a população de folículos pré-antrais foi estimada em $37,853 \pm 6,118$ dos quais 87% são folículos primordiais, 10,4% folículos primários e 2,3% folículos secundários (Carrijo *et al.*, 2010).

Tabela 1: Características morfométricas dos folículos pré-antrais de gatas.

Tipos de Folículos	Diâmetro Folicular	Diâmetro Ovócito	Diâmetro do núcleo	Número de Células da granulosa
Folículo primordial	$28,3 \pm 9,1 \mu\text{m}$	$23,1 \pm 7,2 \mu\text{m}$	$12,3 \pm 3,7 \mu\text{m}$	$6,5 \pm 1,5$
Folículo primário	$41,0 \pm 7,6 \mu\text{m}$	$30,1 \pm 4,7 \mu\text{m}$	$15,6 \pm 2,3 \mu\text{m}$	$13, 2 \pm 4,7$
Folículo secundário	$74,6 \pm 20,3 \mu\text{m}$	$40,8 \pm 13,4 \mu\text{m}$	$18,6 \pm 4,1 \mu\text{m}$	$46, 2 \pm 13,5$

Fonte: Carrijo *et al.*, 2010.

Os folículos primordiais apresentam um ovócito ovoide ou esférico com citoplasma homogêneo e um núcleo grande e excêntrico. Ademais, é contornado por uma camada de células da granulosa achatadas, pequenas e quiescentes (Carrijo *et al.*, 2010). Os folículos primários apresentam um ovócito esférico com características análogas aos folículos primordiais, contornado pela zona pelúcida e uma camada de células da granulosa cuboides (Carrijo *et al.*, 2010). Os folículos secundários apresentam um ovócito esférico revestido por uma zona pelúcida bem desenvolvida, e duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides (Carrijo *et al.*, 2010).

Os folículos antrais ou terciários apresentam uma cavidade ou antro, produto da acumulação do líquido folicular (Zamboni, 1974; Koeppen e Stanton, 2009). Possuem um

ovócito capaz de finalizar a meiose I, várias camadas de células da granulosa e células da teca (teca externa e teca interna) (Koeppen e Stanton, 2009). Nos folículos antrais, as células da granulosa se separam em duas classes de células devido ao crescimento do antro: células da granulosa murais, que ficam junto à lamina basal, e células do *cumulus* (*cumulus oophuros* ou *corona radiata*), que envolvem o ovócito (Zamboni, 1974; Koeppen e Stanton, 2009). As células da teca são originadas pelas células do tecido ovariano fetal ($Wt1^+$) e células do mesonefro ($Gli1^+$), por meio de fatores de crescimento provenientes do ovócito e das células da granulosa (Liu *et al.*, 2015).

A foliculogênese envolve dois processos no crescimento folicular: um processo inicial, de folículo primordial até a formação do antro no folículo, dependente de fatores parácrinos do ovário, e um processo final dependente das gonadotrofinas hipofisárias (hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)) que atuam em folículos terciários (Hafez e Hafez, 2004; Galina e Valencia, 2008; Guytan e Hall, 2011; Cunningham, 2014).

O crescimento folicular inicial é influenciado por membros da superfamília dos fatores de crescimento transformante- β (proteínas morfogenéticas ósseas, fator de crescimento-9, ativina-A, o próprio fator de crescimento transformante, etc.) (Galina e Valencia, 2008). Os sinais do crescimento folicular inicial são a transformação das células da granulosa de achatadas para cuboides, o crescimento do ovócito, proliferação das células da granulosa, e a diferenciação das células do estroma, que estão ao redor da lamina basal em células da teca (Galina e Valencia, 2008; Guytan e Hall, 2011; Cunningham, 2014). Nos gatos, a ativina-A atua como um fator importante no crescimento inicial do folículo (Bristol e Woodruff, 2004).

Conforme continua o crescimento dos folículos, a hipófise secreta uma quantidade progressivamente maior de FSH e LH. Sendo as concentrações de FSH maior do que LH ao começo do crescimento folicular dependente de gonadotrofinas, para depois começar a diminuir a concentração de FSH e aumentar de LH. Quando os folículos apresentam um antro, o crescimento se torna acelerado e dependente principalmente de FSH (Guytan e Hall, 2011; Cunningham, 2014). O FSH, por sua vez, gera uma multiplicação acelerada das células da granulosa e das células da teca e promove a formação de receptores para FSH nas células da granulosa e receptores de LH nas células da teca. Além disso, o FSH estimula a formação de 17β -estradiol e inibina pelo folículo.

O 17β -estradiol é produzido por uma ação conjunta de FSH e LH, no qual o LH induz a transformação de colesterol em testosterona pelas células da teca. A testosterona formada passa para as células da granulosa e, sob efeito do FSH, é transformada em 17β -estradiol

(Koeppen e Stanton, 2009; Cunningham, 2014). Esse 17β -estradiol estimula a proliferação das células da granulosa, gerando uma retroalimentação positiva sobre as mesmas (Cunningham, 2014).

Conforme o crescimento do folículo antral progride, as concentrações de estradiol e inibina são maiores gerando a diminuição da secreção de FSH (retroalimentação negativa). Isto faz com que o folículo com maior capacidade de se ligar ao FSH comece a crescer mais e bloqueie o crescimento de folículos menos desenvolvidos (Galina e Valencia, 2008; Guytan e Hall, 2011; Cunningham, 2014). Na fase final do desenvolvimento do folículo antral, o FSH e os estrógenos iniciam a formação de receptores de LH nas células da granulosa, enquanto a quantidade de receptores de FSH começa a diminuir (Cunningham, 2014).

O aumento na secreção de estrógeno pelo folículo antral finalmente gera o pico pré-ovulatório de LH (Cunningham, 2014), que por sua vez, promove a ovulação do folículo dominante e a formação do corpo lúteo. Enquanto a secreção de 17β -estradiol começa a cair antes da ovulação, a secreção de progesterona passa a aumentar (Galina e Valencia, 2008; Koeppen e Stanton, 2009; Guytan e Hall, 2011; Cunningham, 2014). As gatas requerem um estímulo neuro-mecânico durante o coito para gerar o pico de LH e assim produzir a ovulação induzida (Feldman e Nelson, 2004; Galina e Valencia, 2008).

2.2. REPRODUÇÃO FELINA

A etapa reprodutiva começa quando as gatas atingem 80% do peso adulto (2,3 – 3,2kg) e quando os dias tem mais horas de luz (fotoperíodo natural) ou mais de 10 horas de luz artificial (fotoperíodo artificial). Entretanto, algumas manifestam cio entre 5 a 12 meses (em média de 6 a 9 meses) (Feldman e Nelson, 2004). O ciclo estral das gatas se caracteriza por numerosos eventos de estro (poliétricas) em função da quantidade de luz (sazonal), e pela ovulação induzida pelo coito (Feldman e Nelson; 2004). No entanto, os gatos que habitam perto da linha do equador não apresentam sazonalidade devido aos dias mais longos durante todo o ano, o que gera baixas concentrações séricas de melatonina ($0,53 \pm 0,1$ ng/ml) (Stornelli, 2007), permitindo um período reprodutivo sem anestro sazonal.

Ciclo estral

O ciclo estral das gatas é constituído pelas fases de proestro, estro, interestro, diestro e anestro (Feldman e Nelson, 2004) e tem duração média de 2 a 3 semanas (Jemmett e Evans, 1977). O proestro é a fase na qual a gata atrai os machos sem, no entanto, se deixar cobrir, e dificilmente esta fase é identificada, devido à mudança sutil no comportamento. Tem uma duração de 0,5 a 2 dias e as manifestações comportamentais são de fricção da cabeça e do

pescoço contra objetos, vocalização contínua, rolamento e lordose, as quais estão associadas ao repentino aumento de 17 β -estradiol no plasma sanguíneo (> 40 pg/ml em menos de 24 a 48 horas) e ao desenvolvimento folicular rápido (<1 mm em proestro inicial até 1,5 mm no começo de estro) na fase folicular (Feldman e Nelson, 2004).

A mudança entre o proestro e o estro ocorre em aproximadamente 12 a 24 horas (Feldman e Nelson, 2004). O estro é a fase na qual a gata aceita a cópula e tem uma duração aproximada média de 7,5 dias (3 a 16 dias) com ou sem ovulação, e é possível confirmar pelo comportamento característico da gata ou níveis plasmáticos de 17 β -estradiol. Elas apresentam acentuada fricção da cabeça e pescoço, vocalização, rolamento, tentativa de escape do lar e urinam frequentemente. Além disso, em reação ao cobrimento do macho, mostram lordose com desvio da cauda para um lado e pisar com os membros posteriores. Tudo isso está associado a folículos de 2 a 3mm e concentração máxima de 17 β -estradiol (50 – 70 pg/ml) no plasma sanguíneo na fase folicular (Feldman e Nelson, 2004).

O interestro é a fase sucessiva ao estro sem ovulação e precedente o proestro. Se caracteriza por um comportamento normal do animal como resultado dos baixos níveis de 17 β -estradiol no plasma sanguíneo (<20pg/ml ou níveis basais) e uma duração média de 8 dias (2 a 19 dias), o que sugere inatividade ovariana de curto prazo (Feldman e Nelson, 2004).

O diestro é a fase lútea do ciclo estral, com níveis >1-2 pg/ml de progesterona no plasma sanguíneo como consequência da presença de corpo lúteo funcional 24 a 48 horas após uma ovulação, com uma duração de 35 a 37 dias (Feldman e Nelson, 2004). Como as gatas são animais de ovulação induzida, onde é necessário um estímulo mecânico (normalmente da cópula) para desencadear o reflexo neuro-endócrino da ovulação, esta fase normalmente só ocorre quando há o acasalamento.

A fase de anestro ocorre em áreas geográficas distantes da linha do equador, onde os dias são curtos e com menor quantidade de horas luz (<8h luz/dia) (Leyva *et. al.*, 1989). O anestro se considera como o período de inatividade ovariana prolongada, com níveis basais de 17 β -estradiol e progesterona no plasma sanguíneo (Feldman e Nelson, 2004).

2.3. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é uma técnica de congelamento em que a energia térmica se torna insuficiente para as reações químicas, permitindo deter o metabolismo celular. Isto é possível quando as células são conservadas a -196°C no nitrogênio líquido (McGee e Martin, 1962; Rubinsky, 2003).

Durante o congelamento, as células são submetidas a diferentes temperaturas onde ocorrem diferentes processos moleculares, como por exemplo: a -5°C , as células permanecem sem se congelar, devido aos crioprotetores presentes no meio, que permitem a redução da temperatura abaixo do ponto de congelação da água. Entre -5°C e -15°C , se formam cristais de gelo extracitoplasmáticos, devido à presença de um cristal nativo ou de forma espontânea. Ademais, o meio intracitoplasmático permanece sem se congelar e super-resfriado, provavelmente porque a membrana plasmática impede o desenvolvimento de cristais de gelo no citoplasma. A água super-resfriada intracitoplasmática possui um potencial químico superior ou energia livre superior que a extracitoplasmática parcialmente congelada, produzindo uma diferença de potenciais que faz fluir a água para fora da célula onde ela se congela (Mazur, 1984).

O processo de criopreservação pode ser realizado de dois métodos, isto é, congelamento lento ou vitrificação, que apresentaram diferentes eventos físicos (Mazur, 1984; Rubinsky, 2003). No congelamento lento, a célula perde água rapidamente, gerando um aumento na concentração de solutos intracitoplasmáticos, o que provoca a eliminação do super-resfriamento e o equilíbrio do potencial químico entre o meio intracitoplasmático e extracitoplasmático. Em conclusão, a célula experimenta desidratação e não formação de cristais de gelo intracitoplasmático na temperatura de nucleação. Por outro lado, na vitrificação a célula não perde água suficientemente rápido para manter o equilíbrio do potencial químico, o que gera maior super-resfriamento (Mazur, 1984). Em conclusão, a célula experimenta um estado vítreo sólido sem cristalização (Rubinsky, 2003).

Independentemente do método empregado, a adição de um agente crioprotetor (ACP) tem como objetivo manter a viabilidade e funcionalidade da célula ou tecido a temperaturas baixas. Os ACPs são substâncias hidrossolúveis e de baixa toxicidade que geram a diminuição no ponto de congelamento da célula, produzindo mais desidratação e menor concentração osmótica na célula (Avila-Portillo *et al.*, 2008).

Os ACPs podem ser classificados em intracelulares e extracelulares. Os ACPs intracelulares são moléculas de baixo peso molecular (Avila-Portillo *et al.*, 2008) que penetram na membrana plasmática substituindo parte da água intracelular e se ligando ao hidrogênio das moléculas de água, conseqüentemente, reduzindo a desidratação. Além disso, geram uma diminuição da concentração de solutos intracelulares através de ligações aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial da água (Rubinsky, 2003; Castro *et al.*, 2011). São exemplos, o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol (PROH) e o etilenoglicol (EG). Os ACPs extracelulares são moléculas de alto peso molecular que não penetram na membrana plasmática

e promovem a rápida desidratação celular. Exemplos destes são a sacarose, a glicose, a dextrose e o dextrano. Em geral, as moléculas dos ACPs formam pontes de hidrogênio, produzindo diminuição na formação de cristais de gelo. O glicerol e PROH, por exemplo, formam uniões de hidrogênio com a água através de seus grupos OH; o DMSO o faz através dos átomos de oxigênio (Avila-Portillo *et al.*, 2008).

Criopreservação no tecido ovariano de felino

Os diferentes protocolos de criopreservação de tecido ovarino felino confirmam que apesar de sofrer um mínimo dano durante o processo, é possível manter a morfologia e funcionalidade dos folículos do tecido após criopreservação. Bosch *et al.* (2004) empregou o método de congelamento lento com EG a 1,5 M como crioprotetor, e posteriormente xenotransplantou os fragmentos ovarianos de felino na cápsula renal de camundongo mostrando que o tecido criopreservado conserva a integridade morfológica e a capacidade de desenvolvimento folicular. Posteriormente, mais investigações foram feitas com o método de congelamento lento em tecido ovarino felino, como demonstram os seguintes pesquisadores. Lima *et al.* (2006) trabalhou com congelamento lento mas com dois diferentes crioprotetores (glicerol e EG a 1,5 M) conseguindo ao descongelamento dos fragmentos ovarianos 58% de folículos pré-antrais morfológicamente normais com EG e 39,3% com glicerol. Leonel *et al.* (2018a) comparou os efeitos de diferentes crioprotetores (DMSO a 1,5 M, EG a 1,5 M e DMSO a 0,75 M + EG a 0,75 M) no congelamento lento do fragmento de ovário de gata obtendo que o tecido criopreservado com DMSO a 1,5M apresentava similaridade ultraestrutural com o grupo controle, ao contrário dos outros grupos que apresentavam descolamento do ovócito das células da granulosa e outras características de degeneração celular. Tanpradit *et al.* (2015) investigou a sacarose (0,1 M e 0,3 M) como crioprotetor no congelamento lento do córtex do ovário de gata, demonstrando que a sacarose diminui a apoptose dos folículos primordiais e das células do estroma no fragmento ovariano, independentemente da concentração.

Também estão sendo feitas pesquisas com o método de vitrificação em tecido ovarino de felinos. Brito *et al.* (2016) vitrificou córtex de ovário de gato com solução RPMI (Roswell Park Memorial Institute) - 1640 + sacarose a 1 M com ou sem EG (10%, 20% ou 40%) obtendo resultados similares ao controle fresco ($89 \pm 4\%$) de folículos pré-antrais morfológicamente normais com o sem EG. Brito *et al.* (2018) testou duas soluções de crioprotetores (EG + trealose e EG + trealose + DMSO) em dois diferentes sistemas de vitrificação (fechado e aberto) com fragmentos de córtex do ovário de gato. Após a vitrificação, no cultivo *in vitro* dos fragmentos, foram observados 19% de desenvolvimento folicular normal e uma maior multiplicação das células da granulosa pelo sistema aberto de vitrificação com EG + trealose + DMSO. Embora

a vitrificação gere uma modificação na constituição da actina do ovócito, isso não evita que os ovócitos do tecido vitrificado retomem a meiose em cultivo *in vitro* (Luvoni *et al.*, 2012).

