



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE DE OVÁRIO BOVINO NA CÁPSULA RENAL DE
CAMUNDONGAS BALB-C/NUDE E C57BL6 SCID ESTIMULADAS COM ECG OU
ASSOCIAÇÃO DE FSH E LH**

MOSSORÓ-RN
2015

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE DE OVÁRIO BOVINO NA CÁPSULA RENAL DE
CAMUNDONGAS BALB-C/NUDE E C57BL6 SCID ESTIMULADAS COM ECG OU
ASSOCIAÇÃO DE FSH E LH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra - UFERSA

Coorientadora: Profa. Dra. Michelly Fernandes de Macedo - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência

S644d Pimentel, Muriel Magda Lustosa.

Xenotransplante de ovário bovino na cápsula renal de camundongas BALB/c Nude e C57BL6 SCID estimuladas com eCG ou associação de FSH e LH/ Muriel Magda Lustosa Pimentel. -- Mossoró, 2015.

63f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Michelly Fernandes de Macedo

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

1. Novilhas. 2. Camundongas. 3. Ovário. 4.
Xenotransplante. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT/007-15

CDD: 636.2

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa
CRB-15/120

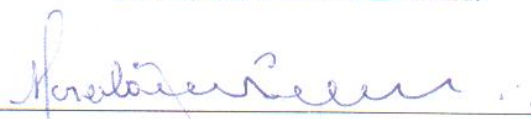
MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE DE OVÁRIO BOVINO NA CÁPSULA RENAL DE
CAMUNDONGAS BALB-C/NUDE E C57BL6 SCID ESTIMULADAS COM ECG OU
ASSOCIAÇÃO DE FSH E LH**

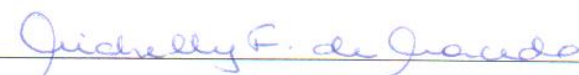
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: 20/02/2015

BANCA EXAMINADORA:



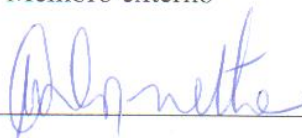
Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)
Presidente



Profª. Drª. Michelly Fernandes de Macedo (UFERSA)
Coorientadora



Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro externo



Profª. Drª. Maria da Conceição Mesquita Cornetta (UFRN)
Membro externo

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL – Nascida em Brasília-DF, no dia 29/01/1986, filha de Mario Sérgio Granado Pimentel e Lianeide Lustosa Pimentel, concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Governador Walfredo Gurgel e o ensino médio na Escola Estadual Professor Anísio Teixeira em Natal-RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2012.1. Em março de 2013 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de mestrado, desenvolveu trabalhos com transplantes gonadais e produção *in vitro* de embriões.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, pois sentir sua presença em minha vida, me torna mais fortes para continuar, sabendo que Ele está sempre ao meu lado me amparando com a sua mão divina! Muitas vezes já me senti sozinha e perdida, mais daí paro e penso... “não estou sozinha, o Senhor está comigo em todo o momento”, mostrando a direção certa para seguir pelo melhor caminho! Acredito que somos vitoriosos pelo simples fato de estarmos vivos, por ganharmos uma nova oportunidade todos os dias de conquistar algo novo e de procurar ser melhor em todos os sentidos. Sou grata por todas as vitórias que já alcancei na minha vida, das mais difíceis àquelas mais simples, conquistadas todos os dias. E a cada obstáculo á vencer, tenho certeza, que o meu Deus estará sempre comigo em pensamentos, palavras e ações!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo apoio ao projeto e a discente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra, pela oportunidade e credibilidade que em mim confiou. Fiz e continuarei fazendo o meu melhor para que nossa equipe continue evoluindo, e vamos rumo ao embrião!

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Michelly Fernandes de Macedo pelo carinho e atenção dados a mim, sempre presente e disposta a ajudar. Agradecimentos especiais a Valentina de Macedo Bezerra, por ter nascido e trazido mais alegria ao nosso laboratório, já nos mostrando logo cedo que é forte e ao mesmo tempo amorosa e linda.

À toda equipe LTG-PIVE (Marcelo Bezerra, Michelly de Macedo; Brenna Barbosa; Ana Carolina Guimarães; Denilsa Fernandes; Érika Praxedes; Ícaro Coutinho; Mikael Lima; Roberta Izzo; Yago Dantas, Fernanda Santos), pelo carinho de cada dia, nos tornando mais que amigos, uma família. Com direito a pais, irmãos, brigas, choros, mas também muitas alegrias e amor, principalmente! Agradecer em especial toda a equipe que me ajudou diretamente no experimento: Fernanda Santos, Mikael Lima, Roberta Izzo, Ana Carolina Guimarães, Joelma Martins e Ícaro Coutinho, me apoiaram em tudo e se sacrificaram muitas vezes em prol do experimento, e por me aguentarem até o final, pois sei que em dia de experimento, sou nervosa demais. “Juntos, somos mais fortes”.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, pelos ensinamentos a mim passados desde a época da Zootecnia. Sempre bastante atencioso com seus alunos.

Aos professores José Domingues e Moacir Franco, pelo auxílio dado durante o período do experimento em seus Laboratórios de Histologia e de Morfofisiologia Animal Aplicada, respectivamente.

À professora Aracelly Ricarte por disponibilizar mão de obra especializada para termografia.

Ao meu pai, Mario Sérgio Granado Pimentel, por todo o apoio em todas as circunstâncias de minha vida. Ele sempre esteve ao meu lado, confiando e acreditando plenamente em tudo que fiz e faço, em tudo que apostei se daria certo. Nunca me esquecerei de suas palavras de

carinho e afeto, “quem eu amo? E quem me ama?” e das palavras de apoio “faça o que fizer, estarei ao seu lado, e assino embaixo”. Apenas lhe digo, obrigada, eu amo você!

A minha mãe, Lianeide Lustosa Pimentel, que com sua força e determinação, mantém minha casa na santa paz divina. A ela, que sempre sacrificou tudo pelos filhos e que sempre rezou muito por todos nós! Muito obrigada de coração.

As minhas irmãs, Paula Pimentel e Myllena Porto, por sempre acreditarem e torcerem muito pelo meu sucesso.

A Fernanda Santos pelo apoio incondicional, passando feriados e dias santos, me ajudando sempre em tudo, me aconselhando em todos os momentos. Desde que entrei no laboratório, a tive como exemplo de pessoa, por sua classe e perfeição, sabendo repassar tudo que sabia. Aprendemos juntas a crescer e desenvolver nossos trabalhos e a passar por todas as dificuldades com louvor. Tenho muito orgulho em ouvir várias pessoas dizendo, “nossa, como vocês são sempre positivas, achando um jeito e resposta para tudo”! Uma grande amiga e parceira de trabalho!

A Luã Barbalho de Macêdo, por sempre estar ao meu lado, como amigo, namorado, companheiro de todas as horas. Várias vezes me deu seu ombro amigo para chorar, e mesmo distante, se fez presente em todos os momentos, com palavras de apoio e muito carinho.

A Kelly Ribas e Marileide Gomes, pela amizade sincera e pelo apoio que sempre vêm me dando psicologicamente. Obrigada!

A todos que direta ou indiretamente, me ajudaram, apoiaram, acreditaram! Meus mais sinceros agradecimentos!

As camundongas de meu experimento (*in memoriam*), pois sem elas, nada disso seria possível. Todas foram utilizadas com muito carinho e respeito que todo animal, seja ele como for, devemos ter.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”.

Charles Chaplin

XENOTRANSPLANTE DE OVÁRIO BOVINO NA CÁPSULA RENAL DE CAMUNDONGAS BALB-C/NUDE E C57BL6 SCID ESTIMULADAS COM ECG OU ASSOCIAÇÃO DE FSH E LH, PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa. Xenotransplante ovariano de bovino em duas linhagens de camundongas imunodeficientes (BALB/c Nude e C57BL6 SCID), 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Produção e Sanidade Animal) Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO – O objetivo desse trabalho foi de avaliar a viabilidade do xenotransplante de tecido ovariano de novilhas sob a cápsula renal de dois modelos de camundongas imunodeficientes e posteriormente estimuladas hormonalmente. Para tanto, animais das linhagens BALB/c Nude – n = 9 e C57BL6 SCID – n = 12 receberam fragmentos de sete ovários de novilhas. Os tecidos corticais ovarianos foram levados diretamente para histologia clássica (controle) ou transplantados sob a cápsula renal das receptoras, e permaneceram por 60 dias. Após cinco dias da cirurgia, foi iniciado o lavado vaginal, a cada 12 horas, durante 55 dias e divididas em três grupos, cada um com três BALB/c Nude e quatro C57BL6 SCID, onde o grupo um foi o controle, o grupo 2 estimulado hormonalmente com eCG e o grupo três, com uma associação de FSH+LH. O uso de termografia infravermelha para avaliação do tecido ovariano se deu no momento da coleta do ovário no abatedouro, logo após o transplante e no momento da retirada do mesmo. Amostras de tecidos e sangue foram colhidos e encaminhados para histologia clássica e bioquímica hepática e renal. As durações das fases do ciclo estral, os dados termográficos e bioquímicos foram avaliados por ANOVA seguidos de teste de Tukey ($p < 0,05$). O tempo cirúrgico médio em ambos os modelos não excedeu 18 minutos. Os animais C57BL6 SCID possuíam uma capsula renal mais elástica, facilitando a inserção dos fragmentos quando comparado às BALB/c Nude, o desenvolvimento e vascularização foi constatado em 83% das C57BL6 SCID e 77% das receptoras BALB/c Nude, com retorno da atividade ovariana 19 e 9 dias após o transplante, respectivamente. Observou-se ainda a presença de corpo hemorrágico nos transplantes induzidos com a associação FSH+LH na linhagem C57BL6 SCID. A termografia não permitiu a distinção entre os tecidos doador e receptor por ocasião do xenotransplante. Na avaliação das funções renais e hepáticas da bioquímica plasmática, apenas a ureia apresentou valores menores para animais transplantados quando comparados aos seus respectivos modelos controles. Conclui-se neste estudo que: a análise histológica permitiu o monitoramento da reperfusão e desenvolvimento folicular do transplante; novos protocolos hormonais devem ser testados para a obtenção de oócitos aptos para fertilização; a termografia infravermelha forneceu precisão para o monitoramento dos ovários doadores e o rim dos receptores, não evidenciando os transplantes; os animais C57BL6 SCID são mais indicados para o procedimento cirúrgico quando comparados aos BALB/c Nude e que o xenotransplante sob a cápsula renal não compromete as funções renal e hepática do animal receptor.

Palavras-Chave: xenotransplante, ovário, novilhas, camundongas.

