



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Autotransplante ortotópico de córtex ovariano de gatas  
domésticas**

**LIUDIMILA PASSOS GONÇALVES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BRASÍLIA-DF**

**2017**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

## **Autotransplante ortotópico de córtex ovariano de gatas domésticas**

Orientadora: 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**

**2017**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos animais que passaram pelo experimento, que tão bondosamente nos ensinaram a ser pessoas melhores e a evoluir cientificamente.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a minha orientadora Carolina Madeira Lucci pela paciência e compreensão, por ser uma orientadora maravilhosa e me ensinar a ser melhor tanto na carreira científica e profissional quanto na vida pessoal.

Agradeço imensamente a minha mãe e irmão, Suzana Dantas Passos e Carlos Wellington Passos Gonçalves, pelo apoio em todos os momentos difíceis.

Agradecer também a toda equipe de reprodução da professora Carolina Lucci, em especial Marcella Motta, Juliana Liz, Janice Vilela e as estagiárias Raísa Gonçalves e Thaís Seixas pela ajuda e cuidado com as gatas do experimento. E aos veterinários colaboradores que me ajudaram imensamente, Ana Bárbara Rocha, Marcelle Lemos e Hatus Santos.

Ao Mário Falcão, excelente profissional e amigo que me indicou e orientou a fazer este mestrado.

Ao Hospital Veterinário São Francisco por disponibilizar o espaço para parte do projeto ser realizado e a todos os tutores que aceitaram participar do projeto piloto.

Ao Cnpq por valorizar a pesquisa e incentivar a desenvolver estudos em animais.

À minha família de coração de Brasília, que sempre me apoiou e me deu forças para continuar e fez desta cidade o meu lar.

Gratidão a todos!

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>01</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b>	<b>02</b>
<b>3. Justificativa</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>5. Material e Métodos</b>	<b>17</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>24</b>
<b>7. Discussão</b>	<b>35</b>
<b>8. Considerações finais</b>	<b>43</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>44</b>

## RESUMO

Este trabalho objetivou realizar o autotransplante ortotópico de córtex ovariano em gatas domésticas. Foi padronizada a espessura de corte (1 mm) do fragmento cortical e o método de implante ortotópico diretamente sobre a medula remanescente, deixando o lado contralateral apenas com a região medular como controle. Foi observado desenvolvimento folicular em ambos os lados, porém com valores inferiores no lado onde tinha apenas a medula remanescente. Apesar de ter sido constatado que os folículos primordiais se encontram a uma profundidade máxima de 200  $\mu\text{m}$ , mesmo com a retirada de fatias de 1000 $\mu\text{m}$  (ou 1 mm) de espessura ainda resta tecido cortical com folículos ovarianos capazes de se desenvolver. Dessa forma, foi realizada uma nova etapa de implante ortotópico diretamente sobre a medula remanescente (acentuando a profundidade do corte após a retirada dos fragmentos) e foi comparado, com os implantes na bolsa peritoneal próxima ao ovário, também considerado ortotópico. Foi encontrado um bom desenvolvimento folicular nos implantes na bolsa peritoneal, muitas vezes superior ao da região medular. Ainda houve desenvolvimento de folículos antrais na região medular remanescente. Como o objetivo a longo prazo da técnica de transplante ortotópico de tecido ovariano em felinos é utilizar a gata doméstica como receptora de implantes de felinos ameaçados de extinção, é indispensável que os folículos em desenvolvimento sejam exclusivamente do transplante. Com este trabalho, pode-se concluir que a retirada de fragmentos de 1 mm de espessura da camada cortical do ovário de gatas é suficiente para recuperar a maioria dos folículos ovarianos pré-antrais, porém não a deixa estéril; o implante dos fragmentos sobre a medula remanescente não nos dá certeza de que os folículos desenvolvidos são do implante; e o implante em bolsa peritoneal (região ortotópica) é capaz de promover condições favoráveis ao bom desenvolvimento folicular em gatas. Sendo assim, o peritônio é sugerido como o melhor local para o implante ortotópico, e pode ser explorado para o xenotransplante em felinos até o momento.

Palavras-chave: foliculogênese, ovário, felinos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to perform ortotopic autotransplantation of ovarian cortex in domestic cats. On a pilot study, the thickness of the cortex slices (1mm) and the method of grafting were standardized. Then, five cats were used for the ovarian grafting. The ovarian cortex was completely removed from both ovaries, and cortex slices from one ovary were grafted on the remainder medulla of the contralateral ovary, while the other ovary was kept with only the medullar region as a control. Follicular development was observed on both ovaries, with lower number of follicles on the side with only the remainder medulla than on the side that received the cortex grafts. Primordial follicles were on a 200  $\mu\text{m}$  maximum depth, but removing slices of 1000  $\mu\text{m}$  (1 mm) still left cortex material enough to allow follicular development. This way, a second experiment was performed to compare the orthotopic implant directly on the medullar region with implants on peritoneal pockets (also considered orthotopic). Follicular development was observed on grafts on peritoneal pockets. However, antral follicles development still occurred on the medullar region.

Since the main objective of stablishing the technique of orthotopic transplantation of ovarian tissue in cats is to use de domestic cat as the surrogate for wild felines' ovarian tissue, it is essential that the development of follicles are exclusively from the graft. With this work we concluded that: removing 1 mm thick slices of ovarian cortex is enough to recover most primordial follicles, but not enough to render the queen infertile; grafting the cortex slices on the remainder medullar tissue does not guarantee that developing follicles are from the grafted tissue, and the implant on peritoneal pockets allow good conditions for follicular development in cats. This way, for now, the peritoneum is the best local for the orthotopic transplant of ovarian tissue, and may be a suitable site for the xenotransplantation of wild felines' ovarian tissue to domestic cats.

Key-words: folliculogenesis, ovaries, felines.

# 1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento das cidades e urbanização, os habitats dos animais silvestres vêm diminuindo consideravelmente; além de sofrerem com a poluição e caça esportiva. Com este quadro chegamos aos índices de que dentro da família *Felidae*, das 38 espécies existentes, sete estão em risco eminente de extinção, seis estão quase ameaçadas, 13 já há uma preocupação quanto à extinção e 12 estão vulneráveis, com as suas populações, em geral, decrescendo (dados recolhidos da Lista Vermelha, realizada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais, IUCN / The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 19/02/2017). Segundo Ballarotti et al. (2009), os pequenos felinos sul americanos que estão em cativeiro também apresentam baixo desempenho reprodutivo e estão em alto risco de extinção.

Como tentativa de preservar tais espécies, experimentos estão sendo realizados para criopreservar o material genético e resguardar a capacidade reprodutiva destes animais. O gato doméstico (*Felis catus*) é uma espécie em que não há risco de extinção e é atualmente o melhor modelo experimental para estudos que visam a aplicação em felinos selvagens (Moreira & Jacomini, 2005; Lopes, 2008).

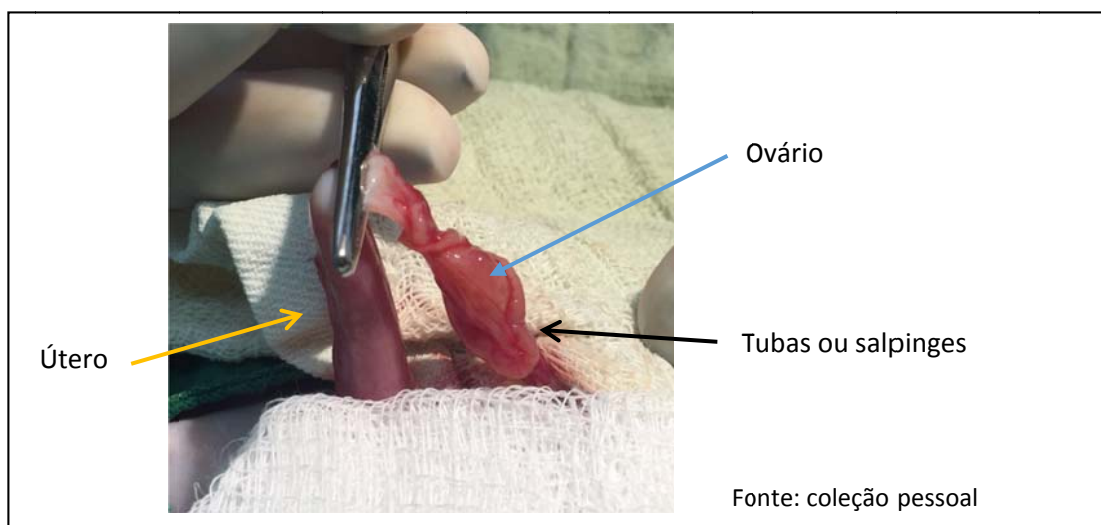
Os transplantes de tecido ovariano a fresco ou criopreservados são uma realidade na biotecnologia de preservação gênica e manutenção da capacidade reprodutiva de diversas espécies incluindo o homem. Snow et. al. (2002) também afirma que o xenotransplante ovariano (entre espécies diferentes) é uma alternativa na preservação de espécies. Estas técnicas, no entanto, ainda são bastante iniciais quanto aos felinos, necessitando do desenvolvimento e estudos aprofundados.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### Morfologia e função ovariana

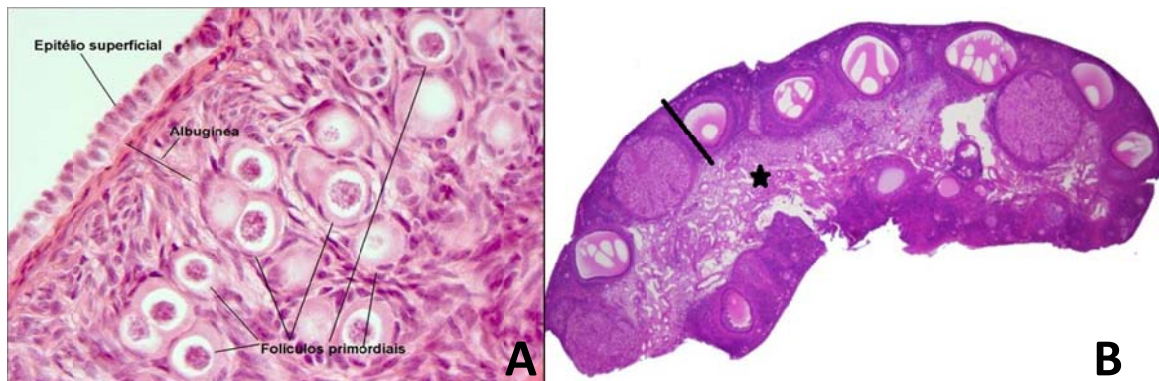
O sistema reprodutor feminino é constituído por um par de ovários, responsáveis pela produção de gametas e hormônios, um par de tubas uterinas (salpinges) que captam o oócito liberado pelo ovário e o encaminham para o útero, este recebe o óvulo (fertilizado) que será nutrido e promoverá seu desenvolvimento até o nascimento. A vagina serve como órgão copulador e como canal do parto; o vestíbulo é a continuação da vagina à vulva que é a parte mais externa do trato genital (Dyce, 2010). As estruturas internas estão ilustradas na figura 1. O foco deste trabalho está direcionado ao ovário, sendo assim esmiuçaremos as suas estruturas e funções para melhor entendimento.



**Figura 1.** Imagem de um ovário (seta azul) de gata hígida, tubas ou salpinges (seta preta) e corno uterino (seta amarela) durante procedimento de ovariosalpingohisterectomia.