Em um trabalho comparando os dois métodos, o congelamento lento demonstrou uma viabilidade folicular de $63,28 \pm 7,91\%$ e a vitrificação de $35 \pm 5,0\%$ (Tanpradit e Chatdarong, 2011). Além disso, o congelamento lento apresentou 3,8% de apoptose em folículos primordiais e outro mostrou apoptose de $22,5 \pm 2,4$ de células do estroma (células por área), enquanto, a vitrificação apresentou 8,9% de apoptose em folículos primordiais e uma de apoptose $28,3 \pm 2,5$ de células do estroma (células por área) no tecido ovariano felino (Tanpradit *et al.*, 2015).

De modo geral, a criopreservação de tecido ovariano é um método promissor. De fato, já foram obtidos nascimentos em camundongos (Parrot, 1960), ovelhas (Salle *et al.*, 2002, 2003; Imhof *et al.*, 2006) e humanos (aproximadamente 100 filhos) (Anderson *et al.*, 2017) provenientes de tecido ovariano criopreservado pelo método de congelamento lento.

2.4. TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

O transplante se fundamenta na transferência de células, tecidos ou órgãos com o propósito de reconstituir sua funcionalidade. O transplante de ovário tem como alvo a preservação da função reprodutiva e endócrina da gônada (Bezerra *et al.*, 2012) com o fim de gerar descendentes do doador. Com o mesmo propósito, trabalhos de pesquisa estão sendo feitos com embrião e ovócito criopreservado, folículos isolados, tecido ovariano e na criação de ovário artificial em humanos (Anderson *et al.*, 2017; Donnez e Dolmans, 2017), paralelamente, em animais, estão sendo realizadas investigações com tecido ovariano (Wallin *et al.*, 2009; Hamed *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Eimani *et al.*, 2011; Milenkovic *et al.*, 2012; Wiedemann *et al.*, 2012; Leonel *et al.*, 2018b) e cultivo *in vitro* de folículos (Morahaku *et al.*, 2016).

O transplante recebe diferentes denominações de acordo com o doador e o receptor: auto (ambos são mesmo indivíduo), iso (indivíduos com o mesmo genoma ou gêmeos univitelinos), alo (indivíduos com diferentes genomas mas da mesma espécie) e xenotransplante (indivíduos de diferentes espécies) (Krohn, 1977). Além disso, há outra classificação segundo o lugar anatômico onde se coloca o transplante: ortotópico (quando o enxerto é colocado no sítio anatômica de origem) e heterotópico (quando é colocado em qualquer parte diferente da de origem) (Krohn, 1977).

O transplante do tecido ovariano fresco e/ou criopreservado já se mostrou uma técnica viável. O primeiro nascimento proveniente do transplante ortotópico de fragmento do tecido ovariano de camundongo foi reportado por Parrott em 1960. Salle *et al.* (2002, 2003) obtiveram

filhotes de ovelha de transplante ortotópico do córtex do ovário criopreservado e, posteriormente, Imhof *et al.* (2006) também conseguiu descendência de ovelha com transplante ortotópico do ovário inteiro criopreservado. O primeiro nascimento de um primata não-humano foi reportado por Lee *et al.* (2004), proveniente de um transplante heterotópico do córtex do ovário fresco, e o primeiro nascimento de um humano foi reportado por Donnez *et al.* (2004) proveniente do transplante ortotópico do córtex de ovário criopreservado. Anderson *et al.* (2017) reportam que já existem aproximadamente 100 bebês humanos nascidos do transplante de tecido ovariano criopreservado.

Apesar desses resultados animadores, o transplante gera uma grande perda folicular (Candy *et al.*, 1997; Ishijima *et al.*, 2009; Hirayama *et al.*, 2011). De 2 a 12 horas após o transplante acontece uma apreciável fragmentação de DNA de células na região medular do ovário, começando a diminuir às 72 horas (Liu *et al.*, 2002). Nas 48 horas depois do transplante, a expressão de mRNA do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é evidente nas células do ovário, originando a formação de vasos sanguíneos no tecido e possibilitando uma revascularização completa (Dissen *et al.*, 1994) e funcional nos 7 dias subsequentes ao transplante (Israely *et al.*, 2004) no ovário de rata. Também, Van Eyck *et al.* (2009) reportaram saturação de oxigênio significativo no dia 5 pós-transplante, obtendo o nível mais alto nos dias 10-14 após-transplante, e uma estabilização no dia 17 pós-transplante no tecido ovariano humano criopreservado e xenotransplantado no peritônio. Tudo isso comprova que o tecido transplantado passa por um processo de isquemia nas primeiras horas pós-transplante.

Durante o período de isquemia inicial após o transplante, a população folicular decresce em aproximadamente 90% em xenotransplante ortotópico de ovário de cadela (Commin *et al.*, 2012) e em xenotransplante heterotópico de ovário de gata criopreservado (Bosch *et al.*, 2004). Em alotransplante heterotópico de ovário fresco e criopreservado a população folicular é 58% e 49%, respectivamente (Liu *et al.*, 2002) o que confirma que a maior parte do dano ocorre no transplante e não no congelamento (Liu *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2004; Commin *et al.*, 2012) ou vitrificação (Ishijima *et al.*, 2009; Hirayama *et al.*, 2011).

Pesquisas feitas com ovário de gata confirmam que o tecido ovariano retoma o desenvolvimento folicular e a produção hormonal. Gosden *et al.* (1994) trabalharam com ovário fresco de gata e Bosch *et al.* (2004) com ovário criopreservado, que foram transplantados na cápsula do rim de camundongos. Nosso grupo de pesquisa mostrou que é eficaz o autotransplante heterotópico de tecido ovariano fresco de gata para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço ao verificar folículos pré-antrais e antrais na histologia do tecido transplantado, além de produção de estradiol e manifestação de cio nas gatas que receberam o

transplante (Leonel *et al.*, 2018b). No tecido ovariano criopreservado de gata, nosso grupo de pesquisa, reafirma que o tecido criopreservado após o transplante apresenta uma deficiência na recuperação total da funcionalidade ao sofrer uma importante perda folicular (Vilela, 2016).

Investigações estão sendo realizadas em tecido ovariano transplantado, com o objetivo de reduzir a lesão isquêmica que ocorre imediatamente após o transplante sem anastomose vascular. Alguns dos medicamentos ou hormônios que estão sendo testados com esse objetivo são: vitamina E (Nugent *et al.*, 1998), esfingosina 1-fosfato (Soleimani *et al.*, 2011), gonadotrofina da menopausa humana (Wang *et al.*, 2012), VEGF e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Wang *et al.*, 2013), sinvastatina e metilprednisolona (Lee *et al.*, 2015), angiotensina-2 e VEGF (Kong *et al.*, 2017) e eritropoietina (EPO) (Karaca *et al.*, 2009; Sayyah - Melli *et al.*, 2012; Mahmoodi *et al.*, 2014; Kolusari *et al.*, 2017).

2.5. ERITROPOIETINA (EPO)

A EPO é um hormônio glicoproteico produzido nos mamíferos adultos, principalmente nos rins, no endotélio dos capilares peritubulares, e em menor quantidade no fígado. Na vida fetal, sua principal função é hematopoiética (Fisher, 2003; Elliott *et al.*, 2008). Também é produzido no cérebro e outros tecidos, tendo função não hematopoiética. A EPO possui funções autócrina, parácrina e endócrina (Vittori *et al.*, 2016).

A função hematopoiética da EPO consiste em promover sobrevivência, diferenciação e proliferação das células progenitoras eritroides e evitar apoptose das células progenitoras e dos eritrócitos (Koury e Bondurant, 1990; Fisher, 2003).

Estrutura

A proteína secretada tem 165 aminoácidos duas (2) pontes dissulfeto que unem resíduos de cisteína (posição 7-161 e 29-33) (Wang *et al.*, 1985), quatro (4) cadeias de hidratos de carbono (três resíduos de N-glicosídicos unido a N-asparaginase (N-asparaginas) na posição 24,38 e 83, e um resíduo O-glicosídico unido a O-serina na posição 126) (Wen *et al.*, 1994). As cadeias laterais são compostas pelos monossacáridos manose, galactose, fructose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico ou siálico (Chamorro, 2014; Vittori *et al.*, 2016) (Figura 1). Sequências variáveis dos monossacáridos e dos ácidos siálicos das cadeias laterais de EPO conferem-lhe heterogeneidade (Vittori *et al.*, 2016).

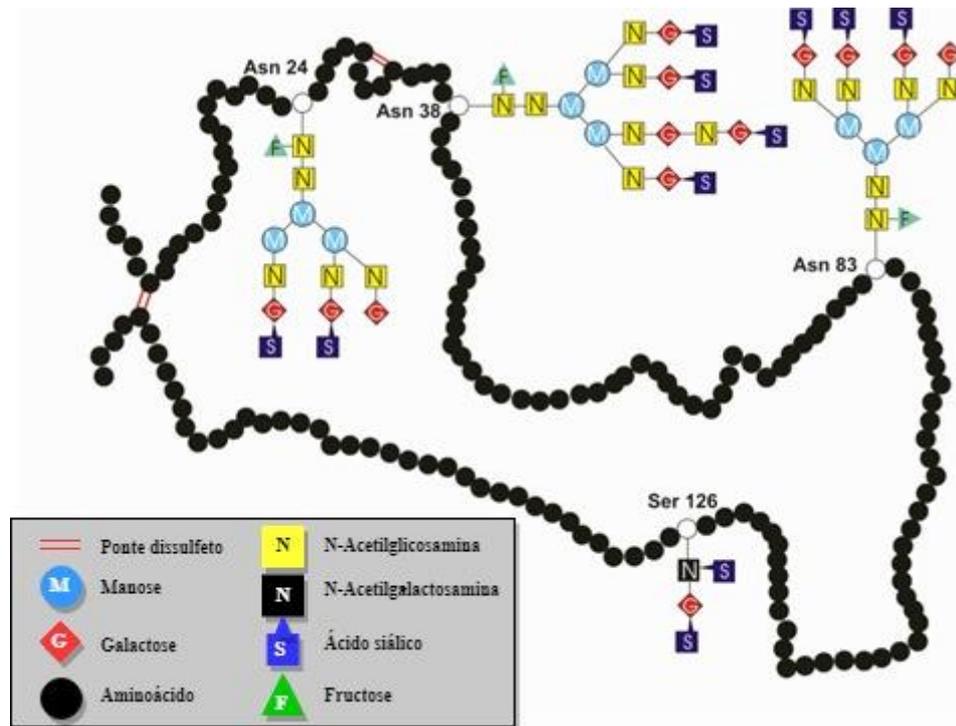


Figura 1. Estrutura da eritropoietina (disponível em: <www.eritropeyetina.com>).

Mecanismo de ação

Frente aos baixos níveis de oxigênio tissular, ocorre translocação do fator induzível por hipóxia (HIF- α) do citoplasma ao núcleo na célula produtora de EPO (Lacombe e Mayeux, 1998). No núcleo da célula produtora de EPO, o HIF- α se acopla à subunidade β (HIF- β), formando o heterodímero HIF-1. HIF-1 se acopla com o com outros fatores formando um complexo proteico que inicia a transcrição do gene da EPO (Iyer *et al.*, 1998).

Quando a EPO se une a seu receptor (rEPO), que está localizado na membrana celular, forma um homodímero com duas subunidades idênticas. A interação de EPO-rEPO ativa a via Jak-STAT que é formada pela quinase Jak 2 (Janus quinases), que está acoplada ao rEPO, e a STATs (*signal transducers and activators of transcription*). A Jak 2 ativada fosforila os oito resíduos de tirosina do domínio distal citoplasmático do rEPO, gerando sítios de ligação para proteínas de sinalização intracelular que tem domínios com homologia Src (SH2) como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase ativada por mitógenos e transdutor de sinais; e ativador da transcrição STAT5, dando lugar à expressão de diferentes genes (Chamorro, 2014; Vittori *et al.*, 2016).

No sistema hematopoiético. Na medula óssea, a EPO sintetizada atua cumprindo a função hematopoiética, que consiste em promover sobrevivência, diferenciação e proliferação

das células progenitoras eritroides: BFU-E (burst-forming unit erythroid) e CFU-E (colony-forming unit erythroid), principalmente, e nos descendentes imediatos (pro-eritroblastos) (Koury e Bondurant, 1990; Fisher, 2003; Chamorro, 2014; Vittori *et al.*, 2016). Ademais, evita a apoptose das células progenitoras e dos eritrócitos ao evitar a ruptura do DNA (Koury e Bondurant, 1990; Fisher, 2003). Quando as células eritroides se tornam mais velhas, vão perdendo os receptores para EPO até estes não estarem presente no eritrócito velho (Chamorro, 2014; Vittori *et al.*, 2016).

A EPO atua na proliferação de células eritroides mediante a ativação da via de sinalização PI3K/Akt, que controla a fosforilação do fator de transcrição FOXO3a, tendo como resultado a inibição da expressão do fator inibitório da proliferação celular p27^{kip1}, devido à retenção de FOXO3a no citoplasma através de sua união com as proteínas 14-3-3. Quando as proteínas p27^{kip1} estão fosforiladas no núcleo, são translocadas e retidas no citoplasma pelas proteínas 14-3-3 (Nakao *et al.*, 2008).

Em resumo, a nível hematopoiético, a EPO gera um aumento de células eritroides jovens e velhas na circulação sanguínea.

No sistema vascular. Células endoteliais vasculares apresentam receptores para EPO e as plaquetas, em resposta à EPO, aumentam sua produção de citocinas (VEGF e fator derivado de células do estroma-1 - SDF-1) (Kato *et al.*, 2012).

A hipóxia origina a expressão de EPO e VEGF gerando mobilização das células progenitoras endoteliais (Heeschen *et al.*; 2003), formadas pelas células CD34⁺ da medula óssea e sangue circulante nos adultos, que se proliferam e se diferenciam para iniciar a vasculogênese (durante a fase embrionária), enquanto as células endoteliais maduras são responsáveis pelo estímulo da angiogênese (durante a fase adulta) (Heeschen *et al.*; 2003).

A aplicação de EPO em uma área de isquemia, por exemplo no membro posterior, aumenta os níveis plasmáticos de VEGF e SDF-1 três dias depois da aplicação, gerando um aumento da concentração de capilares e do fluxo sanguíneo na área (Kato *et al.*, 2010).

2.6. ERITROPOIETINA NO TECIDO OVARIANO

A administração de EPO em autotransplante de ovário mostrou potencial angiogênico devido aos níveis séricos superiores do VEGF e o fator de crescimento do endotélio vascular - C (VEGFC) (Kolusari *et al.*, 2017). Além disso, houve uma pequena dilatação vascular no estroma do ovário (Karaca *et al.*, 2009), porém sem alteração acentuada no ovário à análise histopatológica (Karaca *et al.*, 2009; Kolusari *et al.*, 20017).

A EPO apresenta capacidade de reduzir o dano celular nas células da gônada feminina através do efeito antioxidante no ovário de ratos com isquemia/reperfusão, por meio da redução de mieloperoxidase e da isoforma induzível da óxido nítrico sintase, e pelo aumento da superóxido dismutase (SOD) (Karaca *et al.*, 2009). Sayyah-Melli *et al.* (2012) ratificaram o efeito antioxidante na reperfusão do tecido ovariano humano após a torção do ovário, mediante níveis mais elevados de SOD, glutathiona e antioxidantes totais. Também, Kolusari *et al.* (2017) confirmam o efeito antioxidante da EPO ao obter níveis maiores de catalase e glutathiona peroxidase. Além de tudo, a EPO tem capacidade de reduzir o estresse oxidativo mediante níveis mais baixos de malondialdeído e óxido nítrico (Sayyah-Melli *et al.*, 2012).