XENOGRAFTING OF BOVINE OVARIES UNDER RENAL CAPSULE OF BALB-C/NUDE AND C57BL6 SCID MICE STIMULATED WITH ECG OR ASSOCIATION OF FSH AND LH, PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa. **Xenografting of bovine ovaries under renal capsule of BALB-c/Nude and C57BL6 SCID mice stimulated with eCG or association of FSH and LH**, 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Produção e Sanidade Animal) Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT – This study was aimed at evaluating the viability of xenografting of ovarian tissue from heifers under renal capsule of two different murine models of hormone-treated renal-encapsulated bovine ovarian tissue xenotransplantation. Thus, animals of BALB/c Nude (n=9) and C57BL6 SCID (n=12) received ovarian cortical fragments from seven heifers. The ovarian cortices were processed for histology (control) or grafted under the renal capsules of recipient mice, evaluated by vaginal washing until 60th day post-grafting and divided in three groups, each one with three BALB/c Nude and four C57BL6 SCID, as: control group; treated with equine chorionic gonadotrophin hormone, eCG or a combination of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone (FSH + LH). Infrared thermography was performed at different times in donor ovaries and recipients: at collection at slaughterhouse, at the time of xenografting procedure and at time of xenografts collection, grafted tissues were also recovered for histology and blood was collected for hepatorenal biochemistry. The average duration of the phases of the estrous cycle, the results of thermographic evaluation, and hepatorenal biochemistry were compared by ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0,05$). The average time of xenografting did not exceeded 18 minutes in both models. The C57BL6 SCID showed a more elastic renal capsule, facilitating the grafting procedure when compared to BALB/c NUDE. Among the strains, 83% of C57BL6 SCID and 77% of BALB/c Nude mice showed development and vascularization of the transplanted tissue, which acquired cyclicity at 19 and 9 days post-transplantation, respectively. Hemorrhagic follicles in xenografts induced with FSH + LH were found in the C57BL6 SCID strain. The thermography did not allows clearly distinction between donor and recipient tissue by xenografting. Our integration of these parameters revealed no significant difference between treatments for both strains studied, with the exception of urea levels, which were lower in the grafted mice than in non-grafted control mice. In conclusion, histological evaluation allow the monitoring of graft reperfusion and follicular development; new hormonal protocols are needed for obtaining oocytes for in vitro fertilization; infrared thermography provided minimum accuracy for monitoring donor ovaries and the kidney recipient, not highlighting transplants; C57BL6 SCID strain appears to be the best host for ovarian xenografts, since the transplants in these mice were viable and showed robust follicular development and xenotransplantation under the kidney capsule does not compromise the renal and hepatic function of the recipient animal.

Keywords: xenotransplantation, ovary, heifers, mice

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µl	Microlitros
µm	Micrômetros
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH	Corpo hemorrágico
CL	Corpo lúteo
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CR	Creatinina
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FA	Folículo antral
FAL	Fosfatase alcalina
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
h	Horas
HC	Histologia clássica
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HE	Hematoxilina-eosina
IA	Inseminação Artificial
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LH	Hormônio Luteinizante
LTG-PIVE	Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
°C	Grau Celsius
P	Folículo primário
p < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
pFSH	Hormônio folículo estimulante de suínas
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embrião
PO	Folículo pré-ovulatório
pp	Folículo primordial
PRL	Prolactina
R	Tecido Renal
RCR	Região da Cápsula Renal
rpm	Rotação por minuto

S	Folículo secundário
SCID	Síndrome da imunodeficiência severamente combinada
TE	Transferência de Embrião
TI	Termografia Infravermelha
TM	Tricrômico de Masson
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UR	Ureia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão em minutos dos procedimentos cirúrgicos realizados em camundongas submetidos ao xenotransplante ovariano.....	39
Tabela 2 – Média e desvio padrão (dias) da duração das fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.....	42
Tabela 3 – Temperatura de superfície do ovário íntegro e dos tecidos ovarianos transplantados nos diferentes momentos experimentais.....	49
Tabela 4 – Valores plasmáticos da função renal e hepática de camundongas imunossuprimidas.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação ilustrativa dos transplantes de acordo com os receptores.....	19
Figura 2 – Classificação dos transplantes de acordo com o sítio receptor.....	19
Figura 3 – Rim direito de camundongas BALB/c Nude e C57BL6 SCID.....	40
Figura 4 – Fragmento de córtex ovariano de novilha mestiça coletado após 60 dias da realização do xenotransplante em camundonga C57BL6 SCID.....	40
Figura 5 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas imunossuprimidas após xenotransplante.....	42
Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de novilha mestiça com oito semanas após o xenotransplante ovariano em receptoras imunossuprimidas.....	43
Figura 7 – Fotomicrografia de vasos sanguíneos observados no tecido ovariano bovino após xenotransplante.....	44
Figura 8 – Tecido ovariano bovino com presença de corpo hemorrágico (CH) após xenotransplante em camundongos C57BL6 SCID estimulados com uma associação de FSH e LH.....	47
Figura 9 – Imagens de termografia infravermelha do xenotransplante do tecido cortical ovariano sob a cápsula renal em camundongas C57BL6 SCID e BALB/c Nude.....	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESES.....	17
3. OBJETIVO.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4.1 XENOTRANSPLANTE OVARIANO.....	19
4.2 INDUÇÃO HORMONAL.....	21
4.3 ANIMAIS UTILIZADOS PARA XENOTRANSPLANTE OVARIANO.....	23
4.3.1 Receptoras.....	23
4.3.1.1 Camundongos BALB/c Nude.....	23
4.3.1.2 Camundongos C57BL6 SCID.....	24
4.3.2 Doadoras.....	25
4.4 FORMAS DE AVALIAÇÃO DO XENOTRANSPLANTE.....	27
4.4.1 Lavado vaginal.....	28
4.4.2 Histologia Clássica.....	29
4.4.3 Termografia Infravermelha.....	29
4.4.4 Bioquímica Renal e Hepática	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 FÊMEAS RECEPTORAS E MANEJO.....	33
5.2 SELEÇÃO DAS DOADORAS DOS OVÁRIOS.....	34
5.3 PROCESSAMENTO DO TECIDO OVARIANO DOADOR.....	34
5.4 CIRURGIA.....	34
5.5 LAVADO VAGINAL.....	35
5.6 ESTÍMULO HORMONAL E COLHEITA DE MATERIAL.....	36
5.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	36
5.8 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO TECIDO OVARIANO.....	37
5.9 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA.....	37
5.10 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA.....	37
5.11ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1 TEMPO CIRÚRGICO.....	39
6.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA.....	39
6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	41
6.3.1 Avaliação da lavado vaginal.....	41
6.3.2 Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais.....	43
6.3.3 Suprimento vascular para o tecido transplantado.....	44
6.4 INDUÇÃO HORMONAL.....	45
6.5 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA	47
6.6 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA.....	49
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O xenotransplante ovariano consiste na inserção do tecido ou parte dele em um receptor de espécie diferente da doadora (BEZERRA et al., 2012), podendo ser realizado próximo ou distante do local anatômico original (SONMEZER e OKTAY, 2010). Através de vários estudos, constatou-se que o local mais adequado para introdução do fragmento seria sob a cápsula renal (GOSDEN et al., 1994), devido a grande vascularização do órgão em questão, quando comparados com outros sítios como subcutâneo e bolsa ovariana (YANG et al., 2006). Para realização desta técnica, preconiza-se a utilização de animais imunossuprimidos (AUBARD, 2003) ou a administração de drogas imunossupressoras (SAMANIEGO et al., 2006) para causar depressão do sistema imune nos receptores e assim reduzir a possibilidade de rejeição do tecido transplantado (BEDAIWY et al., 2008; SILBER et al., 2010; SILBER, 2012; VON SCHONFELDT et al., 2012).

Essa técnica possui relevância na reprodução animal por manter a atividade dos ovários se transplantados a fresco, resfriados ou criopreservado, possibilitando a retomada das funções hormonais em casos de situações de morte recente de um animal com estimado valor genético, ecológico ou de interesse científico, uma vez que as gônadas podem ainda resistir algumas horas se bem conservadas (BEZERRA et al., 2011), além de sua utilização para a preservação de espécies ameaçadas de extinção (KIKUCHI et al., 2011).

Para avaliar a viabilidade do tecido transplantado técnicas como lavado vaginal, microscopia de luz, termografia infravermelha e bioquímica plasmática podem ser utilizadas.

O lavado vaginal a fresco consiste na lavagem da mucosa vaginal com intuito entre outras coisas, avaliar as diferentes fases do ciclo estral (SILVA FILHO e BURLÁ, 2002), auxiliando com isso, a avaliação das fêmeas após o transplante ovariano, permitindo saber se houve retorno da ciclicidade, qual a taxa desse retorno e a duração de cada fase do ciclo estral.

A microscopia de luz apresenta uma grande vantagem, pois possibilita que um grande número de folículos seja avaliado, o que a torna importante quando se deseja realizar uma análise quantitativa (MATOS et al., 2007) do tecido xenotransplantado, no que diz respeito a sua revascularização, ativação folicular e classificação das características específicas das gônadas da espécie estudada.

A termografia infravermelha (TI) consiste em uma técnica de captação da radiação emitida pelos tecidos dos animais, convertida em imagens termográficas ou termogramas, servindo como mapa da temperatura superficial nas diferentes áreas investigadas (STEWART et al., 2005), contribuindo com o diagnóstico reprodutivo, além de ser uma técnica menos

invasiva, de rápida execução e sem restrições no campo da Medicina Veterinária (RICARTE, et al., 2014). Nesse contexto, o uso da TI em transplantes visa à avaliação prévia da temperatura superficial do tecido doador em seu estado fisiológico, comparando-o após sua implantação na receptora e posteriormente a retirada do implante na mesma.

Conhecer os parâmetros bioquímicos de animais experimentais é de suma importância, pois permite avaliar alterações funcionais nos órgãos estudados. Ao se tratar de xenotransplante ovariano sob a cápsula renal, avaliar a bioquímica plasmática de parâmetros renais e hepáticos vão fornecer informações sobre as condições gerais do animal e também do sítio receptor, permitindo assim avaliar se o xenotransplante causa algum tipo de injúria ao receptor.

Este estudo objetivou avaliar a viabilidade do xenotransplante de tecido ovariano de fêmeas bovinas sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes BALB/c Nude e C57BL6 SCID tratados com eCG ou associação de FSH e LH.

2. HIPÓTESES

a) O xenotransplante do tecido ovariano bovino sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes da linhagem BALB/c Nude e C57BL6 SCID permite o desenvolvimento do tecido doador;

b) O lavado vaginal, histologia clássica, termografia infravermelha e bioquímica plasmática, permitirão comparar qual das linhagens é melhor para realização do xenotransplante do tecido ovariano bovino sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes da linhagem BALB/c Nude e C57BL6 SCID.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade do xenotransplante de tecido ovariano de fêmeas bovinas sob a cápsula renal de camundongos imunodeficientes BALB/c Nude e C57BL6 SCID tratados com eCG ou associação de FSH e LH.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar o desenvolvimento do tecido transplantado por lavado vaginal;
- b) Observar histologicamente a morfologia dos tecidos doador e receptor;
- c) Analisar o efeito da adição de protocolos hormonais no desenvolvimento do tecido ovariano de novilhas após o xenotransplante e escolher o melhor protocolo de estimulação hormonal;
- d) Monitorar a perfusão do tecido transplantado por meio da termografia infravermelha;
- e) Demonstrar qual melhor linhagem receptora para realização do xenotransplante ovariano bovino;
- f) Avaliar a função renal e hepática das receptoras através da análise da bioquímica plasmática.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 XENOTRANSPLANTE OVARIANO

Transplantar provém do latim “*translatio*” que significa transportar ou transferir. Esse processo envolve a transferência de um órgão funcional ou parte dele, de um indivíduo para ele mesmo ou outro, por intervenções cirúrgicas, com ou sem reestabelecimento da continuidade vascular (MACEDO, 2007). Assim sendo, os transplantes podem ser classificados, levando-se em consideração a espécie receptora (Figura 1), como: auto (mesmo indivíduo), iso (animais geneticamente idênticos), alo (outro ser da mesma espécie) ou xenotransplante (de outra espécie) (ANDRADE et al., 2004; DEMEESTERE et al., 2007); e segundo a sua localização no receptor (Figura 2) em: ortotópicos (próximo à localização anatômica original) ou heterotópicos (distante da localização anatômica original) (DONNEZ et al., 2006; KRONH, 1977).