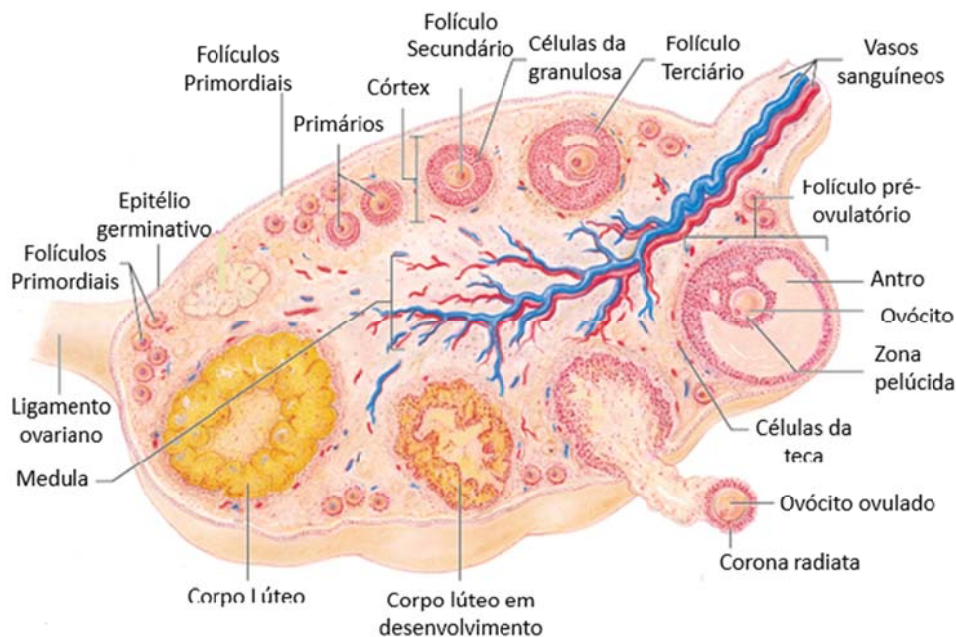
O ovário tem duas funções principais, a produção cíclica de oócitos fertilizáveis e a produção de hormônios esteroides (Lopes, 2008; Macedo et al., 2011). Em todas as espécies de mamíferos, a superfície ovariana é coberta por um epitélio simples pavimentoso ou cúbico, o epitélio germinativo. Abaixo dele, encontra-se a túnica

albugínea, uma camada de tecido conjuntivo denso, e abaixo desta localiza-se a camada cortical, onde se encontram os folículos ovarianos e corpos lúteos em vários estágios de crescimento e regressão; e a camada medular (porção interna de tecido conjuntivo, células musculares lisas, nervos, artérias e veias) (Lopes, 2008; Faustino et al., 2011; Junqueira e Carneiro, 2011). A estrutura do ovário é ilustrada nas figuras 2 e 3.



**Figura 2.** **A.** Imagem histológica corada com hematoxilina e eosina (HE) de um ovário mostrando o epitélio simples cúbico na superfície (epitélio germinativo); abaixo está a túnica albugínea, tecido denso. Após essas estruturas está a camada cortical com os folículos. Fonte: Adaptado de [www2.unifesp.br](http://www2.unifesp.br) Acesso em 15/03/2017. **B.** Imagem histológica HE de ovário inteiro de uma gata, mostrando a porção cortical (linha preta) e medular (estrela). Fonte: Adaptado de [http://www.uoguelph.ca/~rfoster/repropath/female/cat/normal\\_queen.htm](http://www.uoguelph.ca/~rfoster/repropath/female/cat/normal_queen.htm). Acesso em 16/05/2017.

Os folículos são parte da estrutura ovariana que permite ao ovário exercer suas duas funções (Macedo et al., 2011) e são classificados em pré-antrais ou antrais, de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Os folículos pré-antrais ainda se subclassificam em primordiais, de transição ou primários e secundários; os antrais se classificam em terciários ou pré-ovulatórios (Hulshof, et al, 1994; Macedo et al., 2011; Faustino et al., 2011). As disposições dos folículos em suas fases de desenvolvimento podem ser observadas na figura 3.

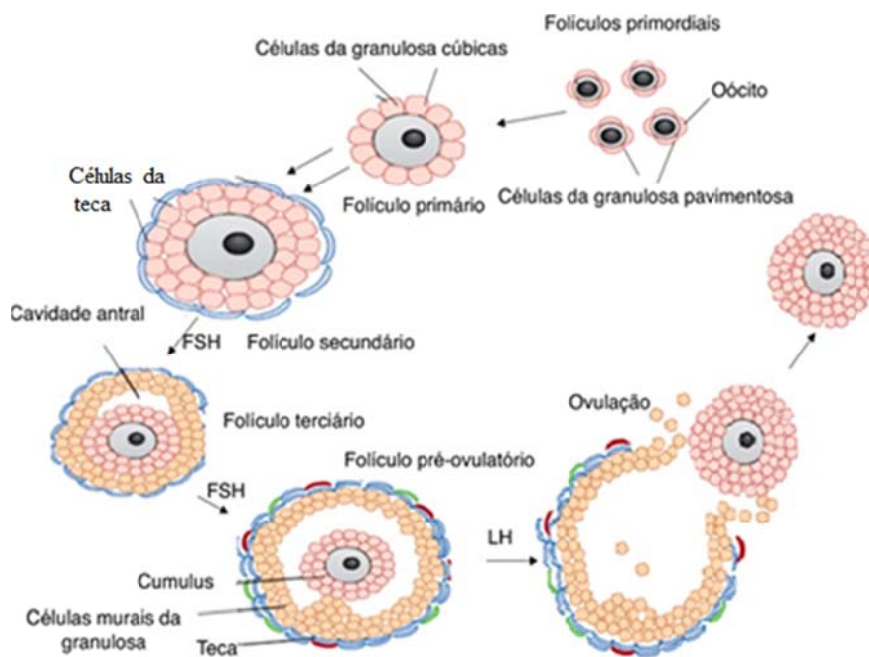


**Figura 3.** Representação esquemática de ovário de mamífero, ilustrando a região cortical (mais externa, contendo os folículos) e a região medular (mais interna, contendo vasos sanguíneos).  
 Fonte: Adaptado de <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>.  
 Acesso em 23/02/2016.

Durante o desenvolvimento fetal as células germinativas femininas (oogônias) sofrem mitoses (a quantidade é espécie-específica) e na maioria dos mamíferos encerram essa divisão próximo ao nascimento. As oogônias iniciam um processo de divisão meiótica se tornando ovócitos; no entanto, esse processo é interrompido na meiose I por um fator inibidor de meiose produzido pelas células foliculares em desenvolvimento (Cunningham, 2014). Em cabras, vacas e búfalos a foliculogênese se inicia pouco antes do nascimento; e em espécies como ratos e camundongos, logo após. Nesta etapa de desenvolvimento, todos os folículos são primordiais (Paulini et al., 2014, Cunningham, 2014). Cada ovócito primário é circundado por uma camada única de células pavimentosas, constituindo o folículo primordial, folículos quiescentes ou em repouso, formando um pool de reserva para toda a vida reprodutiva da fêmea. Estes

fóliculos irão se desenvolver até ovular ou sofrer atresia ou morte folicular, apenas uma pequena parte (0,01%) chega a ovulação. (Rodrigues et al., 2001, Sherwood, 2011, Paulini et al., 2014).

Com a ativação dos foliculos primordiais, as células foliculares cuboides ainda formando uma única camada de células, caracterizando o folículo primário. Em seguida, as células da granulosa se dividem por mitose, formando duas ou mais camadas ao redor do oócito, caracterizando o folículo secundário. Dependendo da espécie, o início da formação da zona pelúcida e da diferenciação das células da teca interna e externa a partir do tecido conjuntivo adjacente pode ocorrer no folículo primário ou secundário (Paulini, et al. 2014). À medida que os foliculos crescem certa quantidade de líquido, chamado líquido folicular, se acumula entre as células granulosas, formando o antro folicular e o folículo passa a ser chamado de terciário ou antral. Com o completo desenvolvimento das tecas, formação do cumulus oophorus ou corona radiata, que serve de apoio e envolve todo o ovócito, e pela presença do antro folicular, esse folículo passa a ser chamado pré-ovulatório (Junqueira e Carneiro, 2011, Paulini et al.,2014). Uma ilustração esquemática dos tipos de foliculos ovarianos e seu desenvolvimento é mostrada na figura 4.



**Figura 4.** Desenvolvimento folicular. Adaptado de Guerreiro, 2015.

A função endócrina dos ovários está inserida no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que regula as diferentes fases do ciclo estral da gata a partir da puberdade. O hipotálamo começa a liberar em pulsos o GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), agora capaz de estimular a liberação dos hormônios gonadotróficos pela hipófise, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio foliculo estimulante). Estes estimulam os ovários a produzir os esteróides sexuais (estradiol e progesterona), além de fatores de crescimento regulatórios tais como a inibina A e B, ativina, fator de diferenciação 9 (GDF-9), fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), que através de feedbacks positivos e negativos regulam o desenvolvimento e crescimento folicular, conseqüentemente o ciclo estral (Schally et al., 1971; Bristol et al., 2004; Bristol et al., 2006; Paulini et al., 2011).

O ciclo se inicia em uma fase anovulatória dividida em duas partes, proestro e estro. No primeiro há uma liberação de GnRH pelo hipotálamo induzindo a liberação de

FSH pela hipófise ocorrendo o recrutamento dos folículos e a sua conclusão termina no início do estro, em que as fêmeas se tornam mais receptivas e permitem o coito devido uma grande liberação de estradiol ( $E_2$ ) pelas células da granulosa dos folículos recrutados (3 a 7 folículos podem ser recrutados), ocorrendo o pico da atividade folicular e liberação de estradiol (Bristal et al.,2006).

O FSH auxilia na criação novos receptores para LH nas células da teca, pois o LH estimula estas células a captarem o colesterol e transformá-lo em andrógeno, este que com o auxílio da enzima aromatase será clivado em estradiol e liberado na corrente sanguínea pelas células da granulosa (Bristal et al.,2006; Barboza e Mota, 2010).

O estradiol é o principal esteroide produzido pelas células da granulosa no ovário, que age tanto no hipotálamo, quanto na hipófise, para promover o pico pré-ovulatório de LH. As células da granulosa também produzem uma glicoproteína chamada inibina B que vai atuar reduzindo os níveis séricos de FSH; dessa forma o folículo recrutado cresce mais que os demais (por ter mais receptores) que sofrem atresia, e consegue chegar a ovulação (Barboza e Mota, 2010).

As gatas são animais de ovulação induzida, e precisam, além do  $E_2$  para sensibilizar o eixo hipotálamo-hipófise, do estímulo físico do coito (reflexo neuro-endócrino) para que ocorra o pico pré-ovulatório de LH e, conseqüentemente, a ovulação. No entanto, já foi observado que pode ocorrer em menor escala uma ovulação espontânea entre gatas que convivem com outras fêmeas (Pelicam et al., 2006). Caso não tenha o estímulo e não ovule, ela retorna a fase anovulatória, denominado interestro. Havendo esse estímulo, há uma liberação de LH pela hipófise, o que promove a retomada da primeira meiose do oócito (Prófase I – Metáfase II), ovulação e a diferenciação das camadas da granulosa e teca, iniciando a produção de progesterona ( $P_4$ ). Com a ovulação as células da granulosa e teca remanescentes formam o corpo

lúteo; a fêmea se encontra agora no metaestro. O corpo lúteo vai produzir, além da progesterona, a inibina A que vai diminuir significativamente a liberação de LH e FSH. O corpo lúteo persiste 60 dias na gestação ou 40 dias no caso de não haver fertilização (pseudogestação); após este período, ele regride e a gata entra no anestro; fase em que os níveis de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub> estão muito baixos, e não há atividade sexual (Bristal et al., 2006; Barboza e Mota, 2010).

### **Criopreservação de tecido ovariano**

A criopreservação do tecido ovariano consiste no armazenamento e na preservação deste material biológico sob baixas temperaturas. Este procedimento vem sendo realizado principalmente em mulheres que são submetidas a procedimentos quimio e radioterápicos em idade reprodutiva; porém também há estudos realizados com o objetivo de aumentar o potencial reprodutivo de animais domésticos de alto valor genético e em animais com risco de extinção (Lopes, 2008; Macedo et al., 2011; Faustino et al., 2011; Scalercio et al., 2015).

Existem vários bancos de germoplasma no Brasil e no mundo visando a preservação de espécies com risco de extinção até que biotecnologias de reprodução tenham se desenvolvido o suficiente para a utilização desse material genético. Além da facilidade de intercâmbio dos materiais de diversas partes do mundo em prol da manutenção da espécie (Silva et al., 2012). Em 2010 foi inaugurado o Banco de Germoplasma de animais selvagens da América Latina no Zoológico de Brasília, que mantém preservados sêmen e embriões de diversas espécies.

Alguns fatores, no entanto, são críticos durante a criopreservação; dentre eles, o tipo da célula criopreservada, a taxa de resfriamento, o tipo de crioprotetor e a sua toxicidade, que levam ao sucesso ou fracasso da conservação dos fragmentos (Faustino

et al., 2011). Dessa forma, para avaliar a viabilidade do tecido ovariano e comprovar a retomada da função folicular após o descongelamento, utiliza-se de técnicas de cultivo *in vitro* ou *in situ* (transplante) (Faustino et al., 2011; Leonel, 2013).