A administração de EPO (500 UI/Kg, i.p.) um dia antes até 7 dias depois do autotransplante do ovário fresco no músculo do camundongo possibilitou que Mahmoodi *et al.* (2014) obtivessem maior quantidade de folículos e corpos lúteos nas diferentes etapas, mínima taxa de morte celular e a uma maior produção de estradiol. Também, Kolusari *et al.* (2017) observaram um maior número de folículos antrais e níveis séricos de estradiol significativamente maior no autotransplante de ovário fresco de rata enxertado no subcutâneo com duas aplicações (no momento da cirurgia e 4 semanas depois) de EPO (5000 UI/Kg). No xenotransplante ortotópico de tecido ovariano canino vitrificado com tratamento de asialo EPO (400 UI/Kg) demonstrou uma taxa de sobrevivência 26,6% de folículos primordiais e 157,6% de folículos primários inicial, em comparação ao grupo sem tratamento de 2,3% e 10,1%, respectivamente (Suzuki *et al.*, 2008). Apesar dos bons resultados obtidos, Commin *et al.* (2012) reportaram uma perda folicular de 90% no período inicial do xenotransplante ortotópico de ovário de cadela criopreservado com administração de EPO (500 UI/Kg, s.c.) durante três dias consecutivos.

As pesquisas realizadas até agora com aplicação de EPO comprovam o potencial angiogênico e antioxidante desse hormônio no tecido. No transplante de tecido ovariano está proporcionando melhores resultados no desenvolvimento folicular e na produção de hormônios esteroides sexuais na maioria das investigações.

III. JUSTIFICATIVA

O gato doméstico é o protótipo biológico perfeito para melhorar e desenvolver técnicas de reprodução assistida para felinos selvagens que estão em perigo de extinção, graças ao fato de ambos compartilharem características morfológicas, biológicas e fisiológicas semelhantes devido à proximidade filogenética (O'Brien & Johnson, 2005).

Uma alternativa para garantir a recuperação endócrina e exócrina da gônada feminina é o transplante de tecido ovariano, dadas as limitações para realizar protocolos *in vitro* de desenvolvimento de tecido folicular. Leonel *et al.* (2018b) demonstraram a recuperação do desenvolvimento folicular, secreção de hormônios sexuais e manifestações de cio em gatas com autotransplante de tecido ovariano fresco para o tecido subcutâneo. No entanto, Vilela (2016) evidenciou uma deficiência na recuperação funcional do autotransplante do tecido ovariano criopreservado de gatas, e obteve uma enorme perda folicular já aos 7 dias pós-transplante. Entretanto, se sabe que nos primeiros dias após o transplante há uma incompleta revascularização, que gera isquemia no tecido e conseqüentemente perda folicular (Liu *et al.*, 2002; Hirayama *et al.*; 2011; Commin *et al.*; 2012).

Estudos já mostraram que a aplicação de EPO pode favorecer a revascularização e diminuir a morte folicular em tecido ovariano submetido a isquemia (Suzuki *et al.*, 2008; Hirayama *et al.*, 2011; Mahmoodi *et al.*, 2014; Kolusari *et al.*, 2017). Assim, a hipótese levantada neste trabalho, é que a administração de EPO pode melhorar a revascularização e minimizar os danos celulares do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado.

IV. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da EPO sobre de tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado.

Objetivos específicos:

- Avaliar o desenvolvimento folicular do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado, com ou sem a administração de EPO, por meio da avaliação histológica;
- Avaliar o efeito da EPO na vascularização do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado, com ou sem a administração de EPO, por meio da avaliação histológica;

- Avaliar o efeito da EPO no processo inflamatório do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado, com ou sem a administração de EPO, por meio da avaliação histológica;
- Avaliar o efeito da EPO na fibrose do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado, com ou sem a administração de EPO, por meio da avaliação histológica.

V. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília com a aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Protocolo nº 74 /2017).

5.1. Animais experimentais

Ao longo da investigação foram utilizadas 5 gatas (adultas jovens, hípidas e sem raça definida) provenientes de Centro de Controle de Zoonoses (DIVAL – Diretoria de Vigilância Ambiental – Brasília – DF). Todas as gatas foram testadas para descartar que fossem portadoras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da leucemia felina (FeLV), e vermifugadas no momento da transferência para o biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. No biotério, permaneceram por um período de adaptação de 1 mês com acompanhamento clínico, para assegurar que estivessem saudáveis no momento da cirurgia e também após os transplantes. Durante o período da pesquisa, os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentados com ração seca comercial, conforme suas necessidades corporais, e água fresca *ad libitum*. Após período de adaptação, os animais foram submetidos à ovariectomia (OSH) bilateral, inserção e retirada dos fragmentos ovarianos.

5.2. Protocolo anestésico e cirurgia

As gatas foram mantidas em jejum por 12 horas antes de realizar o protocolo anestésico para a OSH bilateral, inserção ou retirada dos fragmentos ovarianos. Para a ovariectomia o protocolo anestésico foi realizado do seguinte modo: pré-anestesia com quetamina (4 mg/kg) e xilazina (0,4 mg/kg), ambas por via intramuscular, indução anestésica com propofol (dose/efeito, via intravenosa), e manutenção anestésica inalatória com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100%. Ademais, receberam tratamento profilático com antibiótico (cefalotina 25mg/kg dose única) e anti-inflamatório (meloxicam 0,1 mg/kg) pela via intravenosa, previamente à cirurgia. A técnica cirúrgica da OSH bilateral foi feita conforme descrito por Fossum (2007).

Os procedimentos cirúrgicos para inserção e retirada dos fragmentos ovarianos foram feitos com o seguinte protocolo anestésico: indução anestésica com propofol (dose/efeito, via intravenosa), manutenção anestésica inalatória com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% e tratamento profilático com dipirona (25 mg/kg, via intravenosa).

5.3. Desenho Experimental

Os animais (N = 5) do experimento foram divididos em dois grupos e submetidos à OSH bilateral (conforme descrito acima). De cada ovário foram obtidos quatro fragmentos do córtex medindo 2 x 2 x 5 mm cada, tendo no total oito fragmentos de tecido ovariano dos dois ovários. Um fragmento foi imediatamente fixado em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas (D0-controle fresco) e os outros sete fragmentos foram criopreservados (conforme descrito abaixo). Três dias depois, os fragmentos foram descongelados, dos quais um foi imediatamente fixado em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas (D0-controle crio) e os outros seis fragmentos foram transplantados no tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço (autotransplante heterotópico) (Leonel *et al.*, 2018b) (Figura 2). Antes dos transplantes, as gatas receberam uma única dose de vitamina E (5mg/Kg, intramuscular).

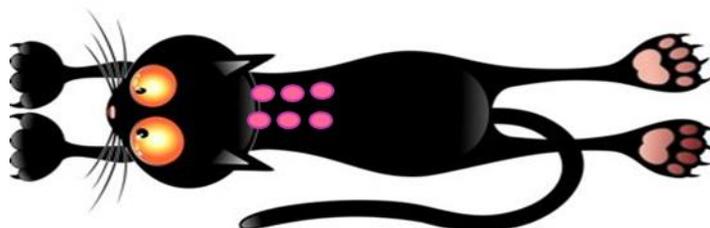


Figura 2. Localização dos implantes. Imagem de uma gata em decúbito ventral com 6 fragmentos transplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço (autotransplante heterotópico).

- **Grupo tratado com EPO:** (n=4), as gatas receberam 500 UI/kg de EPO (Hemax Eritron alfaepotina, Biosintética) por via subcutânea durante 7 dias consecutivos (três dias antes da OSH, no dia da OSH e três dias após a OSH), a última aplicação ocorrendo no dia do transplante (Figura 3).
- **Animal controle (sem EPO):** (n=1), foi efetuado o transplante dos fragmentos congelados/descongelados de acordo com o descrito abaixo, com a diferença de não receber EPO.

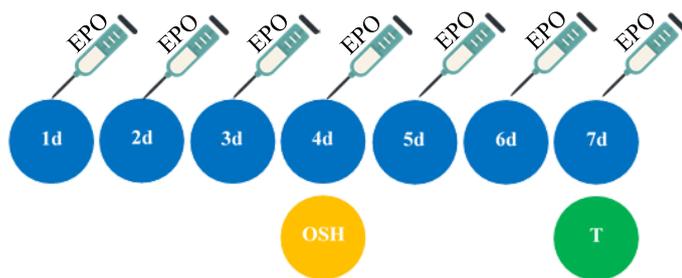


Figura 3. Esquema da aplicação de EPO no grupo tratado. D = dias de tratamento, EPO = Eritropoietina (via subcutânea, dose: 500 UI/Kg), OSH = Ovariohisterectomia, T = transplante.

Cada fragmento implantado de tecido ovariano foi retirado nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 pós-transplante (Leonel *et al.*, 2018b) de cada gata, no grupo tratado com EPO e no animal controle.

5.4. Protocolo de congelamento e descongelamento

O protocolo de criopreservação descrito por Leonel *et al.* (2018a) foi empregado nesta investigação. Cada fragmento foi colocado em um criotubo contendo 1 mL de meio de congelamento, a saber: meio M-199 acrescido com sacarose a 0,4%, soro fetal bovino a 10% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 1,5M. Os criotubos foram equilibrados a 10 °C durante 10 minutos e em seguida transferidos ao equipamento de congelamento programável (*Dominium K - Biocom*), onde foram resfriados a -2 °C/min até -7 °C. A -7 °C foi induzida a cristalização (*seeding*), e a partir daí as tubos foram resfriados a -0,3 °C/min. até -35 °C (Figura 4), quando foram submersos em nitrogênio líquido (-196 °C) e mantidos até o momento dos transplantes.

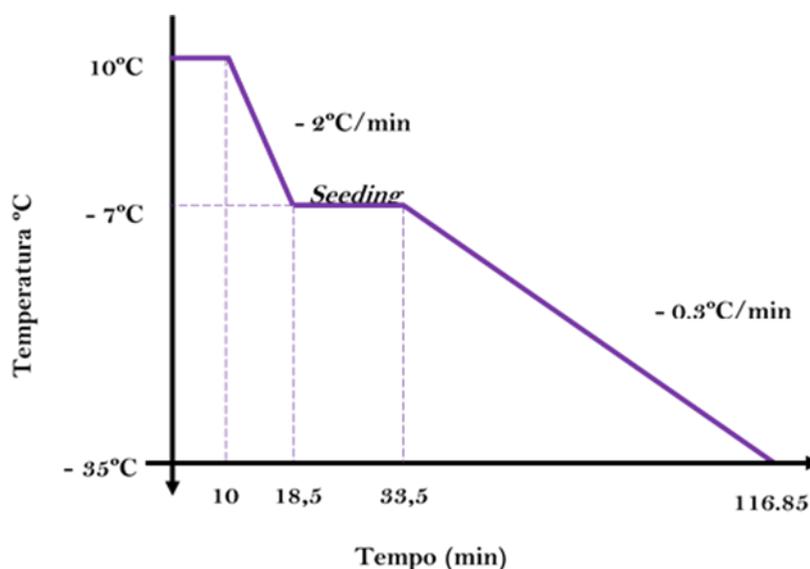


Figura 4. Curva de congelamento lento utilizada.

Transcorridas 72 horas de armazenamento, as amostras foram descongeladas. Cada criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e mantido por 1 minuto à temperatura ambiente, para depois ser colocado em banho-maria (37 °C). Quando o descongelamento estava completo, foram realizados 3 banhos consecutivos (5 min cada) em M-199 com 10% SFB e concentrações decrescentes de sacarose (0,4%, 0,2% e 0%) e DMSO (0,75M, 0,375M e 0M). Finalizado o descongelamento, um fragmento foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4% (D0-controle crio) e os outros 6 fragmentos foram lavados em solução de iodo 1% e em solução salina 0,9% antes de serem transplantados (conforme já descrito acima).

5.5. Microscopia de luz

As amostras de tecido ovariano (fresco, criopreservado ou recuperado após o transplante) para avaliação histológica foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% durante 48 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e três banhos de 100%) de 45 min. cada, clarificadas em três banhos de xilol de 45 min. Cada e infiltradas com Paraplast, em três banhos de 1 hora cada um. Em seguida, as amostras foram postas em moldes de silicone, que estavam preenchidos com Paraplast, e mantidas à temperatura ambiente para seu endurecimento. Cada amostra foi completamente cortada (5 µm de espessura) seriadamente, e 1 a cada 5 cortes foi montado em lâmina de vidro e corado com Hematoxilina Eosina (HE). Também foram retirados aleatoriamente 3 cortes (do início, do meio e do final de cada bloco), que foram montados e corados com Tricrômico de Gomori.

Para coloração HE, os cortes foram desparafinados (com três banhos de xilol), reidratados (banhos decrescentes em álcool de 100%, 90%, 80%, 70% e finalmente água) e

corados com Hematoxilina Eosina; com a finalidade de classificar e contar os folículos morfológicamente normais (FMN) e os folículos degenerados encontrados em cada fragmento do tecido ovariano. Se considerou FMN quando apresentava uma distribuição uniforme das células da granulosa e um ovócito esférico. Folículos degenerados quando apresentavam desorganização das células da granulosa, aumento do citoplasma das células da granulosa, ovócito descolado da membrana da granulosa (parcialmente ou totalmente), ovócito retraído, ovócito com muitos vacúolos no citoplasma, ovócito com núcleo picnótico, folículos totalmente degenerados e folículos descolado do estroma. Também com a coloração de HE foi avaliado o processo inflamatório (Tabela 2) e os vasos sanguíneos (Tabela 3) no tecido ovariano após o transplante.

Tabela 2. Método de classificação do processo inflamatório (em +) no tecido ovariano:

Classificação	Observado
+	poucas células inflamatórias mononucleares
++	muitas células inflamatórias mononucleares
+++	muitas células inflamatórias mononucleares e poucas células gigantes
++++	muitas células inflamatórias mononucleares e muitas células gigantes
+++++	muitas células gigantes

Tabela 3. Método de classificação da presença de vasos sanguíneos (em +) no tecido ovariano

Classificação	Observado
+	poucos capilares
++	muitos capilares e poucos vasos de médio calibre
+++	muitos capilares e muitos vasos de médio calibre
++++	muitos capilares e muitos vasos de médio calibre e poucos vasos de grande calibre
+++++	muitos capilares e muitos vasos de médio calibre e muitos vasos de grande calibre

Para a coloração tricromática de Gomori, os cortes foram desparafinados (com três banhos de xilol), reidratados (banhos de álcool de 100%, 90%, 80%, 70%) e fixados na solução de Bouin por uma hora na estufa (60 °C). Passado esse tempo, os cortes foram lavados em água corrente, até ficarem claros, e em água destilada. Em seguida, foram corados na solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos, lavados em água corrente e água destilada. Posteriormente foram corados na solução de Gomori por 20 minutos, mergulhados quatro vezes em ácido acético, e enxaguados em água corrente e água destilada. Finalmente foram desidratados, passados por xilol e montados. A colocação tricromática de Gomori foi utilizada para avaliar a área ocupada por tecido conjuntivo no tecido ovariano após o transplante, sendo as fibras colágenas coradas em verde, de acordo com os critérios expostos na tabela 4.

Tabela 4. Método de classificação da área (em +) ocupada por tecido conjuntivo no tecido ovariano:

Classificação	Achado
+	0-20% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
++	20-40% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
+++	40-60% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
++++	60-80% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
+++++	80-100% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo

5.6. Avaliação do efeito da EPO nos parâmetros hematológicos

Foram coletadas amostras de sangue com o objetivo fazer um acompanhamento do efeito da EPO nas células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) e na função renal, para monitorar possíveis efeitos colaterais da EPO. As amostras foram coletadas um dia antes de começar a administração da EPO e no quarto e sétimo dia da administração de EPO e enviadas para exames de hemograma completo, proteína plasmática total e dosagem de creatinina.

5.7. Avaliação do comportamento de cio

Após os transplantes e durante 63 dias, os animais foram observados diariamente com o objetivo de observar qualquer manifestação de comportamento de cio. Os comportamentos considerados foram a acentuada fricção da cabeça e pescoço, vocalização e rolamento contínuos, lordose, desvio da cauda para um lado e pisar com os membros posteriores.

5.8. Análise Estatística

As porcentagens de folículos morfologicamente normais e degenerados foram comparadas entre os grupos e os dias pós-transplante. Os dados foram submetidos à comparação de médias mediante o Teste de Qui-quadrado, considerando-se diferenças significativas quando $P < 0,05$.