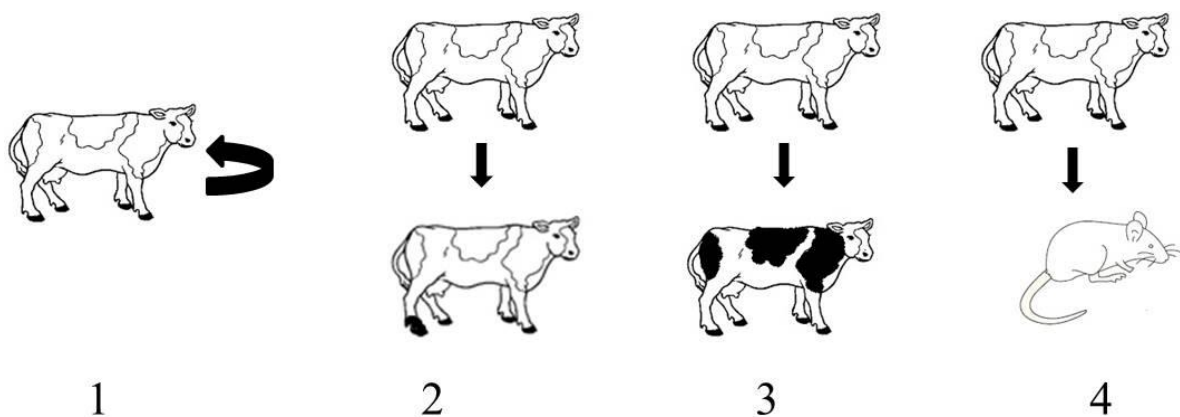


Figura 1 – Classificação ilustrativa dos transplantes de acordo com os receptores. 1 – Autotransplante; 2 – Isotransplante; 3 – Alotransplante; 4 – Xenotransplante.

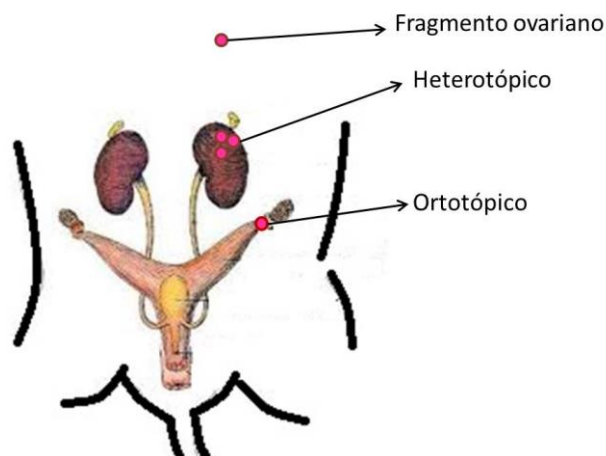


Figura 2 – Classificação dos transplantes de acordo com o sítio receptor.

No final do século XIX, o xenotransplante de gônadas foi aceito com reservas pela comunidade científica apesar dos resultados imediatos se mostrarem animadores. Isso se deu porque foram constatadas rejeições em muitos casos, reflexo do desconhecimento da correta e completa imunologia para o transplante entre espécies (CUPERSCHMID e CAMPOS, 2007) e de receptores apropriados para tal finalidade. Na Medicina Veterinária, com o advento das linhagens geneticamente modificadas, surgiu uma nova possibilidade para a conservação dos gametas de animais que porventura não pudessem reproduzir mais. Nesse contexto, um trabalho pioneiro com transplantes em ovinos propiciou a utilização desta técnica para fins reprodutivos e serviu como modelo de transplantes ovarianos para diversas espécies (GOSDEN et al., 1994).

Os transplantes gonadais possibilitam a recuperação das atividades dos tecidos ovarianos e testiculares de humanos ou animais domésticos e silvestres que estejam até mesmo em risco de extinção. Algumas aplicações podem ser destacadas para esta técnica, em humanos, por exemplo, falência ovariana prematura (SILBER et al., 2008), retomada da produção hormonal e fertilidade (DONNEZ et al., 2011), e manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer (DONNEZ et al., 2004), como também, estudos sobre a resposta dos tecidos transplantados à administração de diferentes hormônios exógenos em função da idade, da condição fisiológica do (a) doador (a) e receptor (a) e estudo de contracepção (BEZERRA e MACEDO, 2013).

Em animais, a utilização das suas gônadas pode se dar devido a acidentes ou imediatamente após a sua morte, quando estes se encontrarem impossibilitado de fertilizar; na perpetuação da espécie após o animal passar por tratamentos de quimioterapia, radioterapia ou outros processos danosos à manutenção de gametas; em estudos sobre desenvolvimento folicular e produção hormonal em fêmeas; na introdução de células germinativas geneticamente modificadas e possibilidade de replicação em ruminantes domésticos, considerados excelentes modelos de transgenia; habilidade para controlar e preservar a fertilidade de machos e fêmeas; além de aproveitamento do potencial reprodutivo das gônadas de animais recém-nascidos que venham a óbito, como clones, transgênicos e animais silvestres (BEZERRA e MACEDO, 2013).

Como limitações, de forma geral, o transplante de gônadas necessita de uma equipe especializada para realização dos transplantes, acompanhamento permanente dos animais transplantados, instrumental cirúrgico para microcirurgia e para o xenotransplante, sendo necessárias ainda, receptoras imunodeficientes em estado de saúde excelente, condições

ambiente favoráveis à sua manutenção (BEZERRA, 2010) e cirurgia e pós-cirurgia apropriada para estabilidade e recuperação desses animais.

4.2 INDUÇÃO HORMONAL

O xenotransplante ovariano possibilita o desenvolvimento do tecido ovariano transplantado em diversas espécies. Com base nessa premissa, há estudos que já demonstraram que folículos antrais foram obtidos sem estimulação hormonal quando córtices de ovários de saguis (CANDY et al., 1995), elefantas (GUNASENA et al., 1988) e de wombat (WOLVEKAMP et al., 2001) foram transplantados em camundongas.

O FSH (Hormônio Folículo Estimulante) desempenha papel no crescimento folicular precoce, porém seu papel principal é mais evidente no folículo secundário e antral, devido ao aumento no número de receptores de FSH e os receptores de IGF- I, que podem amplificar a ação do FSH folicular (Hernandez-Fonseca et al., 2005).

Os folículos primordiais, embora sensíveis às gonadotrofinas, não necessitam de FSH e LH (Hormônio Luteinizante) para o desenvolvimento até sua ativação e, como as atividades biológicas desses hormônios não são exclusivamente espécie-específicas, é possível que os hormônios produzidos pela hipófise do receptor apoiem a morfogênese dos folículos pré-ovulatórios e a produção de estrogênio no xenotransplante ovariano (Gosden et al., 1994). Sendo assim, uma estratégia para melhorar a capacidade de desenvolvimento de oócitos dos xenotransplantes seria facilitar seu desenvolvimento por aceleração do crescimento folicular com administração de hormônios exógenos (Kaneko et al., 2006).

O LH possui papel importante quando os folículos bovinos atingem um diâmetro de aproximadamente 8 mm, sendo iniciada a seleção dos folículos antrais e o desenvolvimento dos receptores para LH nas células da granulosa. Os folículos aumentam de tamanho rapidamente, podendo chegar a aproximadamente 15 mm de diâmetro no estágio de folículo ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). A competência dos ovócitos tem uma estreita relação com as multicamadas de células do cumulus que são linhagens de células da granulosa, as quais envolvem os ovócitos, mantendo uma importante via de comunicação através das junções comunicantes GAP (*gap junctions*), antes e durante o pico de LH (RODRIGUEZ e FARIN, 2004). Logo após o pico, ocorre o desaparecimento dessas vias de comunicação entre o ovócito e as células do cumulus (Hyttel et al., 1997). A ovulação ocorre em consequência de uma interação dinâmica entre o pico pré-ovulatório causado pelo LH e os fatores locais, incluindo os esteróides. O pico de LH provoca mudanças estruturais e

bioquímicas, que conduzem à ruptura do folículo ovulatório, tendo, como resultado, a extrusão do ovócito maduro e o desenvolvimento subsequente do corpo lúteo. Outro processo induzido pelo LH que culmina na ovulação é a expansão das células do cumulus por meio da secreção do hialuronano (ácido hialurônico), que forma um muco elástico na matriz extracelular (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

O eCG (gonadotrofina coriônica equina) é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da égua prenhe que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo. Portanto, possui a capacidade de expressar atividade biológica tanto de FSH (hormônio folículo-estimulante) quanto de LH (hormônio luteinizante). Diverge gonadotrofinas coriônicas de outras espécies que apresentam especialmente atividade de LH. Devido sua ação de LH e FSH e meia vida longa, a eCG pode ser utilizada em dose única em protocolos para superovulação em bovinos (BARUSELLI et al., 2008).

A eCG quando administrada vacas em anestro cria condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em vacas que tenham comprometimento na liberação de gonadotrofinas. Seu uso tem apresentado efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade (anestro), em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses), em animais com condição corporal comprometida e em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de progesterona ao final do tratamento de sincronização da ovulação (aumenta a taxa de ovulação e aumenta a taxa de prenhez) (BARUSELLI et al., 2004). Ainda, devido sua ação de LH e FSH e longa meia vida, a eCG pode ser utilizada em dose única em protocolos para superovulação em bovinos (BARUSELLI et al., 2008). O emprego da eCG também tem sido relatado em receptoras de embrião. Receptoras que recebem eCG durante o tratamento de sincronização apresentam aumento da taxa de ovulação e de aproveitamento, além de possuírem maiores níveis de progesterona circulante no diestro (BARUSELLI et al., 2000).

Partindo-se do princípio que os andrógenos e demais gonadotrofinas endógenas de machos poderiam auxiliar o crescimento folicular, camundongos machos foram utilizados como receptores obtendo-se após o transplante, crescimento de folículos secundários a antrais, contudo estes folículos foram menos viáveis quando comparados aos que são normalmente encontrados nas fêmeas (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005; SENBON et al., 2004). Todavia, há quem faça o uso da adição de protocolos hormonais, como Kaneko et al. (2003) que após o xenotransplante ovariano de suínos, induziram as camundongas receptoras a um protocolo combinado de eCG-hCG 60 dias depois de observarem o estro (KANEKO et al.,

2003). Uma vez verificada a insuficiência dos resultados, os mesmos autores fizeram, posteriormente, ajuste de protocolos com a utilização de eCG, pFSH (hormônio folículo estimulante de suínas) e a combinação de pFSH e um antissoro de estradiol (KANEKO et al., 2006). Outros pesquisadores também utilizaram gonadotrofinas para estimulação hormonal em xenotransplante ovariano, sendo o foco a espécie bovina, onde observaram um aumento no crescimento folicular comparado aos animais não tratados (SENBON et al., 2005). A utilização de estímulos hormonais em receptoras após o xenotransplante ovariano possibilita um maior desenvolvimento do tecido transplantado, todavia, mais estudos devem ser realizados de modo a se estabelecer protocolos hormonais para cada espécie, ademais, ainda não se sabe ao certo, se a indução hormonal vai estar diretamente relacionada à receptora ou doadora.

4.3 ANIMAIS UTILIZADOS PARA XENOTRANSPLANTE OVARIANO

4.3.1 Receptoras

Os camundongos são animais de fácil manuseio, pequeno porte (aproximadamente 10 vezes menores do que os ratos), com características geneticamente bem definidas, um ciclo reprodutivo rápido, curto período gestacional (em torno de 21 dias), além de crescimento rápido dos filhotes e baixo custo de manutenção (ANDERSEN et al., 2004). Assim, importantes linhas de pesquisa biológicas os adotaram como modelos experimentais e devido a todas essas características, o sistema imune dessa espécie foi caracterizado de maneira mais extensiva do que qualquer outra espécie.