O cultivo *in vitro* necessita do emprego de métodos muito eficazes de isolamento de folículos, para que os mesmos não sejam lesionados e sobrevivam até a fertilização. Sendo assim, é de extrema importância que sistemas de cultivo sejam utilizados para manter a sobrevivência e o crescimento destes folículos pré-antrais até a maturação. Podem ser utilizados ovários inteiros, fragmentos de córtex ovariano e folículos isolados como método de cultivo, porém para animais de médio e grande porte, o cultivo do ovário inteiro é desaconselhado, devido as suas dimensões. Em algumas espécies como bovinos, caprinos, babuínos e humanos já é realizado a ativação e crescimento de folículos pré-antrais com o cultivo *in situ*, pela vantagem de manter o contato dos folículos com o tecido ovariano e manter a integridade do material com uma taxa maior de sobrevivência e crescimento folicular (Rosetto et al, 2011).

Alguns artigos dizem que os resultados dos transplantes com material fresco são melhores que os criopreservados, pois há uma perda adicional dos oócitos durante o processo de congelamento e descongelamento (Bosch et al. 2004; Faustino et al., 2011). No entanto, outros estudos como o de Damasio (2011), que utilizou suínos em sua pesquisa, relatam que não há diferença significativa na utilização de implantes a fresco ou criopreservados nem há diferença estatística na viabilidade folicular ou taxa de folículos primordiais normais entre ovários expostos ou não a crioprotetores. Santos e colaboradores (2009), em seu estudo com cabras, ainda complementam que a perda de 50% dos folículos é causada pelo procedimento cirúrgico em si, o que lesiona os folículos em estágios iniciais, e não a criopreservação.



Mesmo com estes dados promissores do material criopreservado observados em humanos, por segurança, antes de utilizar material criopreservado é necessário padronizar as técnicas de transplante com material fresco (Faustino et al., 2011) com intuito de reduzir as perdas de folículos durante o processo de implantação e revascularização, definir o local ideal para o enxerto e qual a quantidade de tecido ovariana necessária para preservar a fertilidade, além de promover longevidade do implante (Scalercio et al., 2015).

### **Transplante Ovariano**

O transplante ovariano consiste na retirada total ou de parte do ovário de um doador e transferência para um receptor. Pode ser classificado quanto ao receptor, como auto (mesmo indivíduo), iso (animal geneticamente idêntico), alo (outro indivíduo da mesma espécie) ou xenotransplante (de outra espécie); e quanto à localização como ortotópicos (reimplantados próximos a localização anatômica original ou efetivamente na mesma região) ou heterotópico (longe da posição de origem) (Krohn et al, 1977).

O autotransplante já é uma alternativa promissora para restabelecer a função ovariana em pacientes com câncer que se tornaram inférteis por tratamentos quimio- e/ou radioterápicos (Ladanyi et al,2017; Van der Ven et al., 2016; Ceschin et al., 2004). Vale salientar que em humanos, mais de 80 crianças já nasceram através de enxertos de fragmentos corticais ovarianos criopreservados (Ladanyi et al., 2017).

O autotransplante pode ser ortotópico ou heterotópico. O transplante ortotópico apresenta a vantagem de possibilitar o restabelecimento da função reprodutiva normal e a concepção natural, enquanto que o heterotópico necessita obrigatoriamente de uma

fertilização *in vitro* mas apresenta a vantagem do fácil acesso para exame e remoção, quando necessário (Ceschin et al., 2004; Ferreira, 2005).

A localização anatômica escolhida para receber o transplante é um fator de grande importância, pois influencia diretamente em vários aspectos, dentre eles, o número e a qualidade dos oócitos viáveis, as injúrias sofridas pelo tecido transplantado, período de isquemia e formação de neovascularização (Macedo, 2011). Os locais mais utilizados para transplantes heterotópicos incluem a cápsula renal (Gosden et al., 1994; Bosch et al., 2004; Yang et al., 2006; Terazono et al., 2012a), o peritônio (Acampora et al., 2004; Prates, 2008; Damásio, 2011), o tecido subcutâneo (Yang et al. 2006; Damásio, 2011; Macedo, 2011; Wiedemann et al., 2012; Leonel, 2013) e a fáscia de diferentes músculos (Kim et al. 2004; Terazono et al., 2012ab). Já quando o tecido ovariano é implantado na sua localização natural, como em medula ovariana remanescente, no hilo ovariano ou na bursa ovariana, ou nas proximidades, como na parede abdominal (peritônio) ou no ligamento largo do ovário, com ou sem anastomose de vasos, o transplante é considerado ortotópico (Petroianu et al., 2004; Donnez et al., 2004; Petroianu et al., 2006; Santos et al., 2009; Macedo, 2011; Qing Li et al., 2015).

Especialmente em gatas, o autotransplante heterotópico na região dorsal do pescoço, proporcionou retomada da função ovariana, com desenvolvimento folicular, produção de estrógeno e comportamento de cio nas fêmeas, podendo ser útil para avaliar a eficácia de métodos de criopreservação (Leonel, 2013). No entanto, autotransplantes inseridos na região abdominal de gatas, como realizado por Crestana e colaboradores (2006), tiveram uma alta taxa de reabsorção e na análise histológica dos implantes só foram encontrados folículos primordiais e primários. Gosden e colaboradores (1994) também observaram desenvolvimento folicular e sinais de atividade endócrina no xenotransplante de fragmentos de córtex de gatas e ovelhas em

camundongos imunodeficientes. Achado semelhante foi obtido por Wiedemann e colaboradores (2012) que transplantaram córtex ovariano de leas para o tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos. Bosch e colaboradores (2004) ao realizar transplantes de tecido ovariano criopreservado de gatas para camundongos imunodeficientes, observaram uma porcentagem de sobrevivência de folículos de 10%, bem inferior ao observado em outros estudos.

Ao nosso conhecimento, não há literatura que relatam estudos de transplante ortotópico de córtex ovariano em felinos, no entanto, em humanos e em outras espécies já há resultados promissores, como relatado por Petroianu e colaboradores (2006), onde atestaram o retorno da função endócrina e reprodutiva de coelhas após autotransplantes ortotópicos e que a reanastomose vascular não é essencial para a retomada da função ovariana. O primeiro autotransplante ortotópico em grandes animais foi realizado em ovinos, porém a baixa vascularização e o tamanho do tecido ovariano foram dificuldades apresentadas (Ferreira, 2005). Em cabras, o cio foi observado por volta do 71º dia pós-transplante ortotópico, tanto com material a fresco quanto com o criopreservado (Santos et al., 2009). Em mulheres até o momento já foram computados mais de 80 nascimentos por autotransplante ortotópico de tecido ovariano criopreservado no mundo (Ladanyi et al., 2017).

A hipóxia é o principal fator responsável pela diminuição no tamanho do enxerto, com presença de fibrose e perda crítica de folículos nos primeiros dias após transplante (Bosch et al., 2004; Terazono et al., 2012b; Scalercio et al., 2015). A angiogênese de fragmentos de córtex ovariano humano transplantado para a região intraperitoneal de camundongos tem início dentro de, pelo menos, 5 dias pós-transplante, sendo necessários 10 dias para uma total vascularização e reoxigenação do transplante (Eyck et al., 2010). Em ratas, a neovascularização foi observada com 24 horas pós-transplante

na região retroperitoneal, porém devido ao processo inflamatório (edema, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno), por volta do 5º dia uma queda no número de vasos e, conseqüentemente, de folículos com retomada da vascularização no 7º dia (Acampora et al., 2004). Na fase de revascularização são liberadas espécies reativas de oxigênio e radicais como peróxidos, superóxidos e hidroxilas que se encontram livres na sua forma reativa, causando danos à membrana celular e perda folicular. A ação de substâncias antioxidantes, como a vitamina E, pode contribuir na redução dos danos celulares causados pela isquemia (Nugent et al., 1998). De acordo com Gosden e colaboradores (1994) a técnica de anastomose de vasos pode reduzir o tempo de isquemia de dias para minutos, porém estes mesmos autores afirmam que esta técnica demanda muito tempo e não é aplicável a pequenos animais.

Não há na literatura uma técnica padronizada para a retirada dos fragmentos do córtex ovariano de animais, há apenas a preocupação dos fragmentos terem uma espessura de 2 mm ou menos, no caso de passarem por criopreservação, pois facilita a penetração do crioprotetor o que resulta em menor dano às células durante o processo (Ferreira, 2005). Vários autores utilizaram fragmentos de 1mm e obtiveram bons resultados (Gosden et al., 1994; Santos et al., 2008; Pullium et al., 2008). Outros autores afirmam que a utilização de fragmentos ovarianos é melhor que os ovários inteiros, pois aumenta a viabilidade ovariana (Acampora et al., 2004; Petroianu et al., 2006).

Scalercio e colaboradores (2015), em estudo realizado em macacas, comentam da utilização de uma adaptação da técnica “trap door” como procedimento ideal para obter fragmentos de tecido ovariano, uma vez que retira apenas a camada cortical do ovário, onde estão os folículos pré-antrais nos seus estágios de desenvolvimento, sem afetar a capacidade reprodutiva da fêmea. Pullium e colaboradores (2008) e Donnez e colaboradores (2004) preferem, no entanto, utilizar blocos ovarianos no transplante, ao

invés das tiras de córtex, pois na primeira técnica detém um tempo cirúrgico de 0,5 hora, enquanto que na segunda este tempo se estende para 2,5 horas de procedimento. Silber et al. (2005) utiliza a técnica de dissecação da parte cortical ovariana, tanto da doadora quanto da receptora, para implantar tiras de córtex sobre a camada medular.

Neste trabalho nos embasamos nas técnicas já realizadas e eficazes em humanos para a padronização de uma técnica de transplante de tecido ovariano em gatas domésticas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Com os desmatamentos, urbanização e a caça desenfreada está havendo uma diminuição na biodiversidade do planeta. Levando em consideração que dentro da família *Felidae* a maioria dos felinos apresenta algum grau de risco de extinção e que o gato doméstico não está inserido nessa perspectiva, é importante criar alternativas de assistência a reprodução e preservação da genética, além da preservação dos habitats destes animais. O *Felis catus* (gato doméstico) é um ótimo modelo para os estudos experimentais que têm como objetivo final a aplicação nos felinos selvagens e consequente preservação dos mesmos.

O armazenamento das gônadas e gametas criopreservados em bancos de germoplasma já é uma realidade e estudos estão sendo realizados desde a década de 40 para reintroduzi-los e restaurar a capacidade reprodutiva de fêmeas com infertilidade adquirida ou animais em risco de extinção. Esta reativação dos gametas congelados tem um melhor desenvolvimento quando realizado *in vivo* (transplantes), quando comparado ao método *in vitro*, pois são estruturas frágeis com necessidades específicas, que ainda não são totalmente elucidadas.

Os transplantes de ovário proporcionam o retorno da função endócrina, normalizando os níveis hormonais de uma fêmea estéril, sendo implantado ortotopicamente ou heterotopicamente.

Os implantes ortotópicos, inseridos na região de origem ou próximo dela, estão bem estabelecidos na espécie humana, com muitos resultados de sucesso. Este tipo de transplante detêm uma grande vantagem, pois além de proporcionar uma melhor e mais rápida revascularização, podem permitir o restabelecimento da função reprodutiva e a concepção natural, enquanto que o heterotópico necessita de uma fertilização *in vitro* mas apresenta a vantagem do fácil acesso. Ressaltando que em humanos os nascimentos

só foram obtidos com os transplantes ortotópicos. Em felinos, existem poucos estudos acerca de transplantes ovarianos, não havendo nenhum sobre transplante ortotópico, nem a comparação entre eles para a determinação do melhor procedimento a ser realizado visando a preservação de espécies no futuro próximo.

## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

- Desenvolver uma técnica de transplante ortotópico de córtex ovariano em gatas domésticas.

### **Objetivos Específicos:**

- Otimizar uma técnica de retirada da porção do córtex ovariano de gatas e padronizar a técnica cirúrgica para transplante ortotópico;

- Avaliar o transplante ortotópico de tecido ovariano de gatas domésticas por meio de exames ultrassonográficos, histologia e comportamento de cio nos animais transplantados;

- Comparar diretamente a eficácia dos transplantes ortotópicos (*in loco* e em bolsa peritoneal) de gatas domésticas.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Fase 1 – Padronização e realização de transplantes ortotópicos em gatas domésticas**

- Mensuração da espessura do córtex ovariano de gatas

Foram utilizados 4 ovários para padronização da espessura de córtex ovariano em gatas. Os ovários foram coletados em estabelecimento veterinário devidamente preparado para procedimentos cirúrgicos, provenientes de gatas que passaram por ovariosalpingohisterectomia eletiva, pertencentes à rotina cirúrgica do local. Foram realizados cortes de 1mm, para análise histológica dos fragmentos e identificação e mensuração das regiões cortical e medular do ovário.