VI. RESULTADOS

Durante todo o experimento, os fragmentos estavam palpáveis superficialmente e todos foram recuperados. De forma geral, os fragmentos transplantados do grupo tratado com EPO estavam aderidos ao tecido subcutâneo e vascularizados, com exceção de um (no dia 7) que não estava vascularizado. Nos dias 28, 49 e 63 pós-transplante alguns fragmentos estavam envoltos por tecido conjuntivo, formando uma cápsula que delimitava o fragmento do tecido subcutâneo. No animal controle, os fragmentos transplantados também estavam aderidos e vascularizados

como no grupo EPO. No dia 14 pós-transplante, no animal controle, o fragmento transplantado estava envolto por tecido conjuntivo.

No total, foram contados e classificados 25208 folículos pré-antrais, dos quais 98% eram primordiais e 2% em crescimento. O número de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem de folículos morfolologicamente normais em cada classe encontrados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (que não recebeu EPO) e no grupo tratado com EPO são mostrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. De modo geral, tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO, o número de folículos pré-antrais, especialmente primordiais, identificados no tecido fresco e no tecido criopreservado mas não transplantado foi alto. No entanto, após o transplante, alguns folículos primordiais foram encontrados no dia 7 e muito poucos a partir dos 14 dias pós-transplante. Com relação aos folículos morfolologicamente normais, há uma diminuição grande no tecido criopreservado não transplantado comparado ao tecido fresco. Já no dia 7 pós-transplante, a porcentagem de folículos primordiais morfolologicamente normais foi maior que no tecido criopreservado não transplantado, no entanto, poucos folículos foram encontrados no total. Fotos representativas do tecido ovariano fresco e criopreservado antes e após transplante são apresentadas na Figura 5.

Tabela 5. Número de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem de folículos morfolologicamente normais encontrados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (não recebeu EPO) (n=1).

	Folículos Primordiais			Folículos em Crescimento			Folículos Pré-antrais (Primordiais + Crescimento)		
	Total	MN	%MN	Total	MN	%MN	Total	MN	%MN
D0-Fresco	1644	1325	80.6	25	24	96.0	1669	1349	80.8
D0-Crio	935	242	25.9	15	10	66.7	950	252	26.5
D7	71	32	45.1	4	0	-	75	32	42.7
D14	0	0	-	0	0	-	0	0	-
D28	13	6	46.1	0	0	-	13	6	46.1
D49	0	0	-	0	0	-	0	0	0
D63	14	8	57.1	0	0	-	14	8	57.1

EPO: Eritropoietina; MN: Morfolologicamente normal.

Tabela 6. Número (Média ± DP) de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem (média ± DP) de folículos morfolologicamente normais encontrados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no grupo tratado com EPO (n=4).

	Folículos Primordiais			Folículos em Crescimento			Folículos Pré-antrais (Primordiais + Crescimento)		
	Total	MN	%MN	Total	MN	%MN	Total	MN	%MN
D0-Fresco	2735 ± 3779	2380 ± 3480	79.18 ± 8	61 ± 42	44 ± 32	69.86 ± 16	2796 ± 3798	2424 ± 3504	78.58 ± 8
D0-Crio	2750 ± 3473	889 ± 795	41.56 ± 15	56 ± 44	29 ± 36	40.61 ± 22	2806 ± 3515	918 ± 829	41.17 ± 14
D7	15.7 ± 25.5	13.5 ± 23.1	58.89 ± 40	0.25 ± 0.50	0	-	16 ± 24	13 ± 23	54.72 ± 40
D14	0	0		0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.5	-	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	-
D21	0.25 ± 0.5	0		0	0	-	0.25 ± 0.50	0	-
D28	0.25 ± 0.5	0.25 ± 0.5		0	0	-	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	-
D49	2 ± 4	2 ± 4	100.00	0.25 ± 0.50	0	0	2.25 ± 4	2 ± 4	100 ± 71
D63	0	0		0	0	-	0	0	-

EPO: Eritropoietina; MN: Morfolologicamente normal.

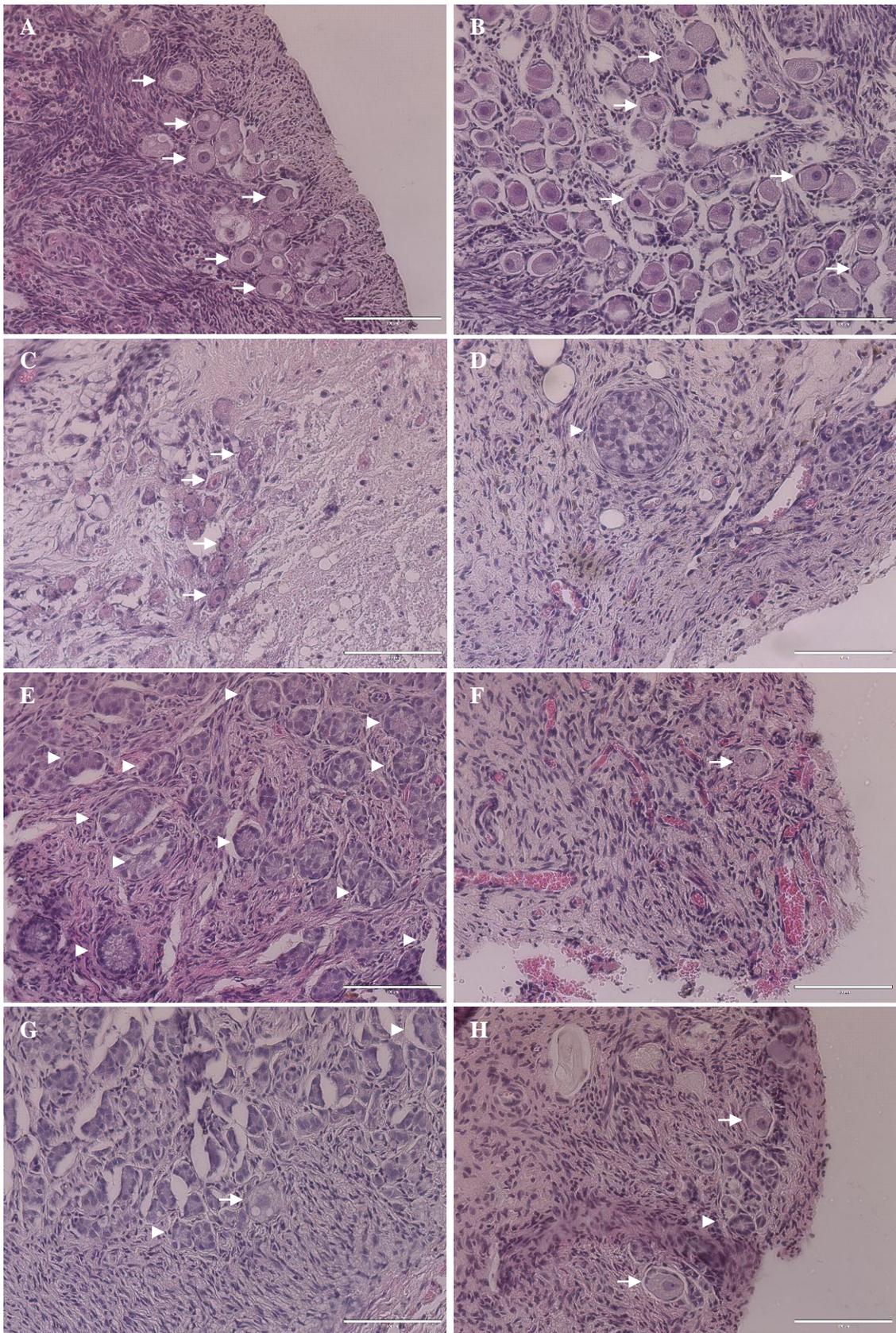


Figura 5. Tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Grupo tratado com EPO (A, B, C, D, F, G) e animal controle (H). Tecido ovariano fresco (A) e tecido ovariano criopreservado antes do transplante (B) com folículos morfologicamente normais (seta); dias 7 (C), 49 (G) e 63 (H) pós-transplante com folículos morfologicamente normais; dias 14 (D), 21 (E) e 28 (F) pós-transplante com “Follicle-like structures” (cabeça de seta). Barra = 100 μ m.

Para analisar estatisticamente os dados, a porcentagem de folículos MN foi calculada a partir do somatório dos folículos identificados nos 4 animais tratados (ao invés da média). Estes dados estão apresentados na Tabela 7.

A porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais e em crescimento) morfológicamente normais do tecido fresco para o tecido criopreservado mas não transplantado teve uma redução significativa ($P < 0.05$), tanto no animal controle e no grupo tratado com EPO. A porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo EPO nos dias 7 pós-transplante em comparação ao animal controle. No dia 28, apesar de ter sido observada uma diferença estatística entre o grupo tratado com EPO e o animal controle, esta diferença é pouco importante, uma vez que muito poucos folículos foram encontrados no total. É importante ressaltar que foram encontrados 8 folículos primordiais morfológicamente normais no dia 49 no grupo tratado com EPO e outros 8 no dia 63 no animal controle.

As degenerações encontradas no tecido ovariano foram desorganização das células da granulosa, aumento do citoplasma das células da granulosa, ovócito descolado da membrana da granulosa (parcialmente ou totalmente), ovócito retraído, ovócito com muitos vacúolos no citoplasma, ovócito com núcleo picnótico, folículo totalmente degenerado e folículo descolado do estroma. As degenerações mais comuns são mostradas na Figura 6 e as porcentagens de cada uma delas para animal controle e o grupo tratado com EPO são apresentadas na Tabela 8. Tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO, as degenerações aumentaram do tecido fresco para o tecido criopreservado mas não transplantado. No entanto, após o transplante o animal controle apresentou maior número de folículos com degenerações, especialmente no dia 7 pós-transplante.

Tabela 7. Número (somatório) de folículos primordiais e em crescimento e a porcentagem de folículos morfológicamente normais (calculada a partir do somatório) achados no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.

Tratamento	Dia	Folículos Primordiais			Folículos em Crescimento			Folículos Pré-antrais (Primordiais + Crescimento)		
		Total	MN	% MN	Total	MN	% MN	Total	MN	% MN
Animal Controle (sem EPO) (n=1)	D0 - Fresco	1644	1325	80,6 ^A	25	24	96,0 ^A	1669	1349	80,8 ^A
	D0 - Crio	935	242	25,9 ^B	15	10	66,7 ^B	950	252	26,5 ^B
	D7	71	32	45,1 ^C	4	0	-	75	32	42,7 ^C
	D14	0	0	-	0	0	-	0	0	-
	D28	13	6	46,1 ^D	0	0	-	13	6	46,1 ^D
	D49	0	0	-	0	0	-	0	0	-
	D63	14	8	57,1 ^E	0	0	-	14	8	57,1 ^E
Grupo EPO (n=4)	D0 - Fresco	10942	9521	87 ^A	244	177	72 ^{A*}	11186	9698	87 ^A
	D0 - Crio	11001	3557	33 ^B	224	117	52 ^{B*}	11225	3674	33 ^B
	D7	63	54	86 ^{A*}	1	0	0 ^C	64	54	84 ^{C*}
	D14	0	0	-	1	1	100 ^D	1	1	100 ^D
	D21	1	0	0 ^C	0	0	-	1	0	0 ^E
	D28	1	1	100 ^{D*}	0	0	-	1	1	100 ^{D*}
	D49	8	8	100 ^D	1	0	0 ^C	9	8	89 ^{AC}
D63	0	0	-	0	0	-	0	0	-	

ABCDE – Letras diferentes indicam diferença significativa entre os dias pós-transplante dentro do mesmo grupo de tratamento.

* - Indica diferença significativa entre os tratamentos dentro do mesmo dia pós-transplante.

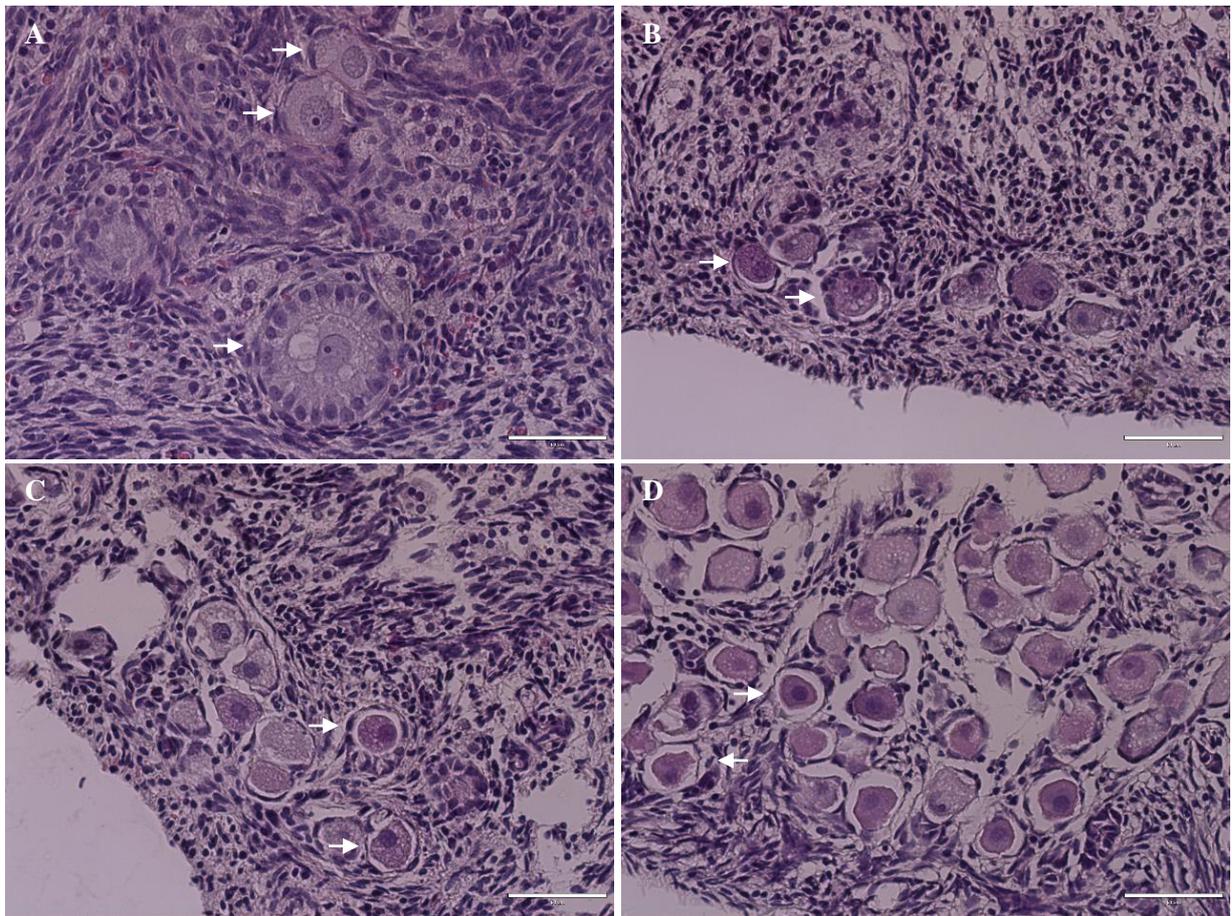


Figura 6. As principais degenerações encontradas no tecido ovariano fresco (A) e criopreservado (B, C, D) com coloração Hematoxilina Eosina. Folículos primordial e folículo em crescimento morfológicamente normal (A); folículo primordial com ovócito parcialmente descolado da membrana granulosa (B); folículo primordial com ovócito totalmente descolado da membrana granulosa (C); ovócito retraído (C). Seta indica folículo primordial e a cabeça da seta indica folículo em crescimento. Barra = 50µm.

Tabela 8. Número total de folículos degenerados (Média ± DP) e porcentagem dos três principais tipos de degenerações observados no tecido fresco, tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.