Almejando reduzir as chances de possíveis rejeições após o xenotransplante, manipulações genéticas foram realizadas por pesquisadores que produziram roedores imunodeficientes para serem usados como receptores, sendo exemplos às linhagens C57BL/6 SCID e BALB/c Nude, podendo ser utilizado tanto receptores fêmeas (SENBON et al., 2004; SENBON et al., 2005) quanto machos (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005) para a realização do xenotransplante ovariano.

4.3.1.1 Camundongos BALB/c Nude

Os camundongos BALB/c Nude são homozigotos recessivos para o gene autossômico situado no cromossomo 11. Essa característica induz o desenvolvimento anormal do timo nos

animais, deixando-os assim deficientes em linfócitos T, dessa forma esta linhagem não rejeita transplantes de outras linhagens ou espécies e apresenta maior susceptibilidade às infecções (SHULTZ et al., 1995). A ausência de pelos também é característica dessa condição, daí vem a denominação Nude.

O acasalamento ocorre entre macho nu/nu x fêmea nu/+; logo, as fêmeas devem ser heterozigotas, já que a ausência de pelos impede que mantenham os filhotes aquecidos e a produção de leite é menor. Esse tipo de acasalamento produz 50% de heterozigotos e 50% de homozigotos recessivos, aproveitando-se os machos homozigotos e as fêmeas heterozigotas para os próximos acasalamentos. Geralmente são animais menores, crescem mais lentamente, são menos férteis e morrem mais facilmente, devendo ser mantidos em condições *germfree* (FOSTER et al., 1983), sendo necessária a esterilização de todo e qualquer material que entre em contato com os mesmos.

O camundongo BALB/c Nude foi empregado em estudos de crescimentos tumorais, sendo imprescindíveis nas etapas iniciais de estudos pré-clínicos para desenvolvimento de fármacos antitumorais (KELLAND, 2004), em transplantes de gônadas (GOSDEN et al., 1994) e em estudo de doenças autoimunes, como o lupus eritematoso (FURUKAW, 2003).

4.3.1.2 Camundongos C57BL6 SCID

Os animais SCID (do inglês *Severe Combined Imunno Deficiency*) por sua vez, são diferenciados por possuírem transtornos congênitos raros caracterizados por deficiência nas imunidades humoral e celular, leucopenia e concentrações baixas ou ausentes de anticorpos. Sua mutação se deu na linhagem CB-17 (JOHNSON, 2012).

Essa linhagem é homozigota para o gene autossômico recessivo mutante que está localizado na extremidade centromérica do cromossomo 16 e é responsável pela agamaglobulinemia severa e ausência de linfócitos B e T maduros e funcionais, tornando-os assim modelos animais, já que são receptivos aos transplantes (GOSDEN et al., 1994).

A maioria dos homozigotos não possuem imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM ou IgG, mas alguns animais têm baixíssimas concentrações de alguma ou das três. Os órgãos linfoides desses animais se apresentam com um décimo do seu tamanho normal. Timo, linfonodos e o baço estão completamente destituídos de linfócitos. Os animais homozigotos são totalmente deficientes de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T (JOHNSON, 2012). O defeito parece estar nas células precursoras do sistema linfoide, já que transplantes de medula óssea restauram a capacidade de produção de

células B e T funcionais. Embora a maioria dos homozigotos falhe em produzir imunoglobulinas e receptores para células T funcionais, alguns os produzem em baixas concentrações e ocasionalmente um indivíduo pode apresentar concentrações quase normais de imunoglobulinas séricas. Esse fenômeno é descrito como *leakness*. Os homozigotos são férteis e em condições *germfree* podem viver por até 1 ano ou mais (SANTOS, 2002a).

4.3.2 Doadoras

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos. As cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (IBGE, 2014).

A pecuária bovina brasileira passa por um processo de tecnificação da atividade, porém ainda co-existem duas situações bem distintas. Grande parte do rebanho nacional faz uso de alguma tecnologia de produção como melhoramento e/ou rotação de pastagem, alimentação intensiva, cruzamento industrial, seleção genética, manejo zootécnico-sanitário, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fertilização *in vitro* (FIV), que têm por objetivo o aumento dos índices zootécnicos e reprodutivos do rebanho (RODRIGUES e RODRIGUES, 2000). Em contrapartida, há ainda rebanhos em que a alimentação é realizada em pastos nativos, sem suplementação, com pouco ou nenhum controle sanitário e praticamente sem qualquer controle reprodutivo (SILVA, 2000). A somatória dessas duas situações faz com que os parâmetros reprodutivos e a taxa de desfrute do rebanho bovino nacional ainda não sejam as mais adequadas principalmente face aos custos atuais de produção (JUNQUEIRA e ALFIERI, 2006).

Todavia, para que haja melhor desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas, faz-se necessário o aprimoramento dos conhecimentos da fisiologia reprodutiva de cada espécie. Quando se considera o sistema reprodutor feminino, os ovários são estruturas importantes, pois armazenam os folículos, gametas femininos responsáveis, parcialmente, pela produção de embriões. Para os mamíferos, os folículos ovarianos são classificados, em termos gerais, em pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais são constituídos por folículos primordiais,

primários e secundários e são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito (FAIR, 2003; GONÇALVES et al., 2008). Por outro lado, os folículos antrais são aqueles que apresentam cavidade antral, ou seja, presença de líquido folicular (GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUEZ e FARIN, 2004; VAN DEN HURK et al., 2000).

Os folículos se tornam responsivos aos hormônios gonadotróficos a partir do estágio secundário e então podem progredir para o estágio seguinte do desenvolvimento (antral) com uma circulação mínima de FSH, mas o hormônio luteinizante (LH) parece ser mais importante para o crescimento dos folículos neste estágio do desenvolvimento, provavelmente devido às células da granulosa apresentar receptores para FSH pouco funcionais. Assim, através dos receptores de LH nas células da teca, o hormônio desencadeia o processo de biossíntese de andrógenos tecaais que podem estimular a formação de novos receptores de FSH nas células da granulosa. Deste modo, o FSH pode amplificar seu efeito sobre os folículos secundários (YOUNG e MCNEILLY, 2010).

Além dos hormônios, outros fatores que influenciam o desenvolvimento dos folículos secundários e terciários podem derivar dos oócitos (Ex.: Proteína morfogenética óssea-15 (BMP 15), Fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e Conexina-37), das células da granulosa (Ex.: Fator de crescimento epidermal (EGF), Activina, Folistatina, Inibina) e das células da teca (Ex.: Fator de crescimento epidermal (EGF), Proteína morfogenética óssea – 15 (BMP 15) e Fator de crescimento semelhante à insulina II (IGFII)) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os sinais para a formação do antro não são bem compreendidos, no entanto, foi demonstrado que o FSH e os fatores de crescimento epidérmico semelhante à insulina tipo I promovem a formação do antro em folículos cultivados *in vitro*, os quais apresentam multicamadas de células da granulosa (GUTIERREZ et al., 2009). O crescimento dos folículos antrais em bovinos ocorre em duas fases distintas: a) fase lenta: onde os folículos demoram aproximadamente 30 dias para avançar de 0,3 mm de diâmetro para o estágio de pequenos folículos antrais, com cerca de 3 mm de diâmetro (MIHM e BLEACH, 2003). Neste período do crescimento folicular, o oócito atinge seu crescimento final, com aproximadamente 110 µm de diâmetro, tamanho este que está relacionado com a aquisição da competência para o desenvolvimento (FAIR, 1997; RODRIGUEZ e FARIN, 2004); b) fase rápida: os folículos pequenos, de aproximadamente 3 mm de diâmetro, demoram de 5 a 7 dias para se tornar folículos dominantes, com mais de 8 mm de diâmetro. Esta fase é seguida por

um período variável de dominância, que culmina no desenvolvimento do folículo pré-ovulatório e, em seguida, na ovulação (BLEACH et al., 2001).

Partindo deste princípio, as condições fisiológicas da doadora (peso, raça, idade e a própria variação individual) tem merecido atenção nos estudos reprodutivos, tendo em vista a qualidade da gônada a ser utilizada para essas pesquisas. Sabe-se que nas vacas os ovários apresentam a região cortical mais desenvolvida devido à presença de grandes corpos lúteos e folículos maduros que, podem estar presentes ao mesmo tempo no ovário bovino (DYCE et al., 1990). Herrmann e Spanel-Borowski (1998) afirmaram que os ovários das novilhas diferiam dos das vacas por apresentarem maior número de folículos primordiais além de o seu crescimento ser mais evidente. Citaram ainda, que há presença de folículos pré-antrais e antrais próximos à região medular para as novilhas e próximo a região cortical para as vacas, sendo que nestas, os folículos antrais apresentavam grande diâmetro. Além disso, McDonald (1989) descreve a presença de corpos lúteos mais numerosos nos ovários das vacas do que de novilhas. Sendo assim, os transplantes de ovários de novilhas teriam maior probabilidade de desenvolvimento.

4.4 FORMAS DE AVALIAÇÃO DO XENOTRANSPLANTE

Existem diferentes formas para avaliar folículos obtidos a partir de cultivo (*in vivo* e/ou *in vitro*) e garantir assim o sucesso da técnica. Dentre elas podemos destacar aquelas que permitem a avaliação da qualidade folicular, como por exemplo, a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de fluorescência. Existem ainda as técnicas de biologia molecular que permitem o estudo da expressão de genes que codificam ligantes e/ou receptores de diferentes substâncias importantes para a foliculogênese, a imunohistoquímica, a qual permite a detecção de antígenos em cortes histológicos contribuindo para uma melhor elucidação desse processo (RAMOS-VARA, 2005). Além disso, a técnica de lavado vaginal e termografia infravermelha vêm ganhando espaço quando diz respeito às avaliações qualitativas das mudanças fisiológicas dos animais doadores e receptores. A seguir, serão abordadas brevemente apenas as técnicas empregadas nesse trabalho.

4.4.1 Lavado vaginal

O trato reprodutor feminino está sujeito a alterações periódicas cíclicas mais intensas que o trato reprodutor masculino. Além disso, a atividade cíclica feminina se manifesta macro e microscopicamente, assim como comportamentalmente. Esses vários estágios morfológicos, funcionais e comportamentais estão diretamente relacionados ao ciclo estral (BANKS, 1991).

A determinação do ciclo estral é de suma importância em procedimentos de pesquisa, pois, além de evitar uma série de vieses devido a alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo, permite conseguir grupos mais homogêneos, importantes em alguns tipos de ensaios (VILELA et al., 2007).

A regulação da atividade do ciclo estral dos mamíferos domésticos é um processo complexo e está, basicamente, sob o controle do eixo hipotálamo-adenohipófise-ovários, através de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos. O hipotálamo sintetiza e libera o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e sob esse estímulo, a hipófise libera o hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e prolactina. A regulação da secreção de gonadotrofinas durante o ciclo estral requer um delicado balanceamento entre essas complexas interações hormonais (BENITES, 1999).

Os roedores são mamíferos que apresentam ciclo estral regular, caracterizado por mudanças morfológicas nos ovários, útero e vagina, características que são observadas durante quatro a seis dias. Eles possuem ciclo estral de curta duração, prenhez relativamente breve e são de fácil manejo. Por isso, camundongas, cobaias e ratas são frequentemente utilizadas em experimentos reprodutivos. Deve-se considerar que fatores como idade, estação do ano e origem do animal, bem como as condições alimentares e luminosidade podem provocar variações no ciclo estral desses animais (SIMÕES, 1984).