Para a preparação das lâminas o material foi fixado em paraformaldeído 4%, desidratados, diafanizados e foram feitos blocos de parafina, cortados na espessura de 5µm, e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz e a área de córtex mensurada e fotografada.

- Padronização da técnica de transplante ortotópico

Foram utilizadas 10 gatas, todas saudáveis e pertencentes a proprietários (cientes do procedimento), que realizaram ovariosalpingohisterectomia eletiva em estabelecimento veterinário, seguindo o procedimento pré-anestésico e anestesia geral inalatória e cirurgia de rotina do local.

Fragmentos do córtex ovariano foram retirados, no sentido longitudinal e transversal do ovário, para identificar em qual direção seriam obtidos fragmentos mais uniformes, na espessura e comprimento, para facilitar a fixação na medula remanescente.



Os fragmentos foram imediatamente reimplantados na medula remanescente, por diferentes métodos (pontos simples nas extremidades, pontos cardeais, adesão com o coágulo de sangue) e utilizando materiais de ação coagulante/adesiva (Hemospon® e Tissucol® Kit da marca Baxter), para padronização do procedimento cirúrgico. Foram avaliados o tempo de coagulação após remoção do córtex, adesão dos fragmentos de córtex à região de medula e a eficácia e real necessidade de utilização dos diferentes compostos/materiais para promover a adesão dos tecidos. Em seguida, foi realizada ovariosalpingohisterectomia.

- Autotransplante ortotópico de tecido ovariano de gatas

#### Animais

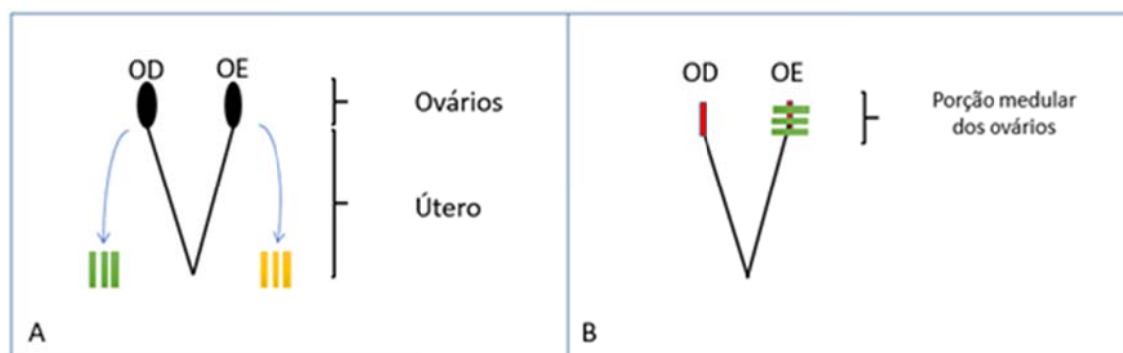
Todo o procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, protocolo nº 33943/2015.

Foram utilizadas 5 gatas adultas, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses do Distrito Federal (CCZ-DF). Inicialmente cada gata passou por exame clínico e hematológico, para constatar higidez. Os animais foram vermifugados e passaram por um período de adaptação ao ambiente de no mínimo 2 meses. Durante todo o experimento, foram mantidos no gatil do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas - UnB, em gaiolas individuais (62x81x50cm), seguindo os critérios do CONCEA. As gatas eram alimentadas com ração comercial seca de acordo com suas necessidades corporais e água fresca *ad libitum*.

### Realização do autotransplante ortotópico de tecido ovariano de gatas

Para técnica de autotransplante ortotópico, foi utilizado procedimento de pré-anestésico com quetamina (3mg/kg) e xilazina (0,3mg/Kg) intramuscular, indução com propofol (5mg/kg) pela via endovenosa e manutenção com isoflurano, analgesia transcirúrgica com cloridrato de tramadol (2mg/kg) e meloxicam (0,1mg/kg) e antibioticoterapia preventiva com ceftriaxona (25mg/Kg). As cirurgias foram realizadas na Sala de Cirurgia Experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas IB-UnB, pela médica veterinária Liudimila Passos Gonçalves (CRMV-DF 2632).

Os córtex dos dois ovários foram retirados e os fragmentos (de 1 mm) do lado direito foram implantados ortotopicamente na medula ovariana contralateral (lado esquerdo); o ovário direito se manteve apenas com a porção medular (figura 05). Foi utilizada a mesosalpinge para recobrir os fragmentos implantados na porção medular afim de mantê-los na posição desejada e impedir que aderências se formassem diretamente eles e a sua possível perda por traumas ou excesso de movimentação, visto que são estruturas frágeis e friáveis.



**Figura 05.** Desenho esquemático do procedimento experimental. (A). Fragmentos de córtex ovariano sendo retirados (fragmentos do lado direito em verde e fragmentos do lado esquerdo em amarelo). (B). Implantação dos fragmentos do córtex ovariano direito (verde) na porção medular do ovário esquerdo (vermelho).

### Acompanhamento dos animais e recuperação dos fragmentos ovarianos

Os animais foram numerados de 1 a 5 e avaliados quanto a dor/desconforto pós-operatório e cicatrização. Foi administrado Azicox® (azitromicina - 20mg/kg e meloxicam - 0,1mg/kg) via oral durante 3 dias e tramadol (2mg/Kg) pela via subcutânea 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram acompanhados com avaliação ultrassonográfica semanal (Mindray M5 100 a 200 V CA, 50/60Hz, >2,0 A, transdutor micro convexo de 5 a 8 MHz) e comportamental diária. A cirurgia para remoção dos implantes e consequente castração dos animais foi realizada com 28, 35 e 42 dias após o transplante, sendo 1 ou 2 gatas por grupo. Os fragmentos ovarianos foram fixados em paraformaldeído 4% por 72 horas e processados para avaliação histológica conforme descrito anteriormente.

Devido aos resultados obtidos, optamos por realizar uma segunda fase, aprimorando a técnica de retirada dos fragmentos corticais e implantação dos mesmos, comparando diferentes sítios no mesmo animal para atestar a eficiência do melhor local para implantação.

### **Fase 02 – Comparação entre sítios de implante ortotópico em gatas domésticas**

#### Animais

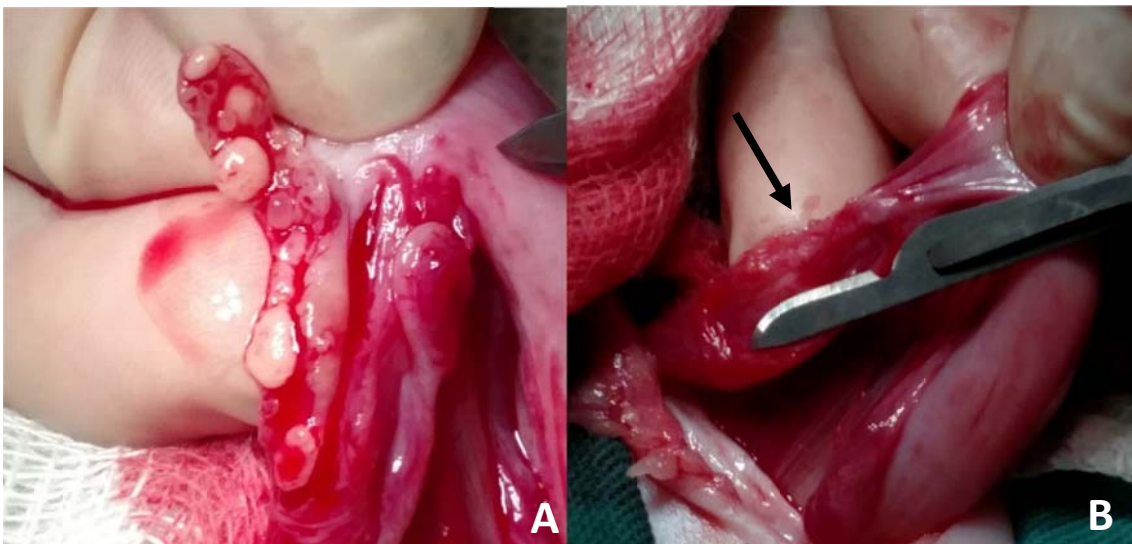
Foram utilizadas 4 gatas adultas, provenientes do CCZ-DF. Cada gata foi ambientalizada por 2 meses no mínimo e foram realizados exames clínico e hematológico, para constatar higidez. Assim como os animais da fase 01, estes também foram mantidos no gatil do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas - UnB, em gaiolas individuais (62x81x50cm), seguindo os critérios do CONCEA. As gatas eram

alimentadas com ração comercial seca de acordo com suas necessidades corporais e água fresca *ad libitum*.

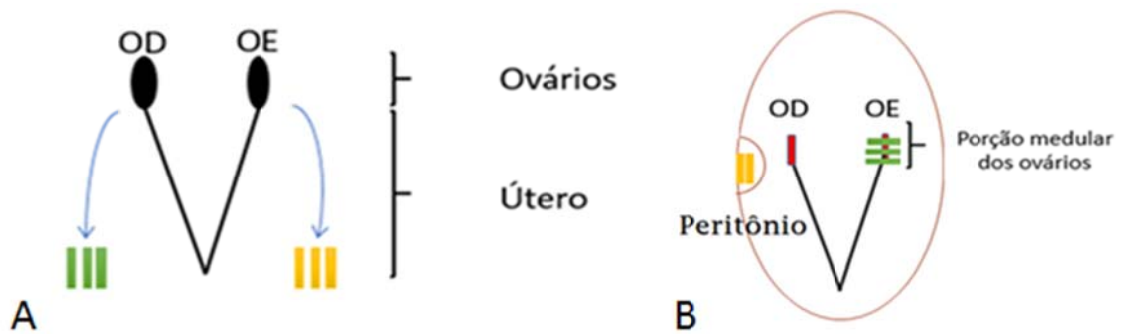
#### Realização dos transplantes ortotópicos (*in loco* e em bolsa peritoneal)

Foi utilizado o mesmo protocolo anestésico descrito na fase 1.

Os fragmentos de 1 mm da camada cortical foram removidos e a incisão foi aprofundada, retirando praticamente toda a estrutura ovariana (figura 6), e os fragmentos do lado direito fixados com suturas simples na porção medular do ovário esquerdo. Os fragmentos do ovário contralateral foram implantados em uma bolsa peritoneal (realizada pela incisão do peritônio, formando uma saculação entre a musculatura e o próprio peritônio) localizada ao lado do ovário direito (considerado ortotópico), sem suturas nos fragmentos, apenas para a oclusão da bolsa. Um esquema do desenho experimental pode ser observado na figura 7.



**Figura 6.** **A.** Folículos observados a olho nu em primeira incisão no córtex ovariano. **B.** Porção medular do ovário de gata após a retirada da camada cortical (mais profundamente) e realizado desbridamento (seta).