Tratamento	Dia	Número Folículos Degenerados	Ovócitos Totalmente Descolado (%)	Ovócitos Parcialmente Descolado (%)	Ovócito Retraído (%)
Animal Controle (sem EPO) (n=1)	D0-Fresco	320	2,2	94,3	3,1
	D0-Crio	698	18	46,4	34,9
	D7	43	2	79,1	11,6
	D14	0	0	0	0
	D28	7	43	57	0
	D49	0	0	0	0
	D63	6	0	50	50
Grupo EPO (n=4)	D0-Fresco	363 ± 292	0,7 ± 0,8	48,1 ± 12,2	14,2 ± 2,9
	D0-Crio	1888 ± 2711	2,1 ± 0,7	77,1 ± 14,9	16,6 ± 10,8
	D7	2 ± 2	25 ± 50	62,5 ± 47,9	0
	D14	0	0	0	0
	D21	0	0	0	0
	D28	0	0	0	0
	D49	0,2 ± 0,50	0	0	0
D63	0	0	0	0	

EPO = eritropoietina.

Também, foram encontradas no tecido ovariano após o transplante estruturas foliculares, que apresentavam células da granulosa justapostas com ausência do ovócito (Figura 7), denominadas “follicle-like structures” (FLS), que não foram vistas no tecido não transplantado e não foram consideradas como degenerações. Estas estruturas foram contadas e seu número no tecido ovariano após o transplante é apresentado na Tabela 9. O grupo tratado com EPO apresentou FLS em todos os dias pós-transplante avaliados, e em maior número em comparação com o animal controle, exceto no dia 28 pós-transplante.

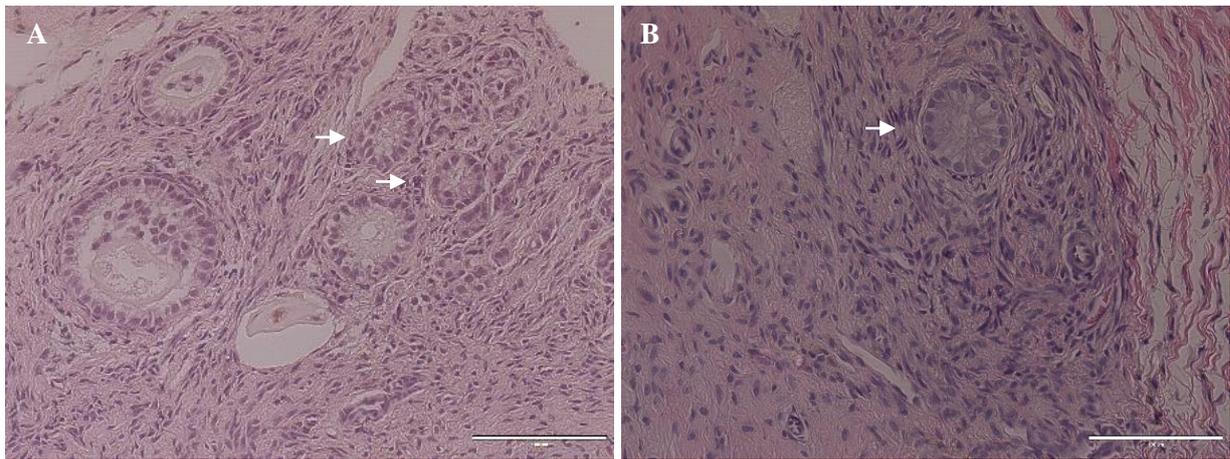


Figura 7. “Follicle-like structures” (seta) no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Dia 28 pós-transplante no animal controle (A) e no grupo tratado com EPO (B). Barra = 100 μ m.

Tabela 9. Número de “Follicle-like structures” (FLS) encontrados no tecido pós-transplantado no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.

	D7	D14	D21	D28	D49	D63
Animal controle	0	7	-	363	1	166
Grupo EPO	120 \pm 130	122 \pm 98	273 \pm 260	108 \pm 82	225 \pm 261	188 \pm 134

EPO = eritropoietina.

O processo inflamatório (Figuras 8 e 9) foi menor no grupo tratado com EPO em comparação ao animal controle nos dias 7 e 14 pós-transplante e igual em ambos os grupos nos dias 28 e 49 pós-transplante. O processo inflamatório diminuiu no dia 63 pós-transplante no animal controle em comparação ao grupo tratado com EPO (Tabela 10). A presença de vasos sanguíneos foi aumentando progressivamente no tecido transplantado, tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO, mas nos dias 7, 14 e 63 pós-transplante o grupo tratado com EPO apresentou uma maior quantidade de vasos sanguíneos em comparação ao animal controle (Tabela 11). Imagens ilustrativas dos vasos sanguíneos observados no tecido transplantado, tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO são mostradas nas Figuras 10 e 11.

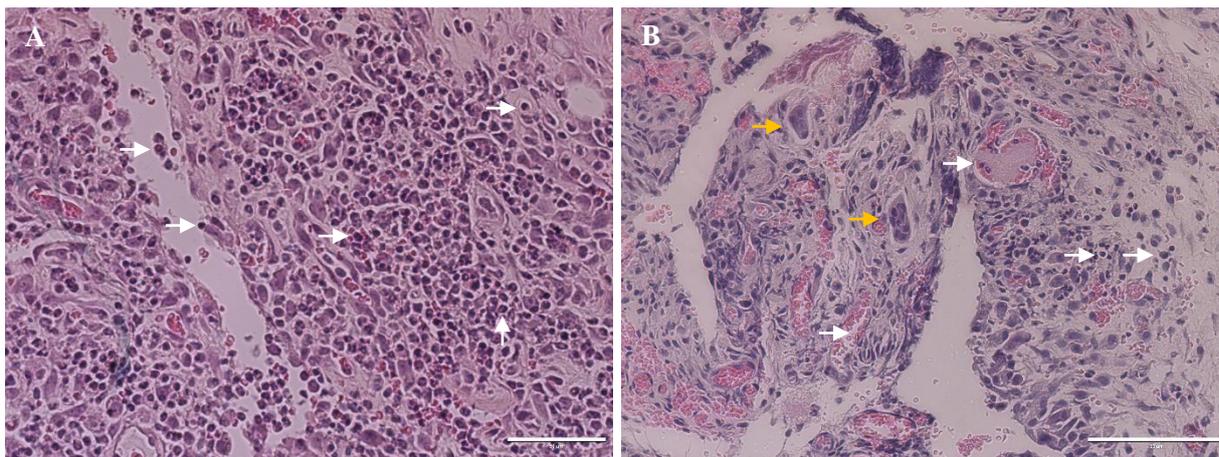


Figura 8. Células inflamatórias no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Animal placebo no dia 7 pós-transplante (A) e grupo tratado com EPO no dia 28 pós-transplante (B). Seta branca indica células inflamatórias mononucleares e seta laranja indica células gigantes (B). Barra = 50, 100 μ m.

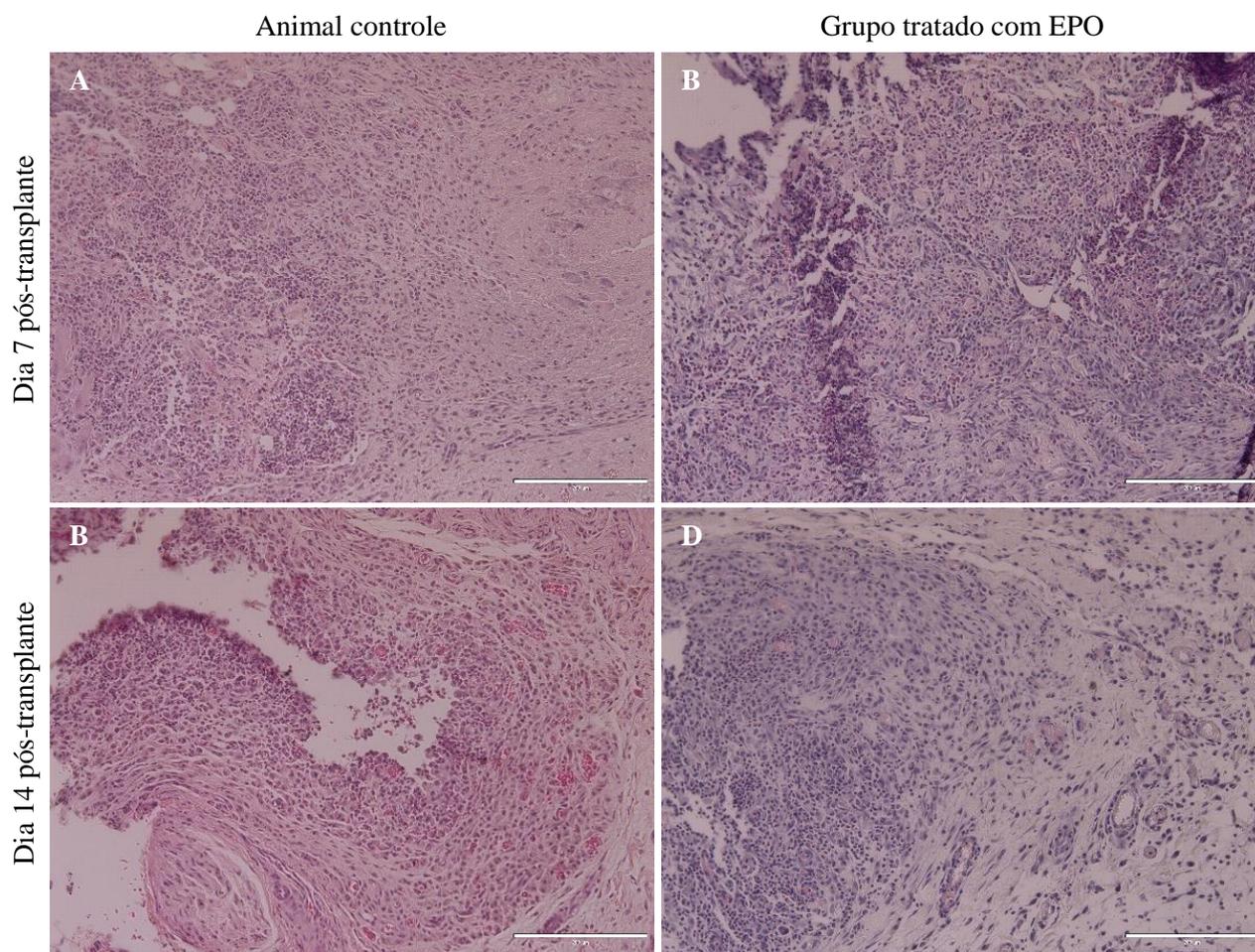


Figura 9. Visão geral do processo inflamatório no tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina. Animal controle (A, C) e grupo tratado com EPO (B, D). Dia 7 (A, B), 14 (C, D) pós-transplante. Barra = 200 μ m.

Tabela 10. Classificação da intensidade (em +) de processo inflamatório observado no tecido pós-transplantado no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.

	D0-Fresco	D0-Crio	D7	D14	D21	D28	D49	D63
Animal controle	0	0	++++	++++	-	+++	++	+
Grupo EPO	0	0	++	+++	+++	+++	++	++

0 – ausência de processo inflamatório; + presença de poucas células inflamatórias mononucleares, ++ presença de muitas células inflamatórias mononucleares, +++ presença de muitas células inflamatórias mononucleares e poucas células gigantes, ++++ presença de muitas células inflamatórias mononucleares e muitas células gigantes, +++++ presença muitas células gigantes.

- Fragmento perdido.

EPO = eritropoietina.

Tabela 11. Classificação da presença (em +) de vasos sanguíneos no tecido fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO.

	D0-Fresco	D0-Crio	D7	D14	D21	D28	D49	D63
Animal controle	+	+	++	++	-	+++	+++	++++
Grupo EPO	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	+++

+ presença de poucos capilares; ++ presença de muitos capilares e poucos vasos de médio calibre; +++ presença de muitos capilares e muitos vasos de médio calibre; ++++ presença de muitos capilares e poucos vasos de médio calibre e poucos vasos de grande calibre; +++++ presença de muitos capilares e poucos vasos de médio calibre e muitos vasos de grande calibre.

- Fragmento perdido.

EPO = eritropoietina.

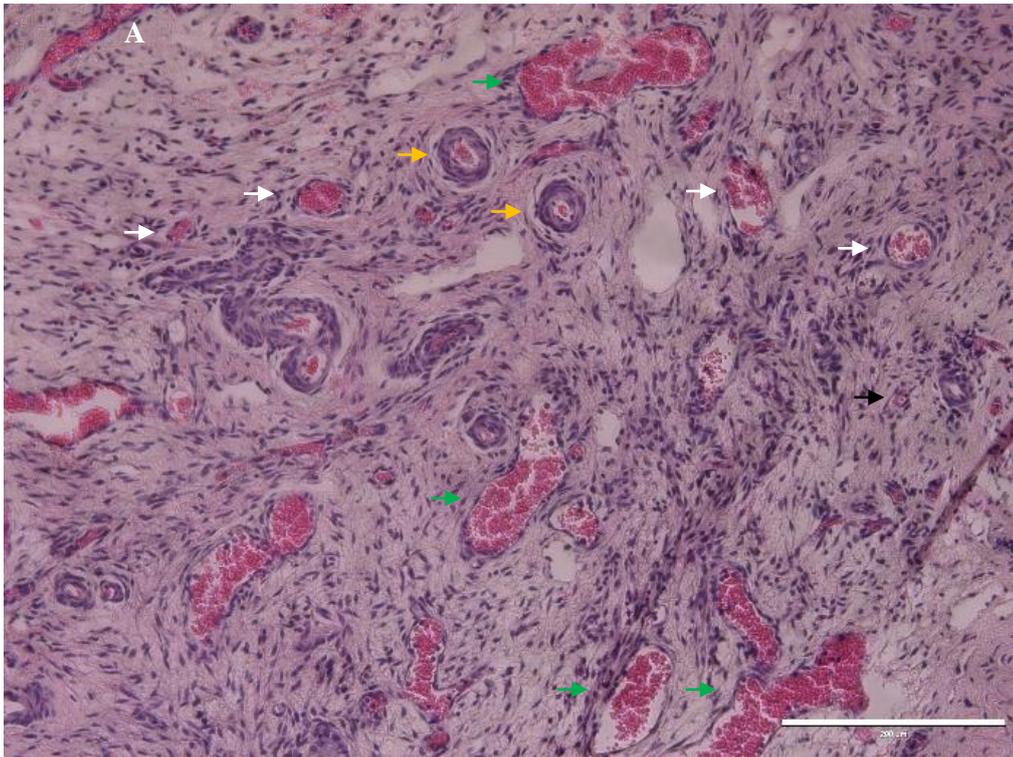


Figura 10. Vasos sanguíneos no tecido ovariano do grupo tratado com EPO no dia 28 pós-transplante (A) com coloração Hematoxilina Eosina. Seta preta indica capilar, seta branca indica vaso sanguíneo de pequeno calibre, seta laranja indica vaso sanguíneo de médio calibre, seta verde indica vaso sanguíneo de grande calibre. Barra = 200 μ m.