As fases do ciclo estral da camundonga são classificadas em proestro, estro, metaestro e diestro, sendo que o estro corresponde à fase em que a fêmea está receptiva ao macho e caracteriza-se por uma intensa queratinização e descamação vaginal (HARKNESS e WAGNER, 1994). O diestro caracteriza-se por baixas concentrações de estrogênio e esfregaços vaginais com predomínio de leucócitos e algumas células epiteliais corneificadas; esta fase é considerada como pré-ovulatória. No proestro há um aumento da concentração do estradiol, e, no esfregaço vaginal, predominam células basais e parabasais, dispersadas ou acumuladas; esta é a fase em que ocorre a ovulação. No estro há queda das concentrações de estradiol e predomínio de células epiteliais, de descamação e corneificadas; esta é a fase pós-

ovulatória. No metaestro há um aumento nas concentrações de progesterona, havendo uma pequena quantidade de células de descamação e leucócitos (MARCONDES et al., 2002).

O comportamento esperado em fêmeas transplantadas com fragmentos de córtex ovariano é de um anestro inicial que pode variar conforme a interação entre o tecido transplantado e o receptor (BEZERRA e MACEDO, 2013). Caso a interação ocorra, serão observados os diferentes tipos celulares. Nesse sentido, o uso da técnica de lavado vaginal é de suma importância para a observação do retorno ao estro e da duração do ciclo estral das fêmeas submetidas ao transplante.

4.4.2 Histologia Clássica

Histologia clássica é uma importante técnica para avaliação de folículos ovarianos, pois permite constatar a morfologia do oócito assim como das células que compõem o folículo e determinar tanto o número destas quanto eventuais mudanças na estrutura celular. Tais alterações incluem a desorganização das células da granulosa e seu destacamento da membrana basal, bem como, a retração oocitária e a picnose nuclear. Esse processamento histológico pode ser aplicado para avaliação tanto de folículos inclusos no córtex ovariano quanto aos isolados (SAMUELSON, 2007).

Autores como Candy et al. (2000), Eimani et al. (2009), Aerts et al. (2010) e Bezerra (2010), utilizaram protocolos semelhantes de histologia clássica em experimentos de transplantes de tecido ovariano. Nestes estudos, a utilização da coloração hematoxilina-eosina (HE) possibilitou a avaliação da integridade tecidual justificando-se o seu uso para este tipo de cultivo. Existem também outras colorações como o Tricrômico de Masson que tem como finalidade distinguir células do tecido conjuntivo circundante e avaliar a vascularização. É uma técnica de coloração de colágeno e fibras elásticas, onde podem ser observadas três cores diferentes: verde - tecido conjuntivo e tecido muscular; vermelho – eritrócitos e fibra muscular; azul - citoplasma e núcleos azuis (SAMUELSON, 2007).

4.4.3 Termografia Infravermelha

A termografia infravermelha é uma técnica que permite mapear um corpo ou uma região com o intuito de distinguir áreas de diferentes temperaturas, sendo, portanto uma técnica que permite a visualização artificial da luz dentro do espectro infravermelho. A imagem térmica digital infravermelha é inócua e não entra em contato físico com o órgão e,

segue princípios físicos de transferência de calor e da própria termodifusão no que diz respeito o estudo da microcirculação. A busca frequente por técnicas menos invasivas para o diagnóstico reprodutivo, sem restrições para sua utilização e de rápida execução é o desejo de muitos profissionais que trabalham com reprodução, com isso, a técnica de Termografia Infravermelha (TI) surge como uma alternativa para tornar rápido e eficiente o diagnóstico reprodutivo (RICARTE et al., 2014). Nesse contexto, a termografia infravermelha consiste na técnica baseada em uma das leis da radiação que afirma que todos os corpos com temperatura acima de -273°C , marca do zero absoluto, emitem radiação infravermelha, com frequência eletromagnética de intensidade proporcional à temperatura superficial que pode apresentar-se alterada em diversas áreas específicas e em épocas ou ocasiões distintas em virtude do metabolismo tecidual, da perfusão sanguínea do local, de alterações inflamatórias e/ou mesmo pela atividade momentânea exigida do tecido (KOOPMAN, 1980).

Estudos demonstraram que a imagem infravermelha é uma metodologia útil para identificar distúrbios da perfusão de tumores cerebrais e renais no intraoperatório. O imageamento infravermelho tem potencial para uma avaliação objetiva e em tempo real para detecção tanto qualitativa quanto quantitativa da viabilidade orgânica durante episódios de isquemia (GORBACH et al., 2008).

Informações sobre o estado da microcirculação hepática diagnosticado por método complementar com filmagem infravermelha podem vir a ser uma metodologia promissora para auxiliar ao cirurgião na avaliação de órgãos a serem captados para transplante e, também, na documentação dos parâmetros microcirculatórios após reperfusão no receptor, haja vista os resultados prévios obtidos em transplante renal (GORBACH et al., 2008) e na perfusão coronariana (BRIOSCHI et al., 2002).

Esta técnica vem despontando na Medicina Veterinária como promissora para um diagnóstico rápido de doenças ou mudanças das funções fisiológicas em diferentes tecidos. Já tendo sido testada no monitoramento da perfusão sanguínea durante transplantes em suínos, na detecção de estro em porcas (RIBEIRO et al., 2009; SCOLARI et al., 2011) e também no autotransplante ovariano em camundongas (BEZERRA et al., 2014).

Para aplicação desta técnica se faz necessária uma câmera termográfica que capta a quantidade de radiação emitida pelos tecidos, sendo uma técnica segura para ser utilizada em animais de todas as idades e estados fisiológicos. A câmera termográfica é capaz de detectar variações mínimas de temperatura com precisão, com isso, a utilização da análise de termografia infravermelha torna possível identificar pontos de valores distintos de

temperatura radiante e tem sido valiosa para o reconhecimento de diversos eventos fisiológicos em animais (RICARTE et al., 2014).

4.4.4 Bioquímica Renal e Hepática

Os perfis bioquímicos do sangue são utilizados extensivamente em Medicina Veterinária não somente para a avaliação clínica individual, mas também para avaliar populações de animais, pois fornece importantes informações com relação ao balanço nutricional, situações deficitárias, monitorações de tratamentos (GONZÁLEZ et al., 2001), alterações funcionais dos órgãos (ALMEIDA et al., 2008) e monitoramento do órgão após transplantes.

Dentre outras finalidades, o exame bioquímico exerce papel importante na avaliação da função renal (BERGONSO, 2007), podendo esta ser determinada pela mensuração de ureia e creatinina.

A ureia é gerada pelo fígado e é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo. Ela é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas (BURTIS et al., 2008).

A creatinina é derivada do catabolismo da creatina, existente em grande quantidade nos músculos esquelético e cardíaco, fígado e rins, resultando na produção de fosfato inorgânico e creatinina, e esta é normalmente excretada pelos rins, principalmente por filtração glomerular (GUYTON e HALL, 2006). O aumento da taxa de creatinina no sangue ocorre em todas as patologias renais em que há diminuição da filtração glomerular. A dosagem de creatinina deve ser realizada em paralelo com a de ureia para uma melhor avaliação da reversibilidade da lesão. A creatinina não é marcadamente influenciada pela dieta ou por hemorragias intestinais, mas uma severa perda muscular poderá reduzir sua quantidade (BERGONSO, 2007).

A avaliação hepática mede as respostas às alterações anatômicas ou bioquímicas do fígado (YEN et al., 2005). Dentre os testes utilizados para esta avaliação pode-se incluir as dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL).

A ALT é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente plasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática (SCHUMANN et al., 2002).

A AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo (SCHUMANN et al., 2002).

A FAL é composta por um grupo de isoenzimas associadas à membrana, localizada em vários tecidos, mas somente dois são importantes para o diagnóstico, o tecido ósseo e hepatobiliar. Está presente no fígado (células epiteliais do ducto biliar), ossos (osteoblastos), intestinos, rins e placenta (FELDMAN et al., 2000).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido sob o número de protocolo 23091.002005/2013-23.

5.1 FÊMEAS RECEPTORAS E MANEJO

Como receptoras foram utilizadas camundongas imunodeficientes da linhagem BALB/c Nude ($n = 9$) e C57BL6 SCID ($n = 12$), adultas (entre 60-80 dias de vida). Para comprovação do desenvolvimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal das receptoras, realizou-se lavado vaginal prévia ao transplante para observação das diferentes fases do ciclo estral.

Foram utilizadas ainda, oito fêmeas de cada linhagem para servirem de controle para lavado vaginal durante 30 dias e eutanásia para avaliação da bioquímica plasmática. Os dados coletados serviram para posteriores comparações.

Todos os animais do experimento foram mantidos em estantes com mini-isoladores esterilizados e de pressão positiva a 22°C com fotoperíodo de 14:10 (luz:escuridão), alimentados *ad libitum* com ração, água filtrada e sementes de girassol, sendo todos esses itens autoclavados 24 horas antes da oferta aos mesmos. Os procedimentos de manutenção semanal (troca do mini-isolador, ração, girassol e água), manejo geral ou sempre que necessário promover algum tipo de observação e manipulação dos animais, foram realizados em fluxo laminar. Adicionalmente, os animais foram inspecionados diariamente quanto a possíveis alterações de comportamento e/ou saúde.

Todas as camundongas (primeira geração) foram obtidas após cruzamentos realizados do Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões (LTG-PIVE) localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As matrizes utilizadas para a replicação da colônia foram provenientes da Fundação da Universidade de São Paulo (FUSP - São Paulo).

5.2 SELEÇÃO DAS DOADORAS DOS OVÁRIOS

Foram utilizados sete ovários de novilhas mestiças oriundas de matadouro local. Tais ovários apresentavam-se em início de onda folicular, com presença de folículos antrais e ausência de corpo lúteo. A colheita ocorreu imediatamente após o abate e os ovários foram lavados rapidamente com solução fisiológica a 0,9%, inseridos em tubos cônicos estéreis (50 mL), identificados em função da idade da doadora e, em seguida, transportados em solução fisiológica a 0,9% com antibióticos (100 µg/mL de penicilina) e mantidos a 37°C durante o transporte ao LTG-PIVE.

5.3 PROCESSAMENTO DO TECIDO OVARIANO DOADOR

Os ovários colhidos tiveram seus tecidos corticais delicadamente manipulados com auxílio de pinças e lâminas de bisturi, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 1 mm³ selecionados sob estereomicroscópico. Em seguida, foram acondicionados em meio TALP/HEPES enriquecido com 2% de soro fetal bovino (Sigma - A9647) até o momento do transplante, não se excedendo o limite de 5 horas desde a colheita até o transplante.

Os fragmentos obtidos dos córtices ovarianos das doadoras foram separados em dois grupos: controle (levados diretamente para histologia clássica após sua fragmentação) e aqueles que foram transplantados, sendo eles inseridos sem reanastomose vascular sob a cápsula renal do rim esquerdo das fêmeas receptoras (cinco fragmentos por fêmea).

5.4 CIRURGIA

Inicialmente, todas as camundongas que seriam submetidas aos procedimentos cirúrgicos foram individualmente pesadas para o cálculo da dose anestésica. No protocolo anestésico utilizado foi 2,2,2-tribromoetanol a 2,5%, na dose de 20 mg/kg (BALB/c Nude) e 18 mg/kg (C57BL6 SCID), administrados intraperitonealmente (BEZERRA et al., 2010). A dose anestésica foi ajustada individualmente durante o procedimento cirúrgico para manutenção do plano anestésico desejado de acordo com os parâmetros fisiológicos estáveis e imobilidade. Em roedores não são necessários jejum hídrico ou alimentar prévios ao procedimento cirúrgico, pois o estômago destes animais apresenta um ângulo estreito na curvatura menor que impossibilita o vômito (ARAÚJO, 2010).