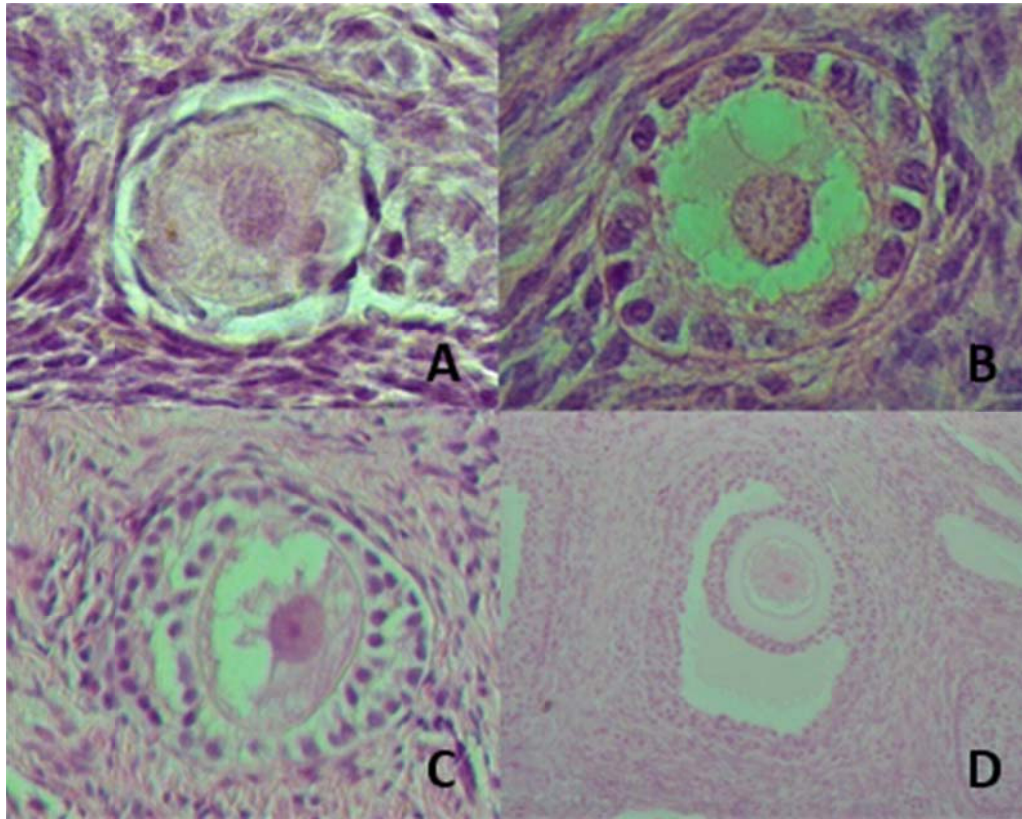
**Figura 7.** Desenho esquemático do procedimento experimental da Fase 2. A. Retirada dos fragmentos do córtex ovariano de ambos ovários (verde, fragmentos do ovário direito e amarelo, fragmentos do ovário esquerdo). B. Implantação dos fragmentos do ovário direito sobre a porção medular no ovário esquerdo e os fragmentos do ovário esquerdo em bolsa peritoneal próximo ao ovário direito.

#### Acompanhamento dos animais e recuperação dos fragmentos de córtex

Os mesmos cuidados e medicações pós-operatórias da fase 1 foram realizados na fase 2 e os animais avaliados quanto ao comportamento diariamente, durante 63 dias. Ao fim deste período foi realizada a castração e retirados todos os fragmentos transplantados. Estes foram fixados em paraformaldeído 4% e encaminhados para processamento histológico como realizado na fase 1.

#### Análise dos fragmentos

Após o processamento de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados, na espessura de 5µm. Um a cada 20 cortes foi montado em lâmina de vidro, corado com HE e analisados ao microscópio de luz. Os folículos ovarianos foram contados e classificados como primordiais ou em crescimento (primários e secundários), e morfologicamente normais ou degenerados. Na figura 8, observamos folículos normais em diferentes graus de desenvolvimento observados no material analisado.



**Figura 8.** Folículos de gatas corados em HE **A.** folículo primordial normal. **B.** Folículo primário. **C.** Folículo secundário. **D.** Folículo terciário.

### Análises estatísticas

O número de folículos por  $\text{mm}^3$  e a porcentagem de folículos de cada categoria, foram comparados entre os fragmentos de ovário transplantados nas diferentes localizações. Os dados de número de folículos por  $\text{mm}^3$  foram transformados para  $\log(X+1)$  e analisados por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os dados de porcentagem foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .

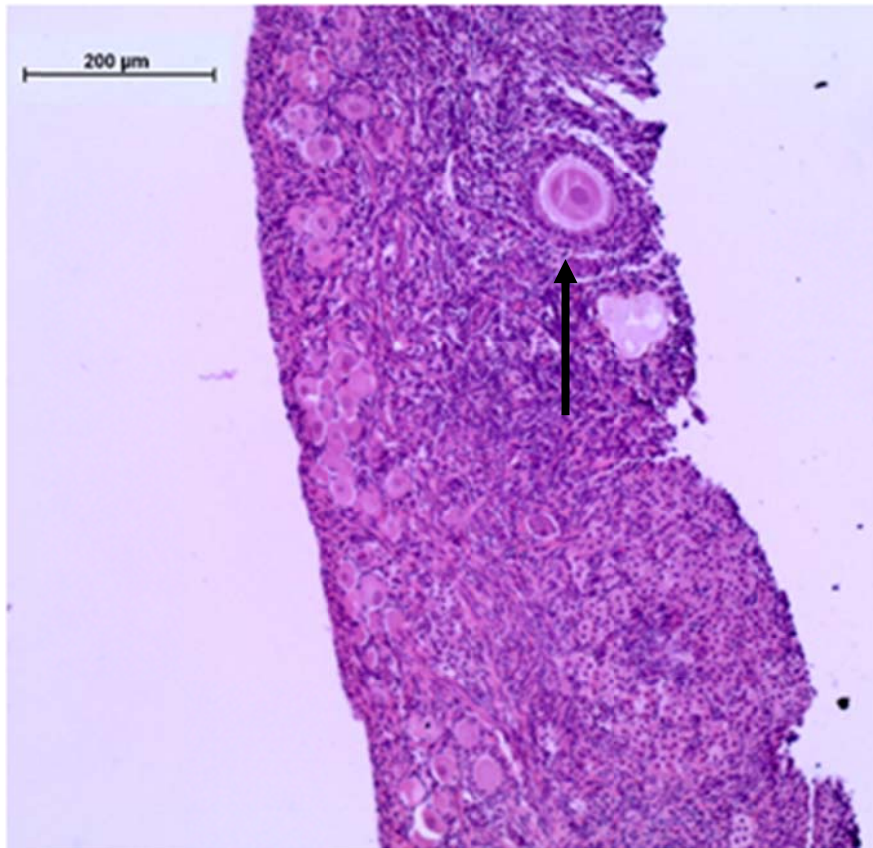
## **6. RESULTADOS**

### **Fase 1 – Padronização e realização de transplantes ortotópicos em gatas domésticas**

- Mensuração da espessura do córtex ovariano de gatas

Foi avaliada a espessura do córtex ovariano de quatro ovários através de análise histológica e observamos que fragmentos de 1 milímetro são suficientes para retirar toda a porção do córtex e manter a porção medular em ovários de gatas domésticas. Evidenciando que os folículos primordiais se encontram numa profundidade média de 200 $\mu$ m e os demais folículos em desenvolvimento podem ser igualmente retirados com uma incisão de 1 milímetro de espessura (figura 9). Observamos também que há a possibilidade de folículos antrais terem diâmetros maiores que a própria espessura cortical e transpassam este valor, no entanto, ao realizar o corte e desbridamento da região, os mesmos são lesionados e ocorre, conseqüentemente, a sua morte. Além destes fatores, a medula não se dispõe de forma linear dentro do ovário, gerando espessuras corticais variáveis num mesmo ovário.

A porção remanescente após a retirada de uma camada de 1mm tinha coloração vermelho mais intenso, uniforme e linear, parecendo a continuação do ligamento ovariano, diferente da superfície cortical, esbranquiçada, podendo ter ou não folículos visíveis a olho nu (como mostrado na figura 6).



**Figura 9.** Figura mostrando corte histológico de ovário de gata, mostrando os folículos primordiais na periferia do córtex, em aproximadamente 200 $\mu$ m de profundidade. Fragmento de córtex ovariano de aproximadamente 600 $\mu$ m, mostrando em seta preta um folículo localizado profundamente no corte. Arquivo pessoal

- Padronização da técnica de transplante ortotópico

A padronização da técnica de transplante foi realizada em 10 gatas e foi definido que a melhor forma para a retirada dos fragmentos de córtex ovariano é usar uma lâmina de bisturi número 15, inclinada a aproximadamente 45 graus no sentido longitudinal do ovário e cuidadosamente retirar três a quatro fragmentos uniformes medindo aproximadamente 1mm de espessura por 1 mm de largura por 5 mm de comprimento. Estes foram mantidos em gaze embebida em solução fisiológica para



mantê-los hidratados até o momento do transplante. Foi feita uma escarificação, com a lâmina de bisturi, da porção restante para se certificar de que todo o córtex havia sido removido.

A porção medular do ovário apresentou pequeno sangramento que cessou em aproximadamente 1 minuto, não havendo diferença significativa do uso de Hemospon® ou Tissucol® Kit da marca Baxter com o não uso destes materiais, mesmo quando há lacerações em pequenos vasos circundantes pela manipulação. É importante ressaltar que o tempo de coagulação observado aqui foi similar ao tempo de coagulação fisiológico aceitável em testes de hemocoagulação (50 a 75 segundos) (Day et al., 2001).

Para a fixação dos implantes, observou-se que a melhor opção foi a realização de dois pontos simples nas extremidades dos fragmentos, com fio caprofyl 4-0. A fixação com 4 pontos cardeais não se mostrou necessária, nem a adesão com coágulo de sangue.

Os animais foram castrados após os testes, aumentando o tempo cirúrgico em 10 minutos, totalizando 40 minutos, sem nenhum efeito deletério à saúde dos animais.

- Autotransplante ortotópico de tecido ovariano de gatas

Os fragmentos de córtex ovariano foram retirados com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15, em um ângulo aproximado a 45°, no sentido longitudinal do ovário. Os fragmentos retirados do ovário direito foram implantados na porção medular do ovário esquerdo. Este procedimento foi realizado em cinco gatas. O tempo cirúrgico foi de no mínimo 35 minutos e máximo de 60 minutos, variando de acordo com a conformação ovariana (maiores ou menores), presença de folículos antrais e sangramentos mais profusos que o de habitual, no caso, de duas gatas que estavam no cio no momento do procedimento.

- Acompanhamento dos animais e recuperação dos implantes

No exame ultrassonográfico, todos os animais apresentaram, em algum momento, estruturas hipocóicas sugestivas de folículos antrais (Figura 10), em ambos os lados, ou seja, tanto no lado que recebeu o córtex ovariano transplantado (esquerdo), quanto no lado que permaneceu apenas com a suposta medula ovariana (direito). Porém, os folículos do lado esquerdo geralmente eram menores ( $0,29\pm 0,11$  cm) e os folículos do lado direito eram maiores ( $0,37\pm 0,25$  cm). Os tamanhos de cada folículo e o momento em que foram detectados podem ser vistos nos quadros 1 a 5. Estes achados sugerem que restou tecido cortical na região ovariana remanescente.



**Figura 10.** Imagem ultrassonográfica dos ovários esquerdo e direito de um animal, na quinta semana pós-transplante. Mostrando a presença de dois folículos pequenos no lado esquerdo e um único folículo grande no lado direito.

Os animais que ficaram com os implantes por 28 dias (Quadros 1 e 2), apresentavam estruturas foliculares tanto no ovário esquerdo como no direito, a partir do 14º dia após a cirurgia, mas nem sempre acompanhadas de comportamento de cio. Um animal entrou no cio 15 dias após a cirurgia, durante o período de uma semana, e desenvolveu hidrossalpinge no lado direito (da medula remanescente) na segunda semana. O outro animal, após 7 dias da cirurgia, começou a apresentar indícios de cio

durante um período de uma semana, mas tais sinais não eram constantes. Este animal também desenvolveu hidrossalpinge, porém do lado esquerdo (que recebeu os implantes), a partir da terceira semana pós-cirurgia.

**Quadro 1.** Relação do tamanho ovariano e presença ou ausência de folículos antrais, com seus respectivos tamanhos, observados por ultrassonografia, do animal 1.

Se manas	OD		OE		Comporta mento de cio
	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	Compri mento ovariano	Tam anho dos folículos	
1 <sup>a</sup>	0,96cm	-	1,08cm	-	
2 <sup>a</sup>	1,0cm	<0, 19cm <0, 19cm <0, 19cm	1,01cm		X
3 <sup>a</sup>	1,0cm	0,2 3cm	0,63cm	-	
4 <sup>a</sup>	0,88cm	-	0,98cm	0,26c m	

**Quadro 2.** Relação do tamanho ovariano e presença ou ausência de folículos antrais, com seus respectivos tamanhos, observados por ultrassonografia do animal 2.