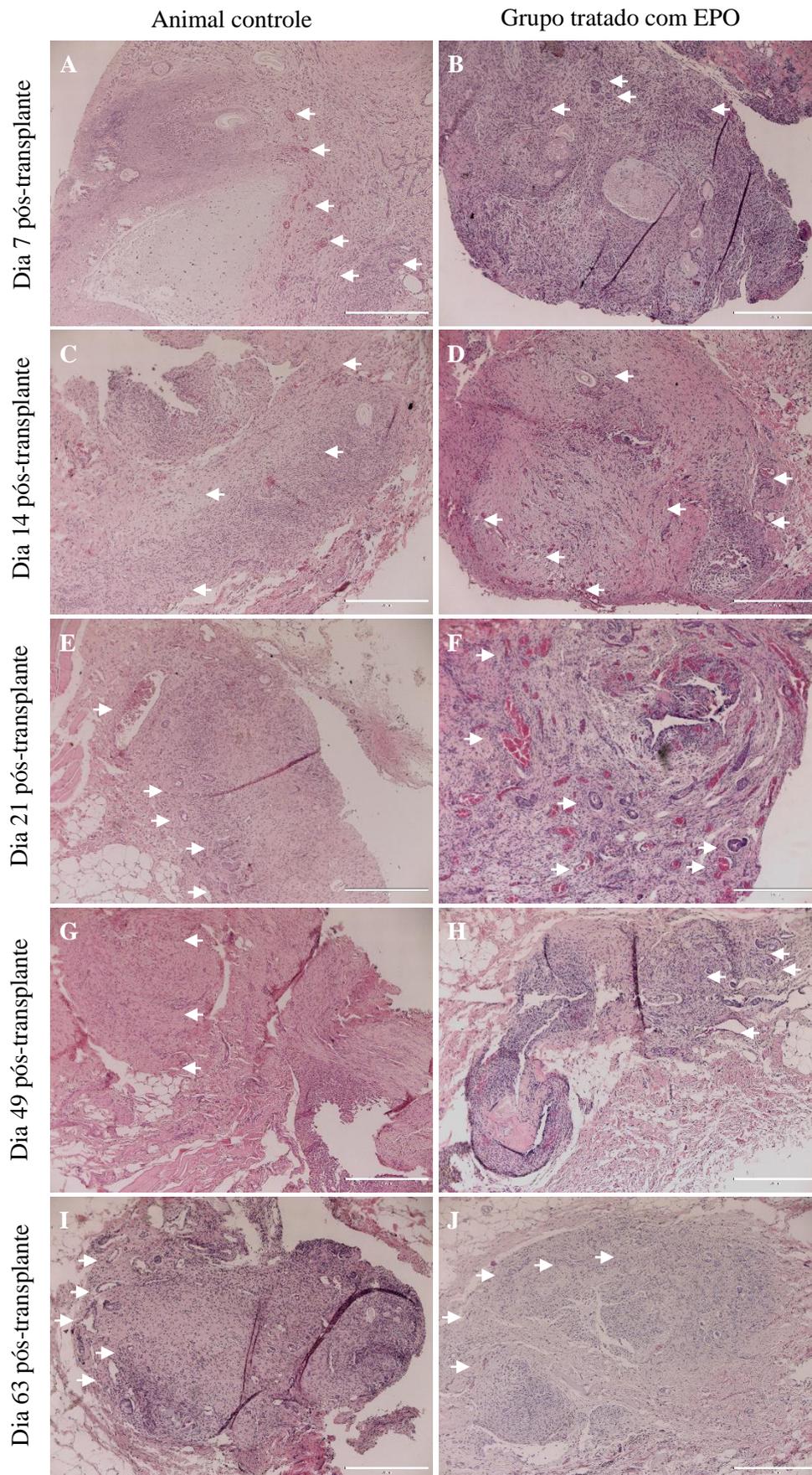


Figura 11. Visão geral do tecido ovariano com coloração Hematoxilina Eosina indicando os vasos sanguíneos (seta). Animal controle (A, C, E, G, I) e no grupo tratado com EPO (B, D, F, H, J). Dia 7 (A, B), 14 (C, D), 28 (E, F), 49 (G, H) e 63 (I, J) pós-transplante. Barra = 400 μ m.

O grupo tratado com EPO apresentou menor área de fibrose no córtex do tecido ovariano, nos dias 7, 49 e 63 pós-transplante, em comparação ao animal controle. Nos dias 14 e 28 pós-transplante a presença de fibrose foi semelhante entre os dois grupos (Tabela 12). Imagens ilustrativas da fibrose observada no tecido ovariano transplantado, tanto no animal controle quanto no grupo tratado com EPO são mostradas na Figura 12.

Tabela 12. Classificação da área (em +) ocupada por tecido conjuntivo no tecido ovariano fresco e no tecido criopreservado antes e após transplante no animal controle (sem EPO) e no grupo tratado com EPO

	D0-Fresco	D0-Crio	D7	D14	D21	D28	D49	D63
Animal controle	+	+	++++	+++	-	+++	++++	+++++
Grupo EPO	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++++

+ até 20% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo; ++ 20-40% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo; +++ 40-60% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo; ++++ 60-80% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo; +++++ 80-100% do tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo.

- Fragmento perdido.

EPO = eritropoietina.

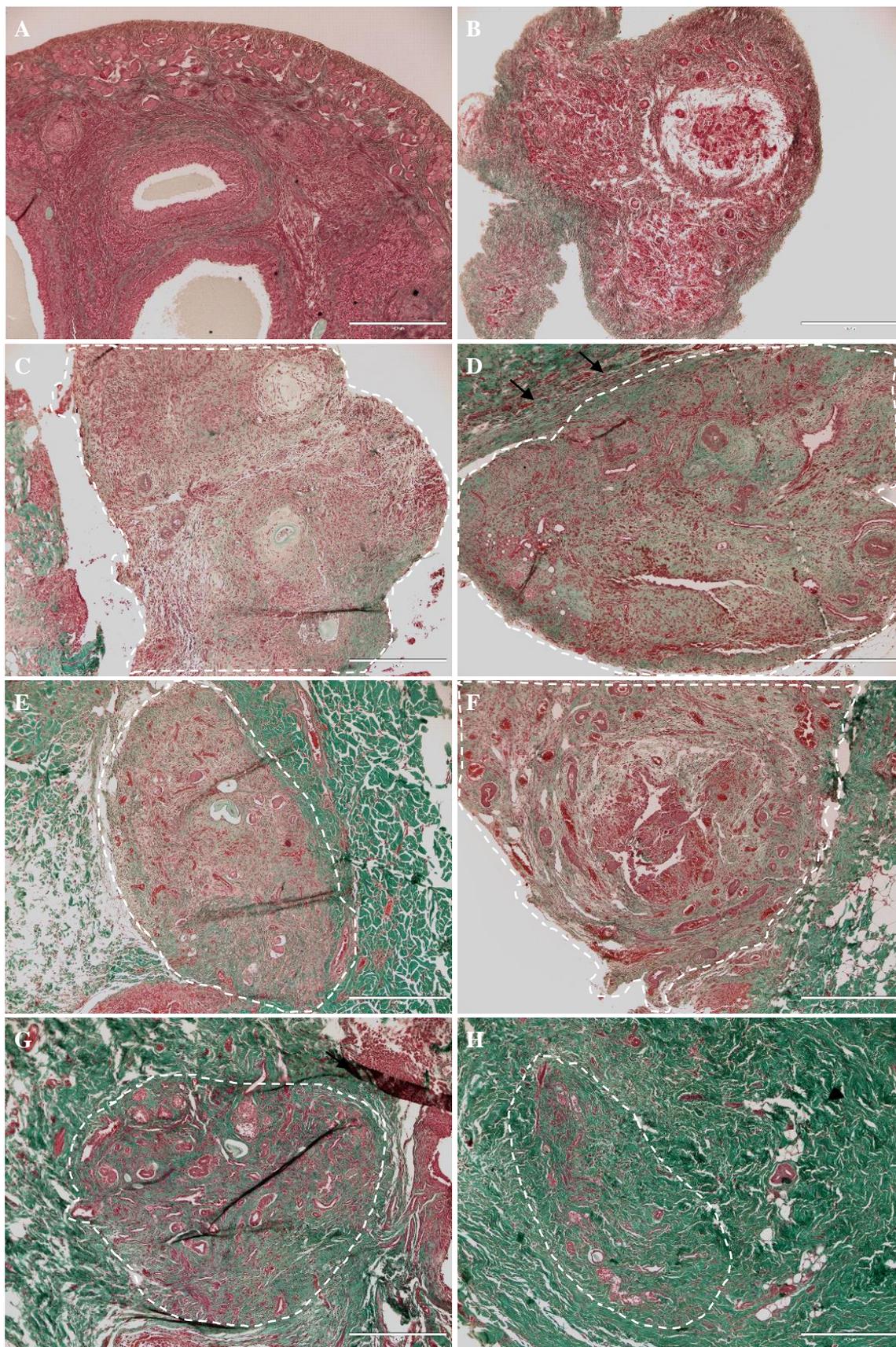


Figura 122. Histologia de tecido ovariano (grupo tratado com EPO) com coloração tricrômica de Gomori. (A) tecido ovariano fresco; (B) tecido ovariano criopreservado antes do transplante; dias 7 (C), 14 (D), 21 (E), 28 (F), 49 (G) e 63 (H) pós-transplante. Os pontilhados delimitam o tecido ovariano após o transplante, o cor verde indica as fibras colágenas. Barra = 400 μ m.

Como uma forma de controle da saúde dos animais tratados com EPO, foi feito o acompanhamento dos parâmetros hematológicos ao longo do período de administração de EPO. Foram observadas algumas alterações hematológicas durante o tratamento com EPO (Anexo 1), como por exemplo um discreto aumento no número de hemácias e na quantidade de hemoglobina, assim como no VCM e CHCM, mais especialmente no 4º dia de aplicação de EPO. Também, foram observados metarrubricitos (células eritroides imaturas nucleadas), principalmente no 7º dia de aplicação de EPO, que indicam uma resposta regenerativa na medula óssea. Já o plaquetograma mostrou diminuição no número de plaquetas entre um dia antes da 1ª aplicação de EPO e o 4º dia de aplicação de EPO em 2 animais. Apesar disso, todos os animais mantiveram os parâmetros sanguíneos dentro dos padrões de normalidade para a espécie em todas as avaliações. O leucograma, proteínas plasmáticas totais e bioquímico também se mantiveram dentro da normalidade nos animais tratados (Anexo 1). Na avaliação do comportamento de cio não foi observado nenhuma manifestação que indicasse o cio.

VII. DISCUSSÃO

Anteriormente, a EPO havia demonstrado um potencial angiogênico, efeitos antioxidantes e de reduzir o estresse oxidativo no tecido ovariano (Karaca *et al.*, 2009; Sayyah-Melli *et al.*, 2012; Kulusari *et al.*; 2017). Além disso, demonstrou uma maior sobrevivência folicular no tecido ovariano transplantado (Mahmoodi *et al.*, 2014; Kulusari *et al.*, 2017). Em razão disso, no presente estudo testamos a aplicação de EPO, antes e depois do transplante, como uma possibilidade de melhorar a sobrevivência folicular após o transplante de tecido criopreservado. Já que até agora o transplante de tecido ovariano criopreservado mostra uma massiva morte folicular após o transplante (Liu *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2004; Vilela, 2016).

No presente estudo, a porcentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais apresentou uma redução significativa do tecido fresco para o tecido criopreservado após o descongelamento, como foi reportado por Leonel *et al.* (2018a). A criopreservação do tecido ovariano, no presente trabalho, foi feita com o mesmo protocolo de criopreservação descrito por Leonel *et al.* (2018a), para tecido ovariano de gatas. Não obstante, Vilela (2016) também usando o mesmo protocolo de criopreservação, não observou diferença significativa na porcentagem de FMN no tecido ovariano antes e depois do congelamento. A variação dos resultados, no presente estudo, pode ser devida a diferenças na classificação das degenerações consideradas na avaliação dos folículos, ou à variação individual natural que apresentam os animais. Luvoni *et al.* (2012), utilizando um protocolo diferente de criopreservação, reportaram uma similar porcentagem de FMN do tecido ovariano de gata após o descongelamento. Igualmente, usando outros protocolos

de criopreservação foi reportado uma diminuição da porcentagem de FMN após o descongelamento de tecido ovariano de gata (Lima *et al.*, 2006; Tanpradit *et al.* 2015; Leonel *et al.* 2018a) e de camundongo (Candy *et al.* 1997). Os diferentes protocolos de criopreservação de tecido ovarino confirmam que o tecido sofre danos durante o processo, de modo que os resultados obtidos no presente trabalho estão dentro no esperado.

No dia 7 pós-transplante, observamos uma porcentagem de 45,1% (32/71) de folículos primordiais MN no animal controle, e 86% (54/63) no grupo tratado com EPO. Vilela (2016) reportou uma porcentagem de 31,3% (31/99) no tecido criopreservado e Leonel *et al.* (2018b) uma porcentagem de 68,7% (164/224) no tecido fresco, ambos em tecido ovariano de gata com autotransplante heterotópico. É importante ressaltar que o número de folículos total encontrados por Vilela (2016) foi muito pouco, assim como no presente trabalho. A partir do dia 14 de transplante em diante, no presente estudo, o número de folículos encontrados no tecido transplantado reduziu ainda mais, de forma semelhante ao reportado por Vilela (2016). No tecido fresco, Leonel *et al.* (2018b) observaram uma porcentagem de folículos primordiais MN maior que 80% nos dias 14, 28, 49 e 63 pós-transplante, além de um desenvolvimento folicular até o estágio de folículo antral nos dias 28, 49 e 63 pós-transplante. A morte folicular massiva após o transplante no tecido criopreservado sugere que o dano gerado no processo de criopreservação é maior do que o dano gerado no período de isquemia inicial após o transplante. Isto é coerente porque o tecido fresco após o transplante apresenta uma alta sobrevivência folicular e recuperação total do desenvolvimento folicular. No entanto o transplante do tecido criopreservado não é completamente ineficiente pois, no presente trabalho, observamos FMN nos dias 28, 49 e 63 pós-transplante, e Vilela (2016) observou 2 folículos antrais 28 dias pós-transplante. Além de que já foram obtidos nascimentos e produção de hormônios do tecido ovariano criopreservado (Parrot, 1960; Salle *et al.*, 2002, 2003; Imhof *et al.*, 2006; Donnez *et al.*, 2004, 2008, 2013; Amorim *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2009).

Outro estudo com tecido ovariano de gata foi realizado por Bosch *et al.* (2004). Estes autores trabalharam com xenotransplante de tecido ovariano criopreservado e encontraram uma densidade folicular de 11,1 folículos/0,1 mm³ de tecido ovariano no dia 67 pós-transplante, em comparação ao tecido fresco de 114,5 folículos/0,1 mm³. Além disso, observaram um total de 12 folículos antrais e luteinização de folículos antrais nos animais tratados com eCG e hCG. É importante ressaltar que este estudo foi realizado com outro protocolo de criopreservação, na qual a curva de congelamento foi diferente do presente trabalho e o crioprotetor com que trabalharam foi o etilenoglicol. Mesmo assim, seus resultados, de marcada perda folicular após o transplante, são parecidos ao reportado por Vilela (2016) e aos do presente estudo.

No grupo tratado com EPO foram encontrados no dia 7 pós-transplante uma porcentagem de 86% (54/63) de folículos primordiais MN que é semelhante ao observado no tecido fresco não transplantado e significativamente maior ao observado no animal controle. Não obstante, o grupo tratado com EPO também apresentou muito poucos folículos no tecido depois do dia 14 de transplante, sugerindo que a EPO não tem efeito a longo prazo. Commin *et al.* (20012) reportam em tecido ovariano de cadela criopreservado e xenotransplante para camundongo SCID com tratamento com EPO (500 UI/Kg, s.c.) uma densidade de folículos primordiais MN de 38,2%, 10,5% e 11,8%, respectivamente nas semanas 1, 8 e 16 pós-transplante, em comparação ao tecido fresco que apresentou 82,3%. Igualmente, Suzuki *et al.* (2008) reportaram que a aplicação de EPO não apresentou diferença significativamente na taxa de sobrevivência de folículos pré-antrais no tecido ovariano de cadela vitrificado no dia 28 após xenotransplante para camundongo NOD-SCID. Ainda, Hirayama *et al.* (2011) descrevem resultados semelhantes para tecido ovariano de cadela vitrificado e xenotransplantado no camundongo NOD-SCID com aplicação de EPO. Em tecido ovariano fresco, Mahmoodi *et al.* (2014) reportaram, no dia 28 após alotransplante, uma alta sobrevivência folicular e desenvolvimento folicular completo no tecido ovariano de camundongo Swiss que recebeu tratamento com EPO (500 UI/Kg, i.p.). Da mesma forma, Kulusari *et al.* (2017) descreveram, aos dois meses de autotransplante, um aumento significativo no número de folículos antrais no tecido ovariano fresco de rata Wistar que recebeu tratamento com EPO (5000 UI/Kg). Em resumo, no presente estudo o tratamento com EPO mostrou resultados positivos na diminuição da morte folicular no tecido criopreservado aos 7 dias pós-transplante, mas não diminuiu a perda folicular massiva após o transplante a longo prazo. Os artigos citados e o presente estudo, mostram que a aplicação de EPO no tecido criopreservado não incrementa a sobrevivência folicular após o transplante, a diferença dos resultados promissores da EPO no tecido ovariano fresco transplantado. É possível que os efeitos da EPO sejam mantidos por uma curta duração após o transplante no tecido ovariano criopreservado, de forma que talvez aplicar EPO em diferentes tempos do experimento resulte em outros efeitos.