Com o intuito de prevenir possíveis interferências da atividade gonadal das receptoras sobre o tecido ovariano a ser transplantado, todas as fêmeas receptoras foram submetidas à ovariectomia bilateral prévia. Para realização deste procedimento, foi realizada a anestesia dos modelos experimentais conforme descrito acima. Realizou-se a antisepsia dos campos cirúrgicos com solução alcoólica de iodo a 2%, seguida pela colocação de panos de campo estéreis. No caso das fêmeas C57BL6 SCID, antes da antisepsia foi realizada tricotomia bilateral dos campos cirúrgicos.

O procedimento cirúrgico foi realizado através de incisões sublombares bilaterais de aproximadamente 1cm, sempre caudal à última costela, com uso de tesoura íris reta de 12 cm e auxílio de pinça de íris curva serrilhada de 10cm. Após identificação das bolsas ovarianas, o ovário correspondente a cada um dos antímeros foi removido com o auxílio de pinça curva serrilhada de dissecação. Após a retirada dos ovários, foi realizada uma inspeção da cavidade quanto a possíveis hemorragias e, ao observar-se normalidade hemostática, deu-se continuidade a cirurgia.

Em seguida, foi localizado e exteriorizado o rim esquerdo. Sua cápsula renal foi delicadamente aberta com auxílio de uma pinça de íris serrilhada de 10 cm e os fragmentos previamente selecionados ($n = 5$) do tecido ovariano da fêmea doadora foram inseridos individualmente na região subcapsular. Realizada a inserção dos fragmentos, foi verificada a ocorrência de quaisquer anormalidades tanto no tecido renal quanto no ovariano recém-implantado e, na ausência dessas, os tecidos foram devolvidos à posição anatômica de origem. Por fim, os tecidos musculares, subcutâneo e dérmico foram suturados com fio cirúrgico inabsorvível (monofilamento nylon 6-0 agulhado).

Ao final do procedimento descrito, os animais foram acondicionados em mini-isoladores aquecidos a 37° C até a completa recuperação do plano anestésico e analgesiados com uso de cetoprofeno na dose de 0,8 mg/Kg de peso vivo por via intraperitoneal a cada 12 horas no período de 2 dias. Nos dias seguintes da cirurgia, os animais ficaram sob observação quanto a possíveis sinais de hemorragia, deiscência dos pontos e/ou infecção.

Os ovários retirados na ovariectomia das camundongas serviram para estudos posteriores.

5.5 LAVADO VAGINAL

Transcorridos cinco dias do procedimento cirúrgico, foi realizada lavado vaginal nas fêmeas transplantadas para avaliação do ciclo estral a cada 12 horas, durante 55 dias. Para

tanto, os animais foram devidamente contidos e foi utilizada uma micropipeta de 20 µl acoplada com ponteiros de 10-100 µl e solução fisiológica a 0,9%. Os lavados foram avaliados a microscopia de luz, a fresco e sem coloração, em aumento de 20x.

A classificação para lavado vaginal foi baseada nos critérios estabelecidos por COOPER et al. (1993).

5.6 ESTÍMULO HORMONAL E COLHEITA DO MATERIAL

As fêmeas receptoras foram divididas em 3 grupos experimentais de acordo com a realização ou não de estímulo hormonal, onde:

- Grupo 01 (G1): controle (n = 3 BALB/c Nude; n = 4 C57BL6 SCID), animais que não receberam tratamento hormonal;
- Grupo 02 (G2): eCG (n = 3 BALB/c Nude; n = 4 C57BL6 SCID), animais que receberam 10 UI de eCG*;
- Grupo 03 (G3): FSH+LH (n = 3 BALB/c Nude; n = 4 C57BL6 SCID), animais que receberam 10 UI de FSH+LH**.

Sessenta dias após o procedimento cirúrgico, o transplante foi retirado das receptoras do grupo G1. O eCG foi aplicado em dose única e a associação de FSH com LH foi administrada durante dois dias a cada 12 horas. Após 48 horas do estímulo hormonal, foi realizada a retirada dos transplantes das receptoras dos grupos G2 e G3.

Todos os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de 2,2,2 tribromoetanol e posterior deslocamento cervical. Todos os tecidos retirados foram levados à histologia clássica.

5.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os tecidos colhidos após 60 e 62 dias do início do experimento foram fixados em solução Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) durante 8 horas e, posteriormente, desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados de forma semi-seriada à espessura de 5 µm para posterior coloração com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM).

* eCG: Novormon®

** FSH+LH: Pluset®

5.8 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO TECIDO OVARIANO

O tecido ovariano foi avaliado quanto à integridade do seu parênquima, qualidade dos folículos ovarianos, bem como sua vascularização, avaliando-se presença dos vasos. Adicionalmente, realizou-se classificação folicular tanto nos ovários controle como nos fragmentos transplantados, de acordo com o tipo e o número de camadas de células da granulosa que circundavam o oócito seguindo os padrões morfológicos de Rodgers e Irving-Rodgers (2010). Os folículos pré-antrais (FOPA) foram assim divididos: primordiais - continham um oócito circundado por uma camada parcial ou completa de células pavimentosas da pré-granulosa; primários - possuíam uma camada de células da granulosa cúbicas; secundários - continham duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas sem antro visível; e folículos antrais: antral - aqueles com uma, ou mais, pequenas áreas de fluido folicular (antro) e pré-ovulatórios - possuíam um halo ou camada de células do *cumulus* circundando o oócito. Os folículos atrésicos possuíam a mesma classificação dos folículos normais quanto ao tipo e número de camadas, diferindo dos mesmos por apresentarem picnose nuclear, danos citoplasmáticos, desconexão entre células da granulosa e o ovócito, bem como irregularidades na membrana basal (MACEDO, 2007).

5.9 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

Para a avaliação termográfica foi utilizada uma câmera termográfica infravermelha (FLIR). As imagens foram realizadas a 20 cm do tecido em estudo, observando em três diferentes momentos a viabilidade do mesmo: M1 – coleta do ovário no abatedouro; M2 – logo após a fixação do transplante e M3 – 60 e 62 dias após o transplante, quando os animais foram submetidos à laparotomia para avaliação dos tecidos. Após a captura das imagens, estas foram repassadas ao Software Flir para a avaliação dos gradientes de temperatura nos diferentes tempos.

5.10 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA

O procedimento de coleta de sangue foi realizado no período da manhã, a fim de se evitar variações nos parâmetros. Inicialmente, o animal foi anestesiado com 2,2,2 tribromoetanol por via intraperitoneal no quadrante lateral inferior direito. Após a anestesia geral, cuja profundidade foi avaliada pela ausência do reflexo podal, realizou-se a punção

cardíaca de acordo com Hoff (2000). O volume total de sangue coletado nos animais foi de aproximadamente 1mL. Após este procedimento os animais foram eutanasiados. A verificação do óbito dos animais foi realizada pela ausência de sinais vitais como batimentos cardíacos e movimentos respiratórios.

O sangue de cada animal foi colocado em microtubos graduados de 1,5mL, previamente identificados e, posteriormente centrifugados à 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do soro. Todas as análises bioquímicas foram validadas e realizadas no Laboratório do Hospital Veterinário Dix Sept Rosado – UFERSA, por meio de espectrofotometria, utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático Bioplus-200. A avaliação da função renal e hepática foi determinada por meio da dosagem de ureia, creatinina, ALT, AST e FAL, sendo utilizados kits comerciais.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados relativos à morfologia do rim e tecido ovariano foram qualitativamente.

As médias da duração das fases do ciclo estral, da avaliação termográfica e dos dados bioquímicos foram comparadas por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os dados de desenvolvimento tecido transplantado e indução hormonal foram trabalhados por meio de porcentagem.

Todas as comparações foram realizadas em função dos grupos experimentais com nível de probabilidade de 5%. Sendo utilizado para tal finalidade o BioEstat 5.0 e o Microsoft Office Excel 14.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 TEMPO CIRÚRGICO

O tempo médio do procedimento cirúrgico realizado foi de 17:59 minutos para os animais BALB/c Nude e de 17:52 minutos para os C57BL6 SCID. Todo o procedimento consistiu da realização da ovariectomia bilateral, inserção dos fragmentos sob a cápsula renal, diérese e sutura dos planos cirúrgicos (Tabela 1). Segundo Liu et al. (2002), o transplante para a região da cápsula renal de camundongas foi realizado em aproximadamente 30 minutos. O tempo médio do procedimento cirúrgico do presente trabalho é menor que o observado nesta investigação sob as mesmas circunstâncias, demonstrando que xenotransplante ovariano foi exequível. Para a execução de transplantes, quanto menor o tempo cirúrgico de um procedimento melhor, pois fará que o tecido doador sofra menos com a isquemia.

Tabela 1 – Média $\pm$ desvio padrão em minutos dos procedimentos cirúrgicos realizados em camundongas submetidos ao xenotransplante ovariano.

	Tempo percorrido durante os procedimentos (min)				
	M 01	M 02	M 03	M 04	M 05
BALB/c Nude	01:45 $\pm$ 1,94	05:20 $\pm$ 1,93	05:04 $\pm$ 2,06	05:50 $\pm$ 2,03	17:59 $\pm$ 4,83
C57BL6 SCID	01:46 $\pm$ 0,60	06:08 $\pm$ 1,24	04:57 $\pm$ 1,13	05:00 $\pm$ 1,09	17:52 $\pm$ 2,22

M 01: do início do procedimento cirúrgico até a retirada do ovário direito; M 02: tempo percorrido entre a retirada do ovário direito e a retirada do ovário esquerdo; M 03: tempo médio da retirada do ovário esquerdo até o momento do implante de todos os fragmentos; M 04: tempo percorrido após o implante até a diérese e sutura dos planos cirúrgicos e M 05: tempo percorrido desde o início até o fim de todo o procedimento cirúrgico.

6.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA

As camundongas BALB/c Nude possuem uma espessa camada adiposa em torno do abdômen e entre as vísceras, provavelmente para compensar as perdas de temperatura corporal em função da sua ausência de pelos o que dificultou, parcialmente, o acesso aos órgãos de interesse. Ainda nessa linhagem, observou-se que os rins são proporcionalmente maiores dos que os da linhagem C57BL6 SCID (Figura 3), o que poderia ser um fator positivo para o procedimento de transplante se a cápsula renal não fosse tão aderida, frágil e dificultasse assim a inserção dos fragmentos ovarianos. Dessa maneira, apesar de anatomicamente menor, as camundongas C57BL6 SCID proporcionaram uma técnica cirúrgica mais fácil. Todos os animais apresentaram cicatrização completa da pele e musculatura cerca de cinco dias após o procedimento cirúrgico.



Figura 3 – Rim direito de camundongas BALB/c Nude e C57BL6 SCID. Acervo pessoal.

A escolha do local do transplante pode ter consequências diretas no que diz respeito a viabilidade e revascularização do tecido e posterior ativação folicular após o transplante, com isso, no presente estudo os fragmentos ovarianos foram transplantados sob a cápsula renal de camundongas BALB/c Nude e C57BL6 SCID devido sua vasta vascularização. Hernandez-Fonseca et al. (2004) demonstraram que os transplantes ovarianos de bovinos implantados sob a cápsula renal de SCID macho produziu significativamente mais folículos em crescimento do que aqueles implantados no subcutâneo. Yang et al. (2006) observaram também, que a recuperação do transplante realizado no subcutâneo (56-58%) foi menor do que quando realizado na *bursa ovarica* (98-100%) e sob cápsula renal (93-95%), corroborando assim com o sítio escolhido para realização desse projeto.