Se manas	OD		OE		Comporta mento de cio
	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	
1 <sup>a</sup>	1,0 cm	-	0,87cm	-	X
2 <sup>a</sup>	1,52 cm	0,7 7cm <0, 19cm <0, 19cm	1,23cm	0,2 2cm 0,3 4cm	
3 <sup>a</sup>	1,54 cm	0,8 5cm	1,10cm	<0, 19cm	
4 <sup>a</sup>	1,58 cm	0,7 6cm	0,78 cm	-	

A gata que ficou com os implantes por 5 semanas (quadro 3), apresentou cio persistente durante todo o período pós-transplante. O comportamento de cio dessa fêmea esteve sempre correlacionado com a presença de estruturas foliculares ao exame ultrassonográfico, em ambos os ovários.

**Quadro 3.** Relação do tamanho ovariano e presença ou ausência de folículos antrais, com seus respectivos tamanhos, observados por ultrassonografia do animal 3

Se manas	OD		OE		Comportam ento de cio
	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	
1 <sup>a</sup>	1,13 cm	-	1,12 cm	-	X
2 <sup>a</sup>	1,12 cm	0,41 cm	1,17cm	0,34 cm <0, 19 cm	X
3 <sup>a</sup>	1,12 cm	0,56 cm	1,09 cm	<0, 19 cm	X
4 <sup>a</sup>	0,99 cm	-	1,12 cm	0,19 cm 0,28 cm	X
5 <sup>a</sup>	1,09 cm	0,53 cm	1,42 cm	0,37 cm 0,35 cm	X

Já os animais que ficaram com os implantes por 6 semanas (quadros 4 e 5), não apresentaram comportamento de cio em nenhum momento, apesar de terem sido identificadas estruturas foliculares até a segunda semana pós-cirurgia. Após este período, não foram mais observadas estruturas hipocóicas ao exame ultrassonográfico.

**Quadro 4.** Relação do tamanho ovariano e presença ou ausência de folículos antrais, com seus respectivos tamanhos, observados por ultrassonografia do animal 4.

Se manas	OD		OE		Comportam ento de cio
	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	
1 <sup>a</sup>	0,97 cm	-	1,23 cm	-	-
2 <sup>a</sup>	0,98 cm	<0, 19 cm <0, 19 cm <0, 19 cm	0,73 cm	0,45 cm	-
3 <sup>a</sup>	0,84 cm	-	0,63 cm	-	-
4 <sup>a</sup>	0,71 cm	-	1,21 cm	0,45 cm	-
5 <sup>a</sup>	0,90 cm	-	1,04cm	-	-
6 <sup>a</sup>	0,94 cm	-	0,91 cm	-	-

**Quadro 5.** Relação do tamanho ovariano e presença ou ausência de folículos antrais, com seus respectivos tamanhos, observados por ultrassonografia do animal 5

Se manas	OD		OE		Comportam ento de cio
	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	Compri mento ovariano	Ta manho dos folículos	
1 <sup>a</sup>	1,05cm	-	1,01cm	-	-
2 <sup>a</sup>	1,82cm	0,56 cm	2,11cm	0,52 cm <0, 19cm	-
3 <sup>a</sup>	0,89cm	-	1,05 cm	-	-
4 <sup>a</sup>	0,78cm	-	0,84cm	-	-
5 <sup>a</sup>	1,21cm	-	1,20cm	-	-
6 <sup>a</sup>	0,78cm	-	0,73cm	-	-

Em todas as semanas em que o exame ultrassonográfico foi realizado não se observaram reação inflamatória local, líquido livre ou aderências; ao doppler não foram visualizados vasos sanguíneos significativos. Os fios de sutura utilizados no transplante ficaram visíveis até a terceira semana após a cirurgia.

No momento da segunda cirurgia, para a retirada dos transplantes, todas as gatas apresentavam algum grau de aderência nas imediações da região ovariana de ambos os lados (figura 11).



**Figura 11.** Imagem de aderência (omento sob a região dos implantes) observado durante a retirada dos mesmos e castração.

- Análise histológica dos implantes

Nos cortes histológicos, folículos pré-antrais foram encontrados em ambos os lados (Tabela 1). Apesar de numericamente sempre haver uma quantidade maior no lado esquerdo, onde estavam os transplantes, do que do lado direito, onde supostamente havia apenas tecido medular, não foi observada diferença estatística entre os sítios ( $P > 0,05$ ). Folículos antrais também foram encontrados nos cortes histológicos em ambos os lados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número total de folículos pré-antrais e antrais encontrados nos cortes histológicos do tecido ovariano proveniente do lado direito (supostamente apenas medula) e esquerdo (que recebeu os implantes de córtex).

Gata	Folículos pré-antrais		Folículos Antrais	
	Lado	Lado	Lado	Lado
	Direito (medula)	Esquerdo (implantes)	Direito (medula)	Esquerdo (implantes)
1	4500	5600	12	6
2	0	4900	0	21
3	2050	15300	26	24
4	50	3400	5	3
5	2450	8300	19	26
Média	1810	7500	12,4	16,0
D			10,5	10,7
P	1876	4708		

## Fase 2 - Comparação entre sítios de implante ortotópico em gatas domésticas

Em decorrência dos resultados encontrados na fase 1, a fase 2 foi delineada na tentativa de aperfeiçoar o transplante ortotópico na região medular do ovário, bem como de propor uma alternativa de implante ortotópico no peritônio.

A cirurgia foi realizada em 4 animais, como descrito, e houve um aumento no tempo cirúrgico de 10 minutos, em média, para implantação nos demais sítios. Os animais não apresentaram dor no pós-operatório, não havendo a necessidade de mudar o protocolo de medicação analgésica utilizado anteriormente.

Os animais foram observados por 63 dias. Duas gatas apresentaram sinais de cio e uma delas se tornou mais receptiva, porém sem os sinais clássicos de cio descritos na literatura.

Na avaliação macroscópica durante a cirurgia para a retirada dos fragmentos e castração foi observada aderência nas regiões ovarianas como na fase 1 e boa vascularização das estruturas implantadas na medula ovariana contralateral. Os fragmentos da bolsa peritoneal apresentaram comportamentos diferentes nos animais, estando hipertrófico (n=1), pouco atrofiado (n=1) e não visível macroscopicamente (n=2), aumentando a dificuldade de reavê-los, sendo necessária a retirada de uma porção da musculatura abdominal; o que não gerou dor adicional aos animais.

Na avaliação histológica dos sítios de transplante, foi observado que o número total de folículos primordiais foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) nos implantes do peritônio e no ovário esquerdo (que recebeu implantes de córtex) do que na medula remanescente do ovário direito, apesar de ainda haver folículos na medula remanescente. Já a porcentagem de folículos primordiais normais foi significativamente ( $P < 0,05$ ) maior na medula remanescente do ovário direito, seguido pelo ovário esquerdo (que recebeu implantes de córtex) e na bolsa peritoneal. Quanto ao número de folículos em crescimento e à porcentagem de folículos em crescimento morfológicamente normais, não houve diferença significativa entre os sítios ( $P > 0,05$ ). Estes resultados podem ser observados na tabela 2.



Após 63 dias do transplante, todas as gatas apresentavam folículos antrais em pelo menos um dos sítios avaliados (tabela 3). Folículos antrais foram observados na medula remanescente do ovário direito em 3 das 4 gatas (total de 8 folículos), no ovário esquerdo (que recebeu implantes de córtex) em 2 das 4 gatas (total de 8 folículos), enquanto que no peritônio apenas 1 folículo antral foi observado em 1 gata.

**Tabela 2.** Número absoluto de folículos primordiais e folículos em crescimento e porcentagem de folículos morfologicamente normais nos diferentes sítios avaliados.

Sítio	Número de Folículos/5mm <sup>3</sup>		% de Folículos Normais	
	Primordiais	Crescimento	Primordiais	Crescimento
Lado Direito (medula)	424±3 29 <sup>a</sup>	524±5 18	64 ±13 <sup>a</sup>	53±45
Lado Esquerdo (implante)	2432± 1681 <sup>b</sup>	1296± 1834	46±23 <sup>b</sup>	56±11
Peritônio	2655± 1322 <sup>b</sup>	1854± 1703	32±14 <sup>c</sup>	57±13

a-c: Valores com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,05).

**Tabela 3.** Número de folículos antrais observados na histologia em cada sítio avaliado após 63 dias dos transplantes.

Animal	Sítio		
	Lado Direito (medula)	Lado Esquerdo (implantes)	Peritônio
1	2	0	1
2	0	2	0
3	5	0	0
4	1	6	0

## 7. DISCUSSÃO

Considerando que a urbanização crescente e o aumento dos índices de poluição atingem diretamente a nossa fauna e que os números crescentes de espécies em risco de extinção na lista vermelha, realizada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais, atestam esta diminuição da diversidade genética, precisamos de técnicas para preservar e resguardar a capacidade reprodutiva destes animais. Dentre estas técnicas, a criopreservação de tecido ovariano representa uma boa opção para preservar células germinativas femininas pode ser posteriormente transplantado para animais de mesma espécie ou até de espécies diferentes (Pelicam et al., 2006). Snow et al. (2002) ainda afirma que os xenotransplantes são uma alternativa para a preservação de espécies. Os felinos não fogem a esta regra e os estudos direcionados à biotecnologia de preservação genética e reprodução desta família ainda são ínfimos.

A princípio optamos por adaptar uma técnica empregada em humanos, para a retirada do córtex ovariano de gatas e realização de um autotransplante ortotópico, avaliando a sua eficácia no desenvolvimento folicular. A localização anatômica dos implantes influi diretamente no desenvolvimento e morte folicular devido a diversos fatores, como o tempo de isquemia e neovascularização, presença de grandes vasos próximos, variações de temperatura e possíveis traumas (Macedo, 2011, Oktay et. al., 2004, Donnez et. al., 2004). Sabendo que a região ovariana é bem vascularizada, protegida na cavidade abdominal contra variações de temperatura e pressão e a proximidade com a cápsula renal que tem altas concentrações de fatores angiogênicos (Terazono et al., 2011a), acreditamos que o autotransplante ortotópico sob a porção medular ovariana seria o sítio de melhor desenvolvimento e menor morte folicular, pois

é o local de origem do implante, tem boa vascularização e é protegido pela cavidade abdominal, além de não haver neste caso variáveis relacionadas a rejeição do implante.

Como não há trabalhos relacionados a transplante ortotópico de tecido ovariano em gatas, como primeiro passo foi necessário padronizar a espessura de corte dos fragmentos corticais, baseados nos estudos histológicos, mostrando que cortes de 1mm, suficiente, para retirar toda a porção cortical. Também identificamos que os folículos primordiais se encontram numa profundidade máxima aproximada de 200µm em gatas, ao passo que esta região é de até 800µm em humanos (Donnez et al., 2013). Além disso, no caso de haverem folículos antrais com tamanhos superiores a 1mm, estes teriam sido incisados durante o procedimento. Levando em consideração que o ovário felino é muito menor que o humano, proporcionalmente seria retirada uma porção muito maior de tecido.

Já é difundida nos trabalhos com fragmentos de córtex ovariano humano a técnica de separação da porção cortical da medular, como relatado por Silber e colaboradores (2005 e 2008) e Donnez e colaboradores (2006). Esta técnica mostra a separação das duas porções mantendo uma espessura de no máximo 1mm de tecido, para uma melhor neovascularização, e a sutura sobre a porção medular quando houver ou sobre o istmo (parte das trompas de falópio). Como utilizamos o material fresco, foi decidido manter o padrão de 1 mm pois facilita a revascularização (Silber et. al., 2008).

Além disso, observamos em diversos trabalhos em diferentes espécies como em coelhos (Petroianu et al.,2004), ovelhas (Baird et al.,2004) e macacos (Lee et al., 2004) a preocupação dos fragmentos não serem superiores a 2 mm de espessura, principalmente se forem passar por um processo de criopreservação, pois permite uma boa penetração da solução crioprotetora.

Na primeira fase do nosso estudo optamos em testar a eficiência da técnica de autotransplante ortotópico sobre a medula remanescente em gatas, e deixamos um ovário apenas com a parte medular para acompanhamento, como forma de controle. Apesar dos cuidados de retirar fragmentos de 1mm de espessura, como determinado na primeira etapa do estudo, para nossa surpresa, após o transplante ortotópico houve crescimento de folículos antrais tanto do lado que recebeu os implantes de córtex, como do lado que permaneceu apenas com a região medular remanescente. O esperado era o desenvolvimento folicular no lado implantado e a cicatrização do lado contralateral sem qualquer folículo.