Neste trabalho, após o transplante, independente do animal ter recebido EPO ou não, foi observada o aparecimento de “follicle-like structures” que são estruturas foliculares, que apresentavam células da granulosa justapostas com ausência do ovócito. Este tipo de estrutura também foi reportado por Vilela (2016) e Leonel *et al.* (2018b) após o transplante. Braw-Tal e Yossefi (1997) reportaram que no desenvolvimento folicular *in vitro*, os folículos pré-antrais mantinham as células da granulosa enquanto os ovócitos desapareciam. Além disso, Vilela (2016) reportou que as células da granulosa nessas estruturas são proliferativas, o que sugere que

a ausência do ovócito é a consequência dos danos gerados no processo de criopreservação e/ou isquemia inicial após o transplante. Não obstante, o número de FLS foi maior no grupo tratado com EPO em comparação ao reportado por Vilela (2016) em animais que não receberam EPO, pelo que podemos supor que a aplicação de EPO incrementou a sobrevivência de FLS no tecido transplantado, mas não gerou efeito protetor no ovócito.

Os vasos sanguíneos foram facilmente identificados por avaliação histológica, no presente estudo, no tecido transplantado, e vasos sanguíneos de médio calibre começaram a ser observados a partir do dia 7 pós-transplante no grupo tratado com EPO. Vilela (2016) reporta vasos sanguíneos calibrosos apenas nos dias 49 e 63 pós-transplante e Mahmoodi *et al.* (2014) cita a existência de vasos sanguíneos funcionais no dia 28 pós-transplante (sem menção de calibre). Apesar da presença de vasos sanguíneos no tecido transplantado no grupo tratado com EPO, isso não foi suficiente para evitar a morte massiva dos folículos no tecido ovariano o que sugere que o período de isquemia inicial, que ocorre em transplante de tecido ovariano, descrito por diversos autores (Dissen *et al.*, 1994; Israely *et al.*, 2004 e Van Eyck *et al.* 2009) não foi reduzido como esperávamos, mesmo com a aplicação de EPO, ou que os danos maiores são causados pela criopreservação em si.

No presente estudo foi observado um processo inflamatório agudo e crônico no tecido ovariano após o transplante. Uma possível explicação para o processo inflamatório seria a agressividade da cirurgia, ou seja, a intensidade no processo de escarificação no local no xenotransplante. Outra explicação seria que o fio de cirurgia, utilizado para fixar o fragmento ao tecido subcutâneo, tenha gerado o processo inflamatório. Processos inflamatórios gerados pelo fio de cirurgia são reportados em procedimentos cirúrgicos de pele (Auerbach *et al.*, 1975; Vásquez *et al.*, 2012), erosão epitelial corneano (Shahinian *et al.*, 1977) e mucosa oral (Najarro, 2018). Cardona *et al.* (2016) reportam a formação de granuloma por corpo estranho gerado por fio de sutura na pele. Não obstante, os artigos sobre transplante de tecido ovariano em humanos reportam a utilização do fio de cirurgia, absorvível ou não absorvível, no processo de fixação dos fragmentos (Donnez *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009), mas os autores não mencionam se há ou não processo inflamatório.

Áreas de fibrose foram observadas no tecido ovariano após o transplante, no presente estudo, semelhante ao que reportou Vilela (2016) no tecido ovariano criopreservado de gata. No tecido ovariano vitrificado de primata não humano, Amorim *et al.* (2013) reportaram ausência de fibrose 5 meses após autotransplante ortotópico. O processo inflamatório apresentado no tecido ovariano após o transplante, no presente estudo, pode haver gerado um aumento na produção de fibras colágenas produzindo fibrose no tecido ovariano. Também, a fibrose pode ser

resultado da morte celular do parênquima do tecido ovariano devido ao período de isquemia que o tecido sofre após o transplante ou à própria criopreservação. No dia 7 pós-transplante, o grupo tratado com EPO apresentou menor área de fibrose em comparação ao animal controle. Uma possível explicação seria o efeito antioxidante da EPO e a diminuição do estresse oxidativo (Karaca *et al.*, 2009; Sayyah-Melli *et al.*, 2012; Sayyah-Melli *et al.*, 2012). No entanto, a partir dos 14 dias pós-transplante, não houve diferença entre o grupo tratado com EPO e o controle.

VIII. CONCLUSÃO

Em conclusão, a EPO permitiu obter uma melhor sobrevivência folicular, uma maior vascularização e menor área de fibrose no dia 7 pós-transplante. Entretanto, a morte folicular massiva continua ocorrendo após 7 dias de transplante do tecido ovariano criopreservado. Outros estudos precisam ser feitos para investigar melhor os danos gerados no processo de criopreservação no tecido ovariano de gatas e os diferentes momentos de aplicação de EPO.

IX. REFERÊNCIAS

- Amorim, C.A.; Jacobs, S.; Devireddy, R.V.; Langendonckt, A.V.; Vanacker, J.; Jaeger, J.; Luyckx, V.; Donnez, J.; Dolmans, M-M.** Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Human Reproduction*, Vol. 28 (8), p. 214 - 2156, 2013.
- Anderson, R.A.; Hamish, W.; Wallace, B.; Telfer, E.E.** Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: Clinical and research perspectives. *Human Reproduction Open*, p. 1 – 9, 2017.
- Auerbach, R.; Pearlstein, M.M.** A Comparison of poly glycolic acid (Dexon), nylon and silk sutures in skin surgery. *Journal to Dermatology Surgery*. Vol. 1:1, p. 546 – 548, 1975.
- Avila-Portillo, L.M.; Madero, J. I.; Lopez, C.; Leon, M.F.; Acosta, L.; Gomez, C.; Delgado, L.G.; Gomez, C.; Lozano, J.M.; Reguero, M.T.** Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia*, Vol. 57 (4), p. 291 - 301, 2006.
- Bezerra, M. B.; Carmo, N. A.; Macedo, M. F.** Transplantes gonadais: estado da arte. *Ciência Animal*, Vol. 22 (1), p. 325 - 338, 2012. Disponível em: < [http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA_PALESTRA%20\(25\).pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/CONERA_PALESTRA%20(25).pdf) >.
- Bosch, P.; Hernandez-Fonseca, H.J.; Miller, D.M.; Wininger, J. D.; Massey, J. D.; Lamb, S.V.; Brackett, B.G.** Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, Vol. 61, p. 581 - 594, 2004.
- 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*, Vol. 109, p. 165 – 171, 1997.
- Bristol, S.K.; Woodruff, T.K.** Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biology Reproduction*, Vol. 70, p. 846 – 59, 2004.
- Brito, D.C.; Domingues, S.F.S.; Silva, J.K.; Wu, X.; Santos, R.R.; Pieczarka, J.C.** Detrimental effect of phenol red on the vitrification of cat (*felis catus*) ovarian tissue. *Biopreservation and Biobankin*, Vol. 14 (1), p. 17 – 22, 2016.
- Brito, D.C.C.; Domingues, S.F.S.; Rodrigues, A.P.R.; Maside, C.; Lunardi, F.O.; Wu, X., Figueiredo, J.R.; Pieczarka, J.C.; Santos, R.R.** Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: comparison of two vitrification methods. *Theriogenology*, Vol. 111, p. 69 – 77, 2018.
- Candy, C. J.; Wood, M. J.; Whittingham, D. G.** Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction Fertility*, Vol. 110, p. 11 – 19, 1997.

Cardona H., M.A.; Enríquez M., J.; Ramos G., A.; Padilla D., P.; Vidal F., A. A. Fístula cutánea y granuloma a cuerpo extraño por material de sutura. Presentación de un caso. *Revista del Centro Dermatológico Pascua*, Vol. 25 (2), 2016.

Carrijo Jr. O.A.; Marinho, A.P.S.; Campos, A.A.; Amorim, C.A.; Bão, S.N.; Lucci, C.M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, Vol. 191 (2), p.152 – 160, 2010. Disponível em: < <https://www.karger.com/Article/Abstract/225935> >.

Castro, S.V.; Carvalho, A.A.; Gomes da Silva, C.M.; Fausto, L.R.; Ricardo de Figueiredo, J. & Rodrigues, A.P.R. Agentes crioprotectores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Vol. 39 (2), p. 957, 2011.

Chamorro, María Eugenia. Modificación de la funcionalidad de la eritropoyetina por carbamilación. Mecanismos de acción sobre células eritroides y neuronales. 2014. (Doutorado)-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Disponível em: < http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5510_Chamorro.pdf >.

Commin, L.; Buff, S.; Rosset, E.; Galet, C.; Allard, A.; Bruyere, P.; Joly, T.; Guérin, P.; Neto, V. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, Vol. 24, p. 461 - 471, 2012.

Cunningham, James G. Control del desarrollo de las gónadas y los gametos. In: (Ed) *Fisiología veterinária*, 5: ELSEIVIER, 2014, p. 410 - 414.

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

Donnez J., Dolmans M-M. Fertility preservation in women. *New England Journal of Medicine*, Vol. 377, p. 1657 – 65, 2017.

Donnez, J.; Dolmans, M.M.; Demylle, D.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Squifflet, J.; Martínez-Madrid, B. & Van Langendonck, A. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* Vol. 364, p. 1405 – 10, 2004.

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

Donnez, J.; Squifflet, J.; Van Eyck, A-S, Demylle, D.; Jadoul, P.; Van Langendonck, A.; Dolmans, M-M. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved

ovarian tissue: a pilot experience. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol 16 (5), p. 694 - 704, 2008.

Eimani, H.; Behbahanian, A.; Zeinali, B.; Valoujerdi, M.Z.; Eftekhari, P.; Shahverdi, A.; Gourabi, H.; Golkar-Narenji, A. Heterotopic autotransplantation of vitrified mouse ovary. *Reproductive Medicine and Biology*, Vol. 10, p. 267 – 275, 2011.

Elliott, S.; Pham, E.; Macdougall, I. C. Erythropoietins: A common mechanism of action. *Experimental Hematology*, Vol. 36 (12), p. 1573 - 1584, 2008.

Feldman, E.C.; Nelson, R.W. Feline reproduction. In (Ed) *Feline Reproduction: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3: Saunders, p. 4034 - 4062, 2004.

Fisher, James W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 22, p. 1 - 14, 2003.

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

Galina, Carlos; Valencia, Javier. Pubertad, Ciclo estral y Estacionalidad. In (Ed) *Reproducción de Animales Domésticos*. 3: Limusa, cap. 99 – 102, 2008.

Gosden, R.G.; Boulton, M.I.; Grant, K.; Webb, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, Vol. 101, p. 619 - 623, 1994.

Guyton; Hall. Fisiologia Feminina Antes da Gravidez e Hormônios Femininos. In (Ed) *Tratado de Fisiologia Médica*. 12: HALL, p. 1064 – 1067, 2011.

Hafez, E. S. E.; Hafez, B. Foliculogênese, Maduração, Ovocitária e Ovulação In: (Ed.) *Reprodução Animal*. 7: Manole, cap. 69 - 91, 2004.

Hamed, S.; Egozi, D.; Kruchevsky, D.; Teot, L.; Gilhar, A.; Ullmann, Y. Erythropoietin improves the survival of fat tissue after its transplantation in nude mice. *Plos One*, Vol. 5 (11), p. e13986, 2010.

Heeschen, C.; Aicher, A.; Lehmann, R.; Fichtlscherer, S.; Vasa, M.; Urbich, C.; Mildner-Rihm, C.; Martin, H.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, Vol. 102 (4), p. 1340 - 1346, 2003. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/102/4/1340?sso-checked=true> >.

Hirayama, Y.; Inoue, K.-S.; Suzuki, H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation. *Journal of Mammalian Ova Research*, Vol. 28 (3), p. 143 - 147, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1274/jmor.28.143> >.

Imhof, M.; Bergmeister, H.; Lipovac, M.; Rudas, M.; Hofstetter, G. & Huber, J. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. *Fertil. Steril.* Vol. 85, p. 1208 – 1215, 2006.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Livro Vermelho da Fauna Brasileira, 2016. Disponível em: < https://simverj.files.wordpress.com/2016/12/livro_vermelho_ed_2016dcom_sumario_executivo.pdf >. Acesso em: 25/05/2016.

Ishijima, T.; Abe, Y.; Suzuki, H. Follicular loss of the cryopreserved canine ovary after xenotransplantation. *Journal of Mammalian Ova Research*. Vol. 26, p. 61 – 65, 2009.

Israely, T.; Dafni, H.; Nevo, N.; Tsafiriri, A.; Neeman, M. angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, Vol. 52, p. 741 – 75, 2004. Disponível em: < <http://onlinelibrary-wiley.ez54.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/mrm.20203/full> >.

Iyer N.; Kotch, Le; Agani, F.; Leung, S.; Laughner, E.; Wenger, R.; Gassmann, M.; Gearhart, J.; Lawler, A.; Yu, A.; Semenza, G. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Genes and Development*, Vol. 12 (2), p. 149 - 162, 1998.

Jemmett, J.E.; Evans, J.M. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *Journal of Small Animal Practice*, Vol. 18, p. 31 - 37, 1977.

Karaca, M.; Odabasoglu, F.; Kumtepe, Y.; Albayrak, A.; Cadirci, E.; Keles, O. N. Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Vol. 144 (2), p. 157 - 162, 2009. Disponível em: < [http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(09\)00231-0/fulltext](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(09)00231-0/fulltext) >.

Kato, S.; Amano, H.; Ito, Y.; Eshima, K.; Aoyama, N.; Tamaki, H.; Sakagami, H.; Satoh, Y.; Izumi, T.; Majima, M. Effect of Erythropoietin on Angiogenesis with the Increased Adhesion of Platelets to the Microvessels in the Hind-Limb Ischemia Model in Mice. *Journal of pharmacological sciences*, Vol. 112 (2), p. 167 - 75, 2010.

Kim, S.S.; Lee, W. S.; Chung, M.K.; Lee, H. C.; Lee, H. H.; Hill, D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertility and Sterility*, Vol. 91 (6), 2009.

Koeppe, B.; Stanton, B. Sistemas reprodutores masculino e feminino. In: (Ed) *Fisiologia Berne & Levy*, 2: ELSEIVIER, p. 765 – 804, 2009.

Kolusari, A.; Okyay, A. G.; Koçkaya, E. A. The effect of erythropoietin in preventing ischemia reperfusion injury in ovarian tissue transplantation. *Reproductive Sciences XX(X)*, 2017. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com.ez54.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1177/1933719117715127> >.