Durante a recuperação dos transplantes pode-se observar macroscopicamente a vascularização dos mesmos, constatando assim que houve 83% (n = 10/12) de desenvolvimento do tecido transplantado nas fêmeas C57BL6 SCID e 77% (n = 7/9) nas BALB/c Nude (Figura 4).

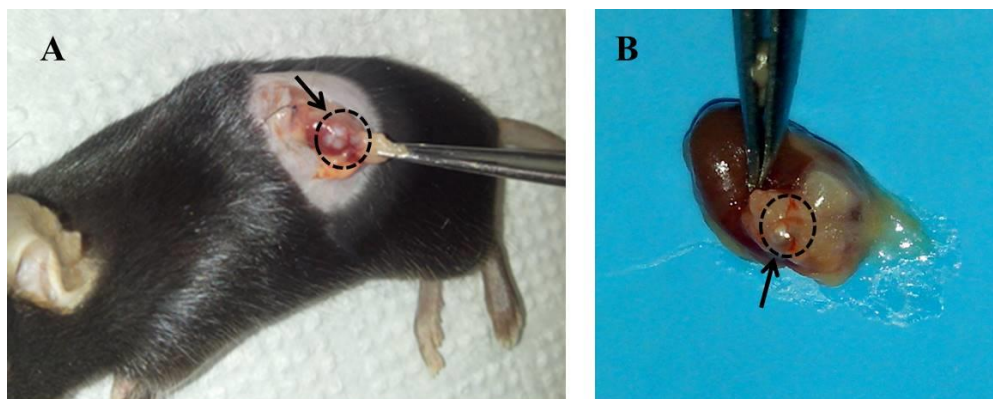


Figura 4 – Fragmento de córtex ovariano de novilha mestiça coletado após 60 dias da realização do xenotransplante em camundonga C57BL6 SCID. A: Seta indica o desenvolvimento ovariano sob a cápsula renal. B: Seta indica a vascularização do tecido xenotransplantado.

O estado fisiológico das receptoras pode influenciar o transplante e/ou sobrevivência folicular. Em alguns estudos de transplante ovariano, fêmeas ovariectomizadas bilateralmente foram as mais utilizadas devido suas concentrações elevadas de gonadotrofinas após a ovariectomia, acreditando-se ser benéfico para a sobrevivência do transplante e o desenvolvimento folicular (CANDY et al., 1995; GOSDEN et al., 1994; WOLVEKAMP et al., 2001) porém, a resposta hormonal da receptora pode depender da espécie doadora e ainda da idade da mesma (PARIS et al., 2004) pois, quanto mais velho o animal, menor a quantidade de folículos recrutados fisiologicamente. Razão pela qual o presente estudo optou-se por trabalhar com ovários de novilhas e não de vacas, havendo com isso uma resposta significativa das receptoras ao transplante, observando com isso, mais de 75% do desenvolvimento dos fragmentos nas receptoras.

6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

6.3.1 Avaliação do lavado vaginal

Iniciou-se o lavado vaginal, em ambas as linhagens, a fim de observar as diferentes fases do ciclo estral (Figura 5). O lavado vaginal foi observado a fresco, sem coloração, sob microscopia de luz em aumento de 20x para observação das características celulares, de acordo com o ciclo ovariano, tomando por base estudos publicados (COOPER et al., 1993; SANTOS, 2002b).

Dos animais BALB/c Nude (n = 6/9) apresentaram ciclo estral completo e dos animais C57BL6 SCID (n = 9/12). Nestes, foram observadas todas as fases estrais, todavia, mais prolongadas quando comparadas aos animais controle. KANEKO et al. (2003) e KANEKO et al. (2006) utilizaram da lavado vaginal como método auxiliar na detecção de células cornificadas das receptoras para avaliar o momento certo para realização do estimulação hormonal e tal método tem promovido resultados confiáveis.

Considerando-se o proestro como a primeira manifestação do ciclo estral, a taxa de retorno a atividade ovariana variou de 83% (C57BL6 SCID) a 77% (BALB/c Nude), ocorrendo o início desta atividade após em média 19 ± 9 dias do transplante nas fêmeas C57BL6 SCID e em 9 ± 3 dias nas fêmeas BALB/c Nude, observando-se irregularidade no ciclo estral de animais transplantados.

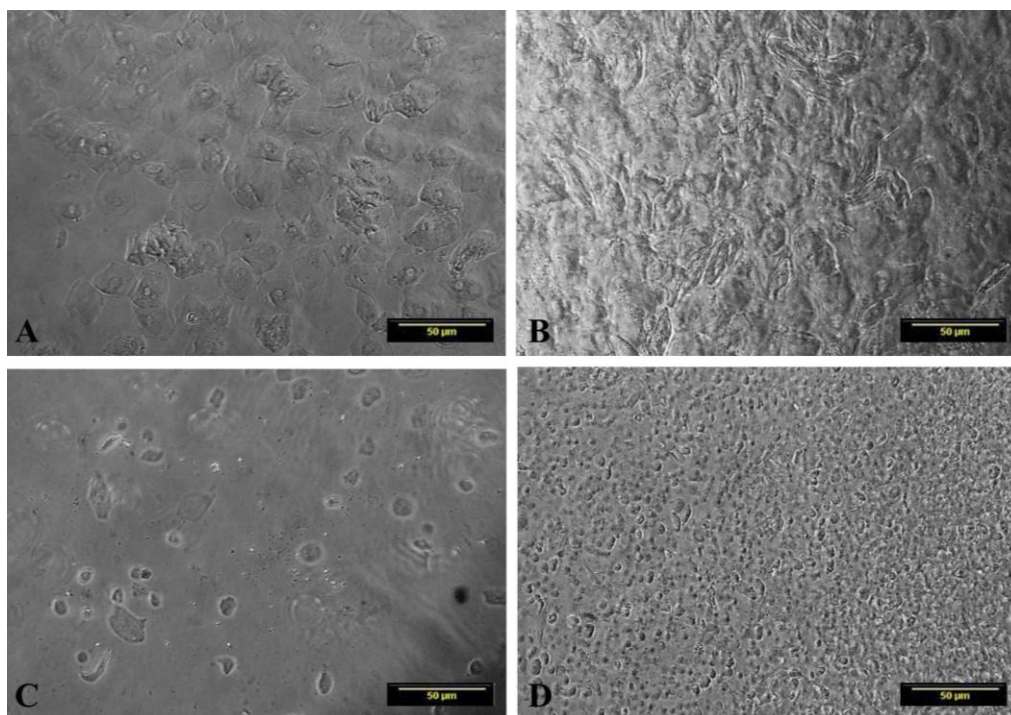


Figura 5 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas imunossuprimidas após xenotransplante. A: proestro – presença de células epiteliais arredondadas e nucleadas (basais e parabasais); B: estro – células queratinizadas em maior proporção; C: metaestro – redução na quantidade de células queratinizadas, algumas células leucocitárias e surgimento de algumas células epiteliais; D: diestro – pequena proporção de células epiteliais e queratinizadas e grande quantidade de células leucocitárias. Fonte: acervo pessoal. Barra de escala: 50 µm. Aumento de 20x.

Na duração das fases estrais da linhagem BALB/c Nude, não se observou diferença estatística ($p > 0,05$). Já na linhagem C57BL6 SCID, a diferença ocorreu no proestro, estro e diestro. Quando comparadas às linhagens transplantadas, o estro foi a única fase que apresentou diferença, sendo a linhagem C57BL6 SCID aquela que permaneceu mais tempo (Tabela 2). A provável explicação para esse aumento, é que animais após o xenotransplante ovariano requerem um tempo maior para reabilitação e revascularização do tecido transplantado, havendo com isso o retardo do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal até reconhecimento do novo tecido ali instalado.

Tabela 2 – Média e desvio padrão (horas) da duração das fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais		Fases do ciclo estral			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
BALB/c Nude	Controle	$72 \pm 0,95^a$	$48 \pm 0,98^a$	$24 \pm 0,79^a$	$72 \pm 1,13^a$
	Transplante	$72 \pm 1,29^{aA}$	$48 \pm 1,27^{aB}$	$18 \pm 0,00^{aA}$	$96 \pm 1,38^{aA}$
C57BL6 SCID	Controle	$12 \pm 0,70^b$	$96 \pm 1,87^b$	$12 \pm 0,00^a$	$48 \pm 1,23^b$
	Transplante	$48 \pm 1,24^{aA}$	$264 \pm 9,03^{aA}$	$12 \pm 0,00^{aA}$	$72 \pm 1,32^{aA}$

Letras minúsculas indicam comparação dentro da linhagem. Letras maiúsculas indicam comparação entre as linhagens transplantadas.

6.3.2 Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais

Foram observados folículos em todas as fases de desenvolvimento e sem alterações morfológicas nos transplantes recuperados (Figura 6), sendo observada presença de folículos pré-antrais (primordial, primário e secundário) e folículos antrais do tipo terciário. Demonstrando assim, que ambas as linhagens e o sítio receptor escolhido, permitiram o desenvolvimento folicular até a fase antral após o transplante. Tais achados também foram citados por D. Mattiske et al. (2002 - cangurus); Bosch et al. (2004 - gatas); Bezerra (2010 - fetos bovinos). Já os folículos atresícos, quando observados, apresentaram degeneração dos oócitos acompanhada por rompimento de camadas de células da granulosa e núcleos picnóticos das mesmas.