Em humanos, já é comprovado que o autotransplante ortotópico de fragmentos do córtex ovariano sobre região medular remanescente é capaz de restaurar a capacidade reprodutiva e hormonal, possibilitando a foliculogênese e consequente gestação (Donnez et. al.,2004; Donnez et. al. 2006), já tendo sido computados mais de 95 transplantes ortotópicos em 74 mulheres (Van der Ven et al., 2016). No entanto, nestes trabalhos, a medula remanescente sofre procedimentos quimio ou radioterápicos, sabidamente causadores de infertilidade. Além disso, a não ser por dosagens de hormônios e pela constatação de gestações naturais, o único tipo de avaliação que é realizada em alguns estudos, como no trabalho de Donnez e colaboradores (2011), é a avaliação ultrassonográfica da região em que o tecido foi transplantado. Oktay (2006) também afirma que as pacientes não são monitoradas de perto no período pós transplante, o que pode haver a ovulação do ovário contralateral ou porção de tecido ovariano remanescente gerando uma gestação. Em alguns estudos, há a avaliação histológica da medula que receberá os fragmentos de córtex transplantados antes dos transplantes, para a comprovação da infertilidade pós quimioterapia (Donnez et al.,

2004), ou apenas antes de receber o tratamento quimioterápico, para fazer a contagem de folículos, como realizado por Donnez et al. (2012).

Scalercio e colaboradores (2015) notam que a retirada de fragmentos corticais em macacas não as deixam inférteis. De fato, Oktay (2006) descreveu que houve ovulação e gestação natural, gerando um filho, em uma mulher que recebeu um transplante heterotópico (subcutâneo) de ovário. Este autor sugere que o tecido ovariano transplantado em sítio heterotópico pode ter de alguma forma estimulado o ovário remanescente que estava sendo considerado infértil há 2 anos. Vale ressaltar que quando os transplantes de tecido ovariano são realizados em mulheres que passaram por tratamento de câncer, o objetivo final é obter uma gestação, como valorizado nos trabalhos de Donnez e Dolmans (2015), não importando se o oócito ovulado provém do tecido transplantado ou do tecido ovariano remanescente possivelmente estimulado no procedimento cirúrgico e pela terapia hormonal concomitante. No entanto, em felinos, cujo interesse maior é utilizar o gato doméstico como receptor de xenotransplante de outros felinos, esta opção não pode ser considerada. Podemos em um outro trabalho submeter as gatas a processos quimioterápicos ou radioterápicos como realizado nas mulheres com câncer, afim de deixá-las inférteis e testar o implante ortotópico sobre a medula ovariana, caso não haja crescimento folicular, poderemos voltar a considerar essa técnica para o xenotransplante.

Os folículos antrais desenvolveram rapidamente, em aproximadamente 15 dias e permaneceram visíveis ao exame ultrassonográfico por duas a cinco semanas, tanto do lado implantado quanto do lado somente com a medula remanescente. Isto está de acordo com as explicações de Campbell e colaboradores (2000) que dizem que a retirada dos fragmentos ovarianos provoca um aumento do FSH sérico, pois os índices de inibina (produzida pelos ovários) caem significativamente, alterando o recrutamento

e provocando um crescimento exagerado dos folículos e/ou prolongamento da fase folicular, o que foi observado em ovelhas autotransplantadas. Este desbalanço de fatores inibitórios e estimulantes, que provoca uma ativação folicular em larga escala pode acabar mais rapidamente com o pool de reserva e/ou formar folículos maiores (Campbell et al., 2000; Donnez et al., 2007). Donnez e colaboradores (2008) complementam que a estimulação precoce dos folículos se dá ainda pela ação diminuída do hormônio anti-mülleriano, pois é produzido pelos folículos pré-antrais que foram lesionados durante a retirada dos fragmentos, e o estresse isquêmico e oxidativo.

Dentre os animais da primeira fase, uma gata apresentou sinal de cio na primeira semana, outra na segunda semana e uma terceira se manteve no cio durante 5 semanas, iniciando já na primeira semana após transplante até a cirurgia de castração. No entanto, como as gatas ao entrar no estro estavam em mesmo ambiente e elas se estimulavam, é provável que nas duas gatas que entraram no cio, uma única vez tenham ovulado e entrado no diestro (média de 40 dias). De fato, a análise histológica dos fragmentos retirados com 4 semanas mostrou presença de corpos lúteos em ambas as gatas. Já o animal que se manteve no cio durante 5 semanas ininterruptas, apresentou folículos em ambos os lados, com crescimento contínuo durante todo este período, o que pode caracterizar cistos foliculares. Vale acrescentar que Bristol & Woodruff (2006) descrevem que cistos foliculares na região medular de gatas e felinos não domésticos podem ocorrer.

Alterações como a hidrossalpinge que ocorreu nos animais 1 e 2 também foram observadas por Petroianu e colaboradores (2003) em seu estudo com coelhas; que relataram como possível causa a presença de aderências tubo-ovarianas e processo inflamatório, o que inviabilizariam a gestação.

Por termos deixado um dos lados com apenas a medula remanescente, como controle, pudemos provar que existe tecido cortical e folículos com capacidade de desenvolvimento no tecido restante. Assim, não podemos afirmar que o ótimo desenvolvimento folicular observado no lado implantado se deva exclusivamente aos fragmentos de córtex transplantados. Desta forma, a segunda fase do trabalho foi delineada com o intuito de tentar retirar completamente o córtex, aprofundando os cortes, deixando realmente apenas um leito de tecido medular para receber os transplantes, e ainda realizar transplantes ortotópicos no tecido peritoneal, onde certamente não há tecido ovariano.

Das 4 gatas transplantadas na fase 2, três animais apresentaram sinais de cio a partir da segunda semana pós cirurgia, semelhante ao observado nos animais da fase 1, o que condiz com o achado por Leonel (2013), que observou cio em uma das gatas do seu estudo com transplantes heterotópicos. Durante a castração, foi observado nos animais que entraram no cio, um folículo no ovário direito numa gata, um folículo no lado esquerdo em outra e a região medular remanescente (lado direito) aumentada de tamanho em outra, no entanto não podemos associar o cio destes animais a estes folículos, pois na análise histológica novamente foram encontrados folículos antrais tanto no lado direito (região medular remanescente) quanto no lado esquerdo (onde foram implantados os fragmentos de córtex).

O número total de folículos por  $\text{mm}^3$  foi maior no peritônio e no ovário esquerdo do que na medula remanescente do ovário direito, como esperado, pois os folículos primordiais se encontram a uma profundidade máxima aproximada de 200  $\mu\text{m}$ , retirados com o corte de 1 mm do córtex. Já o OD, como não recebeu implantes, os folículos lá encontrados são resultado de resquílios de córtex que não foram completamente retirados no procedimento ou presentes na medula, como observado por Yin e

colaboradores (2016a, 2016b) e Kristensen e colaboradores (2010) em mulheres, em que foi possível cultivar folículos a partir do tecido medular ovariano; o que é promissor para as mulheres mais jovens que passam por tratamento oncológico.

Durante a contagem e classificação dos folículos foi observado que a porcentagem de folículos primordiais normais era maior no ovário direito do que nos outros sítios. Isso se deu provavelmente pela isquemia sofrida pelos fragmentos transplantados, o que não ocorreu no lado direito, pois não recebeu implante, como visto Bosch e colaboradores (2004), Terazono e colaboradores (2012b) e Scalercio e colaboradores (2015) em seus trabalhos que mostram a morte crítica de folículos nos primeiros dias pós implante por hipóxia. Eyck e colaboradores (2010) ainda complementam que é necessário 5 a 10 dias para uma total revascularização dos implantes realizados em camundongos.

Quanto aos folículos em crescimento dos três sítios, não houve diferença significativa. Assim, podemos sugerir que passado o tempo de isquemia e neovascularização, os folículos de tecido transplantado são capazes de se desenvolver, indicando ainda que o peritônio é um local viável para o transplante. No entanto, o transplante sobre a medula remanescente não nos dá a segurança de que o folículo em crescimento é proveniente do transplante e não é fruto de um tecido residual de córtex. Vale ressaltar que há a possibilidade de que após passar por tratamentos quimio ou radioterápicos as gatas fiquem inférteis e este método se torne seguro para tal.

Em humanos, foram observados diversos trabalhos que atingiram sucesso do desenvolvimento folicular através de implantes ortotópicos em bolsas peritoneais, tanto com tiras como com cubos de córtex ovariano (Donnez et al. 2006; Donnez et. al. 2008; Donnez et al. 2011). Entretanto este parece então ser um local mais seguro para os transplantes em felinos.



O objetivo da nossa equipe de pesquisa a longo prazo é realizar um xenotransplante de um grande felino em risco de extinção para uma gata doméstica, desenvolver seus folículos e efetuar uma fertilização *in vitro*. Para isso o implante na região peritoneal pode ser um sítio que promove condições ao bom desenvolvimento folicular, além de prover segurança que o folículo ali presente é realmente da doadora. Para acessar os fragmentos foi realizado a laparotomia, diferente dos procedimentos realizados por Donnez e colaboradores (2011) que tem o método da laparoscopia, muito menos invasivo. Seria interessante ainda, desenvolver o método de laparoscopia nos felinos para reduzir o tempo de recuperação, o uso de medicações pós cirúrgicas, o estresse ao animal e conseguir reaver os fragmentos da mesma maneira.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível concluir que o transplante ortotópico (tanto sobre a medula como no peritônio) em gatas promove um bom desenvolvimento folicular e retorno do comportamento reprodutivo. Constatamos também que a retirada de fragmentos de 1mm de espessura conseguem transmitir a maioria dos folículos primordiais (que estão numa profundidade de até 200 $\mu$ m), porém não os retira completamente e os folículos, do tecido residual, também são capazes de se desenvolver até folículos antrais.

No futuro a perspectiva é utilizar estes sítios para um xenotransplante de tecido ovariano de outros felinos, no entanto, em relação ao transplante ortotópico na medula, não seria possível afirmar com segurança se os folículos antrais possivelmente desenvolvidos seriam do felino em risco de extinção ou da gata doméstica que está recebendo os fragmentos de córtex ovariano. Assim, o transplante ortotópico no peritônio seria a melhor opção para tal. Sugere-se ainda mais estudos para desenvolver laparoscopia para a realização e receptação dos implantes, por ser uma técnica menos invasiva como vem sendo realizado em humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acampora, A. J., Tramonte, R., Manoel, F. S., Schmidt, R. R., Muller, C. T., Silva, H. T., Oliveira, A., Raymundi, S. D., **Análise histológica da viabilidade do transplante autólogo de hemi-ovário em retroperitônio de ratos**. Acta Cir Bras [serial online] 2004 Jul-Ag;19(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> [também em CD-ROM].
- Baird, D. T., Campbell, B. K., Souza, C., Telfer, E. E. **Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips**. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, v. 113, p. 55-59, 2004.
- Ballarotti, D. T., Moraes, W., Oliveira, C. A., Felipe, E. C., Moreira, N. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, Brasil, v. 46, n. 6, p. 465-473, 2009. ISSN 1678-4456.
- Barboza, C. A. & Mota, M. T. S., **Reprodução Humana**. Editora UFRN, Natal-RN, 2ª edição, 2010.
- Bosch, P., Hernandez-Fonseca, H. J., Miller, D. M., Wininger J. D., Massey J.B., Lamb S. V., Brackett B. G. **Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice** Theriogenology, v. 61, n. 2, p.581-594, 2004.
- Bristol, S. K. & Woodruff, T. **Follicle-Restricted Compartmentalization of Transforming Growth Factor b Superfamily Ligands in the Feline Ovary**. Biology of reproduction. v. 70, p. 846-859, 2004.
- Bristol-Gould, S., Woodruff, T. K., **Folliculogenesis in the domestic cat (Felis catus)**. Theriogenology. v. 66, p. 5-13, 2006.
- Campbell, B. K., Telfer, E. E., Webb, R., Baird, D. T. **Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis**. Molecular and Cellular Endocrinology v. 163, p. 131-139, 2000.
- Ceschin, A. P., Biondo-Simões, M. L. P., Thomaz, B. A. C., Totsugui, J. **Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos**. Acta Cir. Bras., São Paulo, v. 19, n. 1, p. 27-30, 2004.
- Crestana, F. M., Jacomini, J. O., Beletti, M. E., Silva, J. M. Da, Lima, C. A. De P., Silva, S. V. Dos S. E. **Autotransplantação de ovário no subcutâneo e consumo folicular em gatas domésticas (Felis catus)**. Veterinária Notícias. v.12, n. 2, p. 131-140, 2006.
- Cunningham, J. G., Klein, B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- Damáσιο, L.C.V.C. **Transplante experimental, subcutâneo e intraperitoneal, de ovário em suínos: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**. 2011. Tese (Doutorado em Obstetrícia e Ginecologia) - Faculdade de Medicina, Universidade of São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5139/tde-23082011-145132/>>. Acesso em: 2014-11-04.
- Day, M., Mackin A, Littlewood J, eds. *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Iowa University Press, Ames, Iowa, USA, 2001.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B., Van Langendonck, A. **Livebirth after orthotopic**