- Kong, H.S.; Lee, J.; Youm, H.W.; Kim, S.K.; Lee, J.R.; Suh, C.S.; Kim, S.H.** Effect of treatment with angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor on the quality of xenografted bovine ovarian tissue in mice. *PlosOne*, Vol. 12 (9), p. e0184546, 2017.
- Koning, H. E.; Leicich, H-G.** Órganos genitales femeninos. In: (Ed.) *Anatomía de los animales domésticos: Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso*. 2: Panamericana, 2011, cap. 135 - 140.
- Koury, M.J.; Bondurant, M.C.** Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, Vol. 248, p. 378 - 381, 1990.
- Krohn, P.L.** Transplantation of the ovary. In: (Ed.) *The ovary*, 2: Academic Press, New York, cap. 101-128, 1977.
- Lacombe, C.; Mayeux P.** Biology of erythropoietin. *Haematologica*, Vol. 83 (8), p. 724 - 732, 1998.
- Lee, D. M.; Yeoman, R.R.; Battaglia D.E.; Stouffer, R. L.; Zelinski-Wooten, M. B.; Fanton, J.W.; Wolf, D. P.** Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*, Vol. 428, p. 137 – 38, 2004.
- Lee, J.; Kim, E.J.; Kong, H.S.; Youm, H. W.; Lee, J.R.; Suh, C.S.; Kim, S.H.** A combination of simvastatin and methylprednisolone improves the quality of vitrified-warmed ovarian tissue after auto-transplantation. *Human Reproduction*, Vol. 30 (11), p. 2627 – 2638, 2015.
- Leonel, E., Vilela, J., Carrilho, D., Lucci, C.** Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. Vol. 83, p. 9 - 14, 2018a.
- Leonel, E.; Vilela, J.; Paiva, R.; Jivago, J.; Amaral, R.; Lucci, C.** Restoration of fresh cat ovarian tissue function by autografting to subcutaneous tissue: A pilot study. *Theriogenology* Vol. 105, p. 97 – 106, 2018b.
- Leyva, H.; Madley, T.; Stabenfeldt, G.H.** Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl*, N°39, p. 125 - 133, 1989.
- Lima, A.K.; Silva, A.R.; Santos, R.R.; Sales, D.M.; Evangelista, A.F.; Figueiredo, J.R.; Silva, L.D.** Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, Vol. 66, p. 1664 –1666, 2006.
- Liu, C.; Peng, J.; Matzuk, M.M.; Yao, H.H.** Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature Communications*, Vol. 6, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917826/> >.
- Liu, J.; Van Der Elst, J.; Van Den Broecke, R.; Dhont, M.** Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reproduction*, Vol. 17 (3),

p. 605 - 611, 2002. Disponível em: < <https://academic.oup.com/humrep/article/17/3/605/642220> >.

Luvoni, G.C.; Tessaro, I.; Apparício, M.; Ruggeri, E.; Luciano, AM.; Modina, SC. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 47, p. 385 – 391, 2012.

Mahmoodi, M.; Soleimani Mehranjani, M.; Shariatzadeh, S.M.A.; Eimani, H.; Shahverdi, A. Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. *Society for Reproduction and Fertility*, Vol. 147, p. 733 – 741, 2014. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/147/5/733> >.

Mazur, Peter. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Journal of Physiology*, Vol. 16, p. 125 - 142, 1984.

McGee, H.A.; Martin, W.J. Cryochemistry. *Cryogenics* Vol. 2 (5), p. 257 - 267, 1962. Disponível em: < <https://www-sciencedirectcom.ez54.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0011227562900012?via%3Dihub> >

Milenkovic, M.; Diaz-Garcia, C.; Wallin, A.; Brannstrom, M. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow freezing and vitrification. *Reproductive Biology*, Vol. 97 (5), 2012.

Morohaku, K.; Tanimoto, R.; Sasaki, K.; Kawahara-Miki, R.; Kono, T.; Hayashi, K.; Hirao, Y.; Obata, Y. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 113, p. 9021 – 9026, 2016.

Najarro C., M. A. estudio histológico comparativo de la reacción de los tejidos con suturas de seda negra, ácido poliglicólico y poliglactina 910 en mucosas orales de conejos. 2018. (Pré-grado). Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Nakao, T.; Geddis, A.; Fox, N.; Kaushansky. PI3K/Akt/ FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes *in vitro* and *in vivo* via modulation of p27^{Kip1}. *Cell Cycle*, Vol. 7, p. 257 - 66, 2008.

Nugent, D.; Newton, H.; Gallivan, L.; Gosden, R.G. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *Journal of Reproduction and Fertility*, Vol. 114, p. 341 – 346, 1998.

O'Brien, S. J.; Johnson, W. E. Big cat geneomics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Vol. 6, p. 407 - 29, 2005. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.6.080604.162151> >.

Parrot, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol, 1, p. 230 – 241, 1960.

Rubinsky, Boris. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*, Vol. 8 (3), p. 277 – 284, 2003. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024734003814> >.

Salle, B.; Demirci, B.; Franck, M.; Berthollet, C. & Lornage, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*. Vol. 80, p. 172 – 177, 2003.

Salle, B.; Demirci, B.; Franck, M.; Rudigoz, R.C.; Guerin, J.F. & Lornage, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen–thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility* Vol. 77, p. 403 – 408, 2002.

Sayyah-Melli, M.; Reza, R.M.; Kaseb, G.M.; Rashtchizadeh, N.; Taghavi, S.; Ouladsahebmadarek, E.; Ghojzadeh, M. The effect of erythropoietin against oxidative damage associated with reperfusion following ovarian detorsion. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Vol. 162, p. 182 - 186, 2012. Disponível em: < [http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(12\)00085-1/fulltext](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(12)00085-1/fulltext) >.

Shahinian, L.; Brown, S. I. Postoperative complications with protruding monofilament nylon sutures. Vol. 83 (4), 1977.

Soleimani, R.; Heytens, E.; Oktay, K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *Plos One*, Vol. 6 (4), p. e19475, 2011.

Stornelli, Maria A. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Vol. 31 (1), p. 71 - 76, 2007.

Suzuki, H.; Ishijima, T.; Maruyama, S.; Yanagimoto Ueta, Y.; Abe, Y.; Saitoh, H. Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. *Jurnal of Assisted Reproduction Genetics*, Vol. 25, p. 571 – 575, 2008. Disponível em: < [https://link-springer-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10815-008-9271-9](https://link.springer-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10815-008-9271-9) >.

Tanpradit, N.; Chatdarong, K. Cat Ovarian Tissue Cryopreservation using a Passive Cooling Device. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 41, 2011.

Tanpradit, N.; Comizzoli, P.; Srisuwatanasagul, S.; Chatdarong, K. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology*, Vol. 83, p. 1553 – 1561, 2015.

União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais. The Red List of IUCN. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/> >. Acesso em: 05/01/2017.

- Van Eyck, A-S; Jordan, B.F.; Gallez, B.; Heilier, J.F.; Van Langendonck, A.; Donnez, J.** Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertility and Sterility*, Vol. 92 (1), 2009.
- Vásquez, B.; Schencke, C.; Rodríguez, C.; Veuthey, C. del Sol, M.** Comparación entre etilcianoacrilato y sutura convencional en el cierre de incisiones de piel de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *International Journal of Morphology*, Vol. 30(3), p. 797 - 802, 2012.
- Vilela, J. M. V.** Cultivo *in vitro* e em membrana corioalantoica e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas. 2016. 107 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília.
- Vittori, D.; Chamorro, M. E.; Nesse, A.** Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, Vol. 50 (4) p. 773 - 82, 2016. Disponível em: < <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v50n4/v50n4a25.pdf> >.
- Wallin, A.; Ghahremani, M.; Dahm-Kahler, P; Brannstrom, M.** Viability and function of the cryopreserved whole ovary: in vitro studies in the sheep. *Human Reproduction*, Vol. 24 (7), p. 1684 – 1694, 2009.
- Wang, F.F.; Kung, C.K.; Goldwasser, E.** Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology*, Vol. 116, p. 2286 – 2292, 1985.
- Wang, L.; Ying, Y.F.; Ouyang, Y.L.; Wang, J.F.; Xu, J.** VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 30 (10), p. 1301 – 1311, 2013.
- Wang, Y.; Chang, Q.; Sun, J.; Dang, L.; Ma, W.; Hei, C.; Shen, X.; Zhao, C.; Cai, Y.; Pei, X.; Zhang, X.; Wang, Y.; Juang, X.** Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reproductive Biomedicine Online*, Vol. 24, p. 646 – 653, 2012.
- Wen D.; Biessel, J. P.; Showers, M.; Ruch, B. C.; Bunn, H.F.** Erythropoietin structure- function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem*, Vol. 269, p. 22839 - 22846, 1994.
- Wiedemann, C.; Hribal, R.; Ringleb, J.; Bertelsen, M.F.; Rasmusen, K.; Andersen, C.Y.; Wood, T. H.; Rosenberg, A. M.** Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 47 (6), p. 300 - 304, 2012.
- Zamboni, L.** Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte. *Association. Biology of Reproduction*, Vol. 10, p. 125 - 149, 1974.

Zhou, X-H; Wub, J-W; Shi, J.; Xia, Y-X; Zheng,S-S. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. *Cryobiology* Vol. 60, p. 101 – 105, 2010.

X. Anexo 1

Animal 1 tratado com EPO

HEMOGRAMA		1 dia antes da 1º aplicação da EPO	4º dia de aplicação da EPO		7º dia de aplicação da EPO		Valores de referência		
Eritograma	Hematócrito (%)	35	29,0 ↓		26,0 ↓		24 a 45%		
	Hemácias (célx x 10⁶/μL)	6,11	7,00 ↑		6,11		5,5 a 10,1 x 10 ⁶ /μL		
	Hemoglobina (g/dL)	13,2	19,7 ↑		9,2 ↓		8 a 14 g/dL		
	VCM (fL)	38,1	41,4 ↑		42,6		39 a 55/fL		
	CHCM (g/dL)	37,7	67,9 ↑		35,4 ↓		31 a 35 g/dL		
	Observações	-	-		Metarrubricitos (1)				
Leucócitos totais (célx/μL)		12.700	10.600		6.600		5.500 a 19.500 /μL		
		Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)
Leucograma	Monócitos	0	0	1	106	0	0	0 a 8	0 a 850
	Linfócitos	28	3.556	23	2.438	22	1.452	27 a 36	1.500 a 7.000
	Eosinófilos	7	889	8	848	8	528	0 a 8	0 a 1.500
	Neutrófilos segmentados	63	8.001	68	7.208	69	4.554	45 a 64	2.500 a 12.500
	Neutrófilos bastonetes	0	0	0	0	0	0	0 a 2	0 a 300
	Basófilos	2	242	0	0	1	66	Raros	Raros
Plaquetograma	Plaquetas (célx/MI)	409.000	334.000 ↓		335.000		200.00 a 600.000/μL		

VCM = Volume Corpuscular Médio, CHCM = Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, EPO = Eritropoietina.

Animal 2 tratado com EPO

HEMOGRAMA		1 dia antes da 1º aplicação da EPO	4º dia de aplicação da EPO		7º dia de aplicação da EPO		Valores de referência		
Eritograma	Hematócrito (%)	33	29 ↓		31 ↑		24 a 45%		
	Hemácias (célx x 10⁶/μL)	9,22	7,73 ↓		7,68		5,5 a 10,1 x 10 ⁶ /μL		
	Hemoglobina (g/dL)	12,4	10,6 ↓		11,0		8 a 14 g/dL		
	VCM (fL)	35,8	37,5 ↑		40,4 ↑		39 a 55/fL		
	CHCM (g/dL)	37,6	36,6 ↓		35,5 ↓		31 a 35 g/dL		
	Observações	-	-		-				
Leucócitos totais (célx/μL)		12.900	19.600		15.600		5.500 a 19.500 /μL		
Leucograma		Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)
	Monócitos	0	0	3	588	4	624	0 a 8	0 a 850
	Linfócitos	36	4.644	7	1.372	15	2.340	27 a 36	1.500 a 7.000
	Eosinófilos	4	516	1	196	2	312	0 a 8	0 a 1.500
	Neutrófilos segmentados	60	7.740	87	17.052	77	12.012	45 a 64	2.500 a 12.500
	Neutrófilos bastonetes	0	0	0	0	0	0	0 a 2	0 a 300
	Basófilos	0	0	2	392	2	312	Raros	Raros
Plaquetograma	Plaquetas (célx/MI)	739.000	348.000 ↓		352.000 ↑		200.00 a 600.000/μL		

Hemograma completo do animal 2 com tratamento de eritropoietina. VCM = Volume Corpuscular Médio, CHCM = Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, EPO = Eritropoietina.

Animal 3 tratado com EPO

HEMOGRAMA		1 dia antes da 1ª aplicação da EPO		4º dia de aplicação da EPO		7º dia de aplicação da EPO		Valores de referência	
Eritograma	Hematócrito (%)	32		32		26 ↓		24 a 45%	
	Hemácias (células x 10 ⁶ /μL)	7,22		7,38		5,03 ↓		5,5 a 10,1 x 10 ⁶ /μL	
	Hemoglobina (g/dL)	10,8		10,8		8,2 ↓		8 a 14 g/dL	
	VCM (fL)	44,3		43,4		51,7 ↑		39 a 55 fL	
	CHCM (g/dL)	33,8		33,8		31,5 ↓		31 a 35 g/dL	
	Observações	-		-		Metarrubricitos (1)			
Leucócitos totais (células/μL)		18.800		10.500		7.700		5.500 a 19.500 /μL	
Leucograma		Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)	Relativos (%)	Absolutos (/μL)
	Monócitos	2	376	0	0	5	385	0 a 8	0 a 850
	Linfócitos	40	7.520	23	2.415	38	2.926	27 a 36	1.500 a 7.000
	Eosinófilos	18	3.384	9	945	15	1.155	0 a 8	0 a 1.500
	Neutrófilos segmentados	39	7.332	68	7.140	42	3.234	45 a 64	2.500 a 12.500
	Neutrófilos bastonetes	0	0	0	0	0	0	0 a 2	0 a 300
	Basófilos	1	188	0	0	0	0	Raros	Raros
Plaquetograma	Plaquetas (células/ML)	204.000		246.000 ↑		230.000 ↓		200.00 a 600.000/μL	

VCM = Volume Corpuscular Médio, CHCM = Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, EPO = Eritropoietina.

Animal 4 tratado com EPO

HEMOGRAMA		1 dia antes da 1º aplicação da EPO	4º dia de aplicação da EPO		7º dia de aplicação da EPO		Valores de referência		
Eritogra ma	Hemató crito (%)	29	34 ↑		27 ↓		24 a 45%		
	Hemáci as (céls x 10⁶/μL)	7,82	8,95 ↑		5,08 ↓		5,5 a 10,1 x 10 ⁶ /μL		
	Hemogl obina (g/dL)	11,1	12,2 ↑		9,7 ↓		8 a 14 g/dL		
	VCM (fL)	37,1	38,0 ↑		53,1 ↑		39 a 55 fL		
	CHCM (g/dL)	38,3	35,9 ↓		35,9		31 a 35 g/dL		
	Observa ções	-	Metarrubricitos (1)		Metarrubricitos (16)				
Leucócit os totais (céls/ μL)		8.500	16.800		9.800		5.500 a 19.500 /μL		
Leucogra ma		Relati vos (%)	Absol utos (/μL)	Relati vos (%)	Absol utos (/μL)	Relati vos (%)	Absol utos (/μL)	Relati vos (%)	Absol utos (/μL)
	Monócit os	2	170	4	672	2	196	0 a 8	0 a 850
	Linfócit os	31	2.635	23	3.864	26	2.548	27 a 36	1.500 a 7.000
	Eosinófi los	9	765	5	840	2	196	0 a 8	0 a 1.500
	Neutrófi los segment ados	57	4.845	68	11.424	70	6.860	45 a 64	2.500 a 12.500
	Neutrófi los bastonet es	1	85	0	0	0	0	0 a 2	0 a 300
	Basófilo s	0	0	0	0	0	0	Raros	Raros
Plaquetog rama	Plaquet as (céls/MI)	225.000	272.000 ↑		153.000 ↓		200.00 a 600.000/μL		

VCM = Volume Corpuscular Médio, CHCM = Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média, EPO = Eritropoietina.

**BIOQUIMICA DOS ANIMAIS COM TRATAMENTO DE
ERITROPOIETINA**

Animal 1 tratado com EPO				
	1 dia antes da 1º aplicação da EPO	4º dia de aplicação da EPO	7º dia de aplicação da EPO	Valores de referência
Creatinina (mg/dL)	1,7	1,6	1,2	0,8 a 1,8 g/dL
PPT (g/dL)	7,2	7,0	7,0	6,0 a 8,0 g/dL
Animal 2 tratado com EPO				
Creatinina (mg/dL)	1,7	1,5	1,4	0,8 a 1,8 g/dL
PPT (g/dL)	7,0	7,0	6,2	6,0 a 8,0 g/dL
Animal 3 tratado com EPO				
Creatinina (mg/dL)	1,2	1,5	1,5	0,8 a 1,8 g/dL
PPT (g/dL)	6,6	7,2	6,0	6,0 a 8,0 g/dL
Animal 4 tratado com EPO				
Creatinina (mg/dL)	1,3	1,5	1,4	0,8 a 1,8 g/dL
PPT (g/dL)	8	8,4	6,2	6,0 a 8,0 g/dL

PPT = proteínas plasmáticas totais.