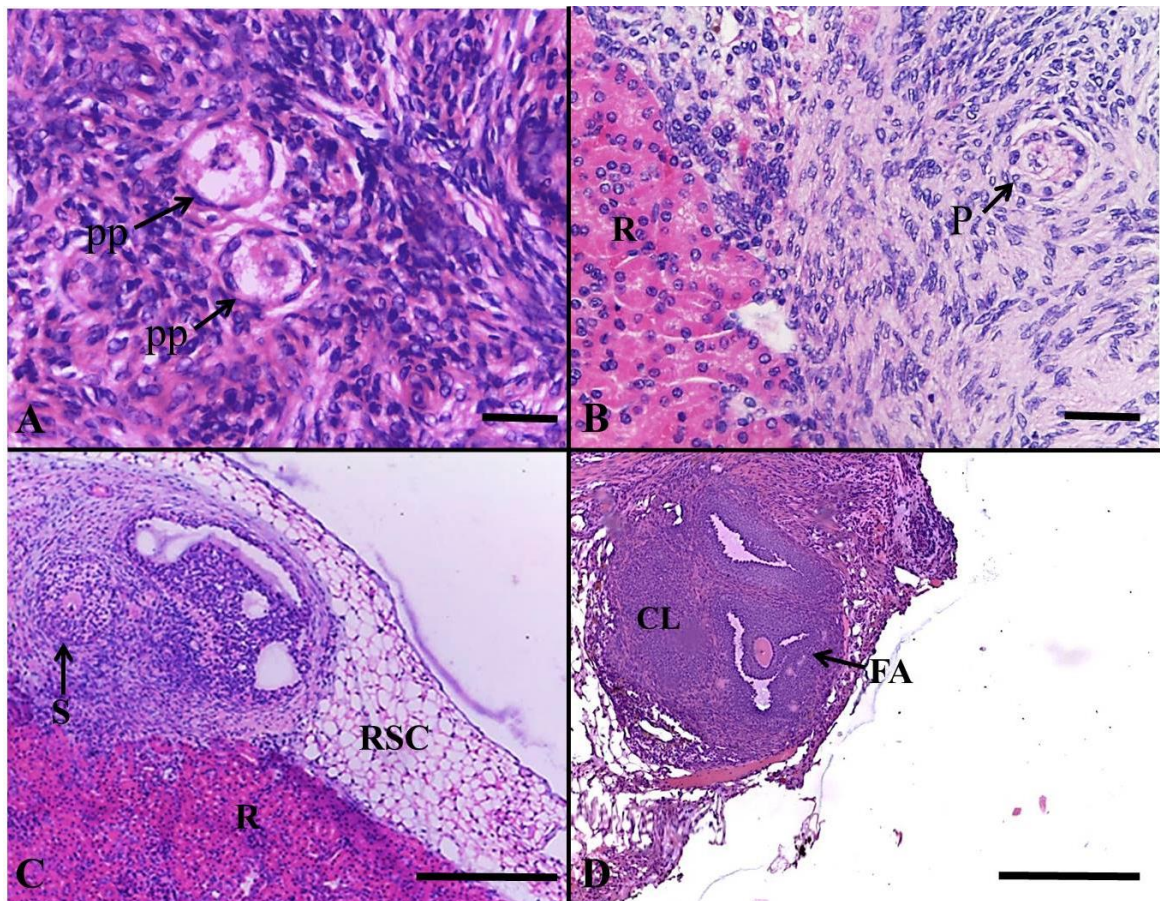


Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de novilha mestiça com oito semanas após o xenotransplante ovariano em receptoras imunossuprimidas. A: folículo primordiais (pp) com uma única camada de célula pavimentosa, 40x. B: folículo primário (P) com uma única camada de célula cuboide, região renal do receptor (R), 40x. C: folículo secundário (S) com mais de duas camandas de células cuboides envolta do oócito, região renal do receptor (R), região da capsula renal do receptor (RSC) contendo tecido conjuntivo, 10x; D: folículo antal (FA) e corpo lúteo (CL). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Barras de escala 100µm. Fonte: Acervo pessoal.

6.3.3 Suprimento vascular para o tecido transplantado

Após dois meses do xenotransplante, o fornecimento vascular oferecido pelo rim das receptoras aos fragmentos do córtex ovariano das doadoras foi considerado morfológicamente semelhante àquele existente no ovário *in situ* das doadoras, ocorrendo a neovascularização em 80% dos animais transplantados da linhagem C57BL6 SCID e em 77% das BALB/c Nude, sendo essas proporções as mesmas encontradas no retorno da atividade ovariana desses animais. Observou-se histologicamente, vasos sanguíneos nos transplantes recuperados (Figura 7). A reperfusão desempenha um papel importante na depleção dos folículos durante os primeiros dias até uma semana após o transplante (SOLEIMANI et al., 2011; YANG et al., 2006). Durante esta fase, o oxigênio e os nutrientes do tecido circundante difundem-se para o transplante, resgatando-o da isquemia e da hipóxia até a formação de novos vasos sanguíneos no interior tanto do transplante como do tecido circundante, até que o processo de revascularização esteja totalmente completo (VAN EYCK et al., 2010).

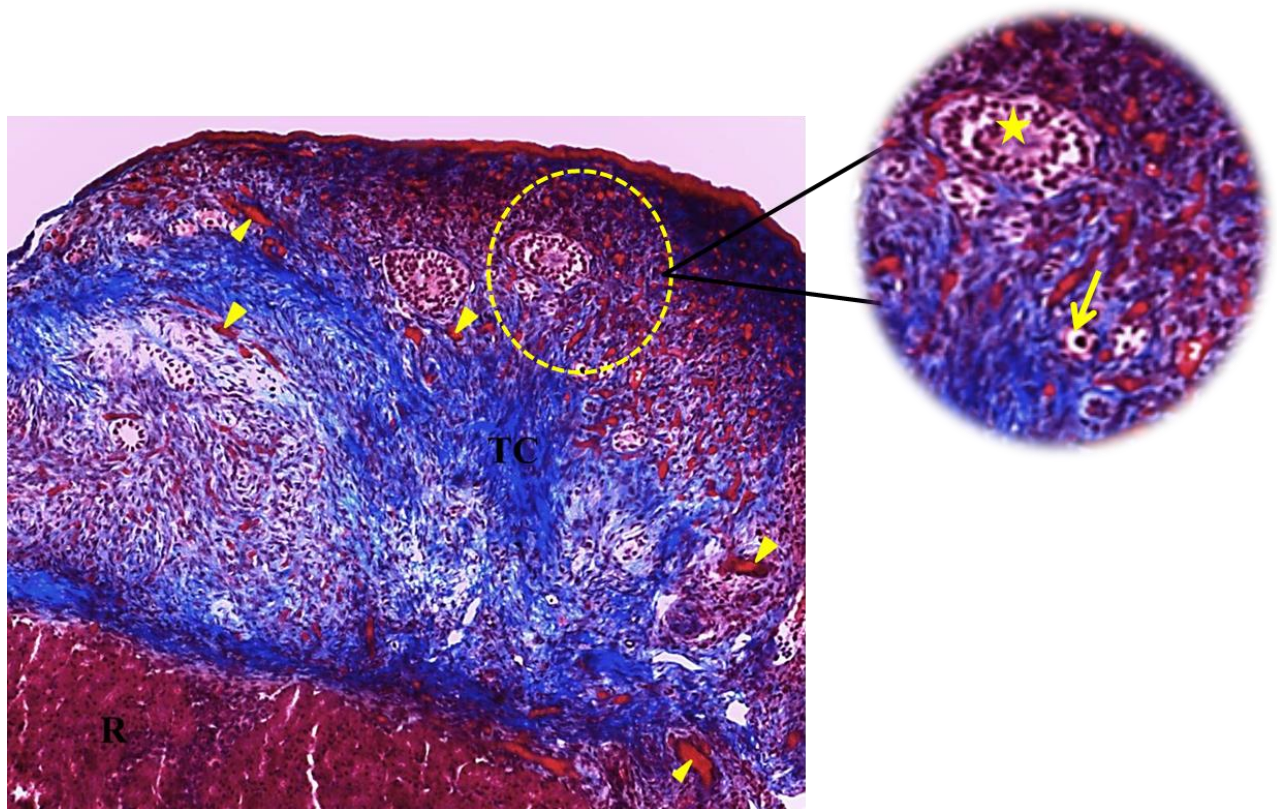


Figura 7 – Fotomicrografia de vasos sanguíneos observados no tecido ovariano bovino após xenotransplante. Semisetas apontam vasos sanguíneos por todo o tecido; seta apontando folículo primordial e estrela amarela mostrando presença de folículo secundário no tecido. TC: tecido conjuntivo; R: região renal do receptor. Coloração: Tricrômico de Masson (TM), 10X.

Os folículos primordiais possuem baixa taxa metabólica, sendo considerados mais resistentes aos efeitos da diminuição de oxigênio do que os demais folículos (KROHN, 1977). Normalmente, os folículos primordiais se desenvolvem sob condições de hipóxia no córtex ovariano, o que pode explicar a sua maior tolerância em relação à isquemia associada ao transplante (GOSDEN e BYATT-SMITH, 1986). Ainda assim, após o transplante do tecido ovariano, uma grande proporção da população dos folículos é perdida devido à privação de oxigênio induzida por isquemia, estimando-se que até 50% dos folículos primordiais pereçam logo após o transplante (FELICIO et al., 1983; JONES e KROHN, 1960). Em camundongos, o transplante é responsável por aproximadamente 42% da perda de folículos (LIU et al., 2002) e esta perda também é observada em transplantes de animais de grande porte (BAIRD et al., 1999). O processo de revascularização do tecido após transplante pode levar mais do que um dia (NUGENT et al., 1997). No entanto, é provável que a neovascularização demore mais tempo quando o doador for de humano ou bovino (VAN EYCK et al., 2009). O tempo de vida do tecido cortical do ovário transplantado ainda não foi determinado de forma precisa. Transplantes ovarianos podem permanecer funcionais por vários meses (BAIRD et al., 1999; CANDY et al., 2000), até anos (OKTAY et al., 2003). Mas, levando em consideração o fragmento transplantado ser normalmente pequeno ($1\text{-}2\text{mm}^3$) quando comparado ao tamanho original do órgão, o início do crescimento do folículo primordial pode ocorrer rapidamente e a funcionalidade do transplante ir se tornando limitada ao longo do tempo, pois, o esgotamento dos folículos primordiais ocorrerá mais rápido (BOLS et al., 2010).

Outros trabalhos com xenotransplante ovariano também demonstraram vasos sanguíneos evidentes nos transplantes, indicando que a revascularização tinha sido estabelecida (BARROS et al., 2014; BEZERRA, 2010; BOSCH et al., 2004; MATTISKE et al., 2002; SENBON et al., 2003).

6.4 INDUÇÃO HORMONAL

Sob condições fisiológicas, um feedback negativo entre a hipófise e ovário regula a secreção de gonadotrofinas, e, assim, o desenvolvimento do folículo. Para estimular a maturação de folículos em crescimento nos tecidos xenotransplantados, seus animais receptores são muitas vezes tratados com gonadotrofinas exógenas. No presente experimento, foram instituídos dois protocolos hormonais, um com administração de eCG e o outro de FSH+LH. Pode-se observar que as fêmeas C57BL6 SCID e BALB/c Nude apresentaram desenvolvimento do tecido transplantado em 100% dos animais induzidos com FSH+LH e

80% dos animais induzidos com eCG. Além disso, os animais C57BL6 SCID apresentaram corpo hemorrágico em 48% (n = 6) dos seus transplantes, destes 71% foram induzidas por FSH+LH e 29% por eCG (Figura 8). Já as BALB/c Nude não apresentaram corpo hemorrágico. No quesito desenvolvimento folicular, as fêmeas induzidas com eCG obtiveram o melhor resultado quando comparadas entre os diferentes protocolos, sendo o protocolo de escolha para indução hormonal para esta espécie doadora. O perfil hormonal do receptor pode influenciar o resultado dos transplantes e para obtenção de folículos antrais, prontos para a maturação *in vitro*, são necessárias concentrações adequadas de gonadotrofinas cujas fontes podem ser endógenas ou exógenas. Com isso, acredita-se que deve ser estabelecido um protocolo hormonal mais eficiente de modo a não observar a presença do corpo hemorrágico, pois a intenção da indução hormonal é conseguir oócitos viáveis para utilização em outras técnicas reprodutivas, principalmente para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Todavia, faz necessário salientar que como houve presença de corpo hemorrágico, possivelmente, houve ativação folicular completa do tecido do doador, pois o corpo hemorrágico nada mais é que um folículo que ovulou.

Oktay et al. (1998) injetaram FSH em camundongos SCID em dias alternados durante as últimas 6 das 17 semanas após o xenotransplante ovariano humano. No grupo controle não tratado, os folículos não avançaram além de folículos secundários, enquanto que no grupo tratado com FSH, encontrou-se folículos antrais. Da mesma forma, Senbon et al. (2005) administraram gonadotrofina coriônica equina (eCG) 48 horas antes de eutanasiar um grupo de camundongas SCID xenotransplantadas com folículos secundários de bovino, havendo desenvolvimento dos folículos ao ponto de seus oócitos atingirem tamanho adequado para maturação. Vários outros estudos em outras espécies objetivando melhor desenvolvimento ovariano em xenotransplantes também observaram que o tecido responde melhor após induções hormonais (wombat: CLEARY et al., 2003; gatas: BOSCH et al., 2004; suínos: KANEKO et al., 2003; KANEKO et al., 2006; KANEKO et al., 2013). O que ainda não foi estabelecido é