- transplantation of cryopreserved ovarian tissue.** v. 364, [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com), 2004.
- Donnez, J., Martinez-Madrid, B., Jadoul, P., Van Langendonckt, A., Demylle, D., Dolmans, M. M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproduction Update*, v.12, n.5 p. 519–535, 2006.
- Donnez, J., Squifflet, J., Van Eyck, A., Demylle, D., Jadoul, P., Van Langendonckt, A., Dolmans, M. **Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience.** v. 16, n. 5, p. 694-704. *Reproductive BioMedicine Online*. [www.rbmonline.com/Article/3176](http://www.rbmonline.com/Article/3176) on web, 2008.
- Donnez, J., Silber, S., Andersen, C., Demeestere, I., Piver, P., Meirow, D., Pellicer, A., Dolmans, M. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births *Annals of Medicine*. v.43, p. 437–450, 2011.
- Donnez, J., Jadoul, P., Pirard, C., Hutchings, G., Demylle, D., Squifflet, J., Smits, J., Dolmans, M. M. **Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease.** *Fertility and Sterility*. v.98, n. 3, 2012.
- Donnez, J., Dolmans, M., Pellicer, A., Garcia, C. D., Serrano, M. S., Schmidt, K. T., Ernst, E., Luychx, V., Andersen, C. Y., **Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation.** *Fertility and Sterility*. v. 99, n. 6, 2013.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., **Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. v. 32, p. 1167-1170, 2015.
- Dyce, K. M; Sack, W. O; Wensing, C.J.G. *Tratado de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2010.
- Eyck, A. S. V., Bouzin, C., Feron, O., Romeu, L., Langendonckt, A. V., Donnez, J., Dolmans, M. M. **Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model.** *Fertility and Sterility*. v. 93, n. 5, 2010.
- Faustino, L.R., Silva, C.M.G., Rossetto, R., Rodrigues, G.Q., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., **Estado Atual e Desafios da Criopreservação de Tecido Ovariano em Mamíferos.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.3-15, 2011.
- Ferreira, M.O., 2005. **Análises Histológicas Comparativas Entre Diferentes Tamanhos de Fragmentos Ovarianos Criopreservados.** Teses de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.
- Gosden, R. G., Boulton, M. I., Grant, K., Webb, R. **Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 101, p.616-623, 1994.
- Guerreiro, D. D., Carvalho, A. A., Lima, L. F., Rodrigues, Q. R., Figueiredo, J. R., Rodrigues, A. P. R. Impactados agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotecnologias reprodutivas na preservação da fertilidade humana. *Reprodução e Climatério*. v. 30, n. 2, p.90-99, 2015.
- Hulshof, S.C.J., Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van Den Hurk, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, v.16, n.2, p.78–80, 1994.

- Junqueira, L.C. and J. Carneiro, Aparelho Reprodutor Feminino, in **Histologia Básica**, Editora: G. Coogan, Rio de Janeiro, 2011.
- Kim, S. S., Hwang, I., Lee, H. **Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function**. Fertility and Sterility. v.82, n.4, 2004.
- Kristensen, S.G., Rasmussen A., Byskov A. G., Andersen C.Y. **Isolation of pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue**. Human Reproduction. v.26, n. 1, p. 157-166, 2011.
- Krohn, P.L. **Transplantation of the ovary**. In: ZUCKERMAN, L.; WEIR, B.J. The Ovary, v.2. 2.ed. New York, San Francisco and London: Academic Press, 1977. cap. 3, p. 101-128.
- Ladanyi, C., Mor A., Christianson m.S., Dhillon N., Segars J. H., **Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research**. Journal Assisted reproduction and genetics. v. 36, n. 6, p.709-722, 2017.
- 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. Fresh pieces of monkey ovary remain fully functional even when moved to a new site**. Nature. v. 428, p.137-138,2004.
- Leonel, E.C.R. **Criopreservação e Autotransplante Heterotópico de Tecido Ovariano de Gatas Domésticas**. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília, UnB. 2013.
- Lopes, C.A.P., **Utilização da Biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais para a Avaliação in vitro do Potencial de Anticorpos Anti-zona pelúcida para a Imunoesterilização de Cadelas**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Do Ceará, UECE. 2008.
- Lotz, L., Maktabi, A. Hoffmann, I., Findekle, S., Beckmann, M. W., Dittrich, R. **Ovarian tissue cryopreservation and retransplantation–what do patients think about it?** Reproductive BioMedicine Online. Published by Elsevier Ltd on behalf of Reproductive Healthcare Ltd, 2016.
- Macedo, M.F. **Transplante Ovariano Autólogo em Diferentes Sítios Anatômicos de Ratas Ovariectomizadas**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal, UNESP. 2011.
- Macedo, M.F., Bezerra, M.B., Vicente, W.R.R **Transplante Ovariano: Aplicações na Reprodução de Animais Domésticos, Silvestres e Humanos**. Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.1, p.1-7, 2011.
- Moreira, C. F.; Jacomini, J. O. **Classificação Morfométrica, Contagem de Folículos Ovarianos e Recuperação Embrionária de Gatas Domésticas (felis catus – linneaus, 1758) Suplementadas com Taurina**. Ciência Animal, v. 15, n.2, p.107-114, 2005.
- Nugent, D., Newton, H., Gallivan, L, Gosden, R. G. **Protective effect of Vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts**. Journal of Reproduction and fertility. v. 114, p.341-346, 1998.
- Oktay, K., Buyuk, E., Veeck, L., Zaninovic. N., Xu, K. P., Takeuchi, T., Opsahl, M., Rosenwaks, Z. **Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue**. Lancet. v. 363, p. 837–840, 2004.
- Oktay, K. **Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection?** Human Reproduction v.21, n.6, p. 1345–1348, 2006.

- Paulini, F., Melo, E. O. **The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis.** *Reproduction in Domestic Animals.* v. 46, p. 354-361, 2011.
- Paulini, F., Silva, R. C., Rôlo, J. L. J. P., Lucci, C. M. **Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals.** *Journal of Ovarian Research.* v.7, n.1, p.102, 2014.
- Pelican, K. M., Wildt, D., Pukazhenthil, B., Howard, J. **Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids.** *Theriogenology.* v. 66, p. 37-48, 2006.
- Petroianu, A., Alberti, L.R, Vasconcellos, L.S., **Avaliação Endócrina, Morfológica e Gestacional após Transplante Homólogo Ortótopico de Ovários Íntegros e Fatiados sem Anastomose Vascular.** *JBT J Bras Transpl;* v.7, p.177-181, 2004.
- Petroianu, A., Alberti, L.R, Vasconcellos, L.S., **Avaliação Pós-Transplante de Óvários Íntegros e Fatiados sem Anastomose Vascular.** *Rev Assoc Med Bras;* v.52, n.6, p. 447-452, 2006.
- Prates, L.F.V.S., 2008. **Transplante Autólogo de Tecido Ovariano para o Peritônio de Ratas após Congelamento e Descongelamento.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.
- Pullium, J. K., Milner, R., Tuma, G. A. **Pregnancy Following Homologous Prepubertal Ovarian Transplantation in the dog.** *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction.* v.5, n.1, 2008.
- Qing Li, Szatmary, P., Liu, Y., Ding, Z., Zhou, J., Sun, Y., Luo, F., Wang, Y., Zhu, J. **Orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries and gonadotrophin releasing hormone analogues in the restoration of function following Chemotherapy-Induced ovarian damage.** *Journal PLOS one.* n.10, v. 3: e0120736:doi:10.1371
- Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Brasil, A. F., Figueiredo, J. R. **Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas.** *Ciência Animal,* v.11, n.2, p.101-112, 2001.
- Rosetto, R., Lima, I. M. T., Saraiva, M. V. A., Lima-Verde, I. B., Sales, E. T., Figueiredo, J. R. **Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais.** *Acta Veterinaria Brasilica,* v.5, n.1, p.15-23, 2011.
- Santos, R. R., Knijn, H. M., Vos, P. L., Oei, C. H., van Loon, T., Colenbrander, B., Gadella, B. M., van den Hurk, R., Roelen, B. A. **Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex.** *Fertility and sterility,* v. 91, n.4, p. 1455-1458, (2009).
- Scalercio, S. R. R. A, Santana, L. N. S., Domingues, S. F. S., Amorim, C. A., Santos, R. R. **Transplante ovariano: Destaques na reprodução de primatas não humanos.** *Acta Scientiae Veterinariae.,* v. 43, p. 1315, 2015.
- Schally, A.V., Kastin, A.J. and Arimura, A. Hypothalamic FSH and LH-regulating hormones, structure, physiology, and clinical studies. *Fertility and Sterility,* v.22, n. 11, pag. 703–721, 1971.
- Sherwood, L. Sistema Reprodutivo in **Fisiologia Humana das Células aos Sistemas.** 7ª edição. Local: São Paulo, Cengage Learning, 2011.
- Siber, J. S., Lenahan, K. M., Levine, D. J., Pineda, J. A., Gorman, K. S., Friez, M. J., Crawford, E. C., Gosden, R. G. **Ovarian Transplantation between Monozygotic Twins Discordant for Premature Ovarian Failure.** *The New England Journal of Medicine.* v. 353, n.1, [www.nejm.org](http://www.nejm.org), july, 2005.

- Silber, S. J, DeRose, M., Pineda, J., Lenahan, K., Grenia, D., Gorman, K, Gosden, R. G. **Series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation.** *Reproduction.* v.23, n.7 p. 1531–1537, 2008.
- Silva, A. R. S., Souza, A. L. P., Santos, E. A. A., Lima, G. L., Peixoto, G. C. X., Souza, P. C. S., Castelo, T. S., **Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no brasil. (formation of germplasm banks and its contribution to the wildlife conservation in brazil.)** *Ciência Animal.* v. 22, n. 1, p.219, 2012.
- Snow, M., Cox, S. L, Jenkin, G., Trounson A.O. Shaw, J. M. **Generation of live young from xenografted mouse ovaries.** *Science.* v.297, n.5590, p.2227, 2002.
- Terazono T., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V. L., Takagi, M., Inoue, M., Sato, Y., Taniguchi, M, Otoi, T. **Assessment of canine ovaries autografted to various body sites.** *Theriogenology,* v. 77, p. 131–138, 2012a.
- Terazono T., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V. L., Takagi, M., Inoue, M., Sato, Y., Taniguchi, M, Otoi, T. **Follicle Formation in the Canine Ovary After Autografting to a Peripheral Site.** *Reproduction in Domestic Animals,* v.47, p.16–21, 2012b.
- Van der Ven, H., Liebenthron J., Beckmann M., Toth, B., Korell, M., Krüssel, J., Frambach, T., Kupka, M., Hohl, M. K., Winkler-Crepaz, K., Seitz, S., Dogan, A., Griesinger, G., Häberlin, F., Henes, M., Schwab, R., Sütterlin, M., von Wolff, M., Dittrich, R. **Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates.** *Human reproduction.* v. 31, n. 9, p. 2031-41, 2016.
- Wiedemann, C., Hribal, R., Ringleb. J., Bertelsen, M. F., Rasmussen, K., Andersen, C. Y., Kristensen, S. G., Jewgenow, K. **Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse.** *Reproduction in Domestic Animals.* v. 47, n. 6, p. 300-304, 2012.
- Yang, H.Y., Cox, S. L., Jenkin, G., Findlay, J., Trounson, A., Shaw, J. **Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts.** *Reproduction.* v. 131, p.851-859, 2006.
- Yin, H., Jiang H., Kristensen S. G., Andersen C. Y. **Vitrification of in vitro matured oocytes collected from surplus ovarian medulla tissue resulting from fertility preservation of ovarian cortex tissue.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* v. 33, n. 6, p. 741-746, 2016a.
- Yin, H., Kristensen S.G., Jiang, H., Rasmussen A., Andersen C.Y., **Survival and growth of isolated pre-antral follicles from human ovarian medulla tissue during long-term 3D culture.** *Human Reproduction.* v. 31, n. 7, p. 1531-1539, 2016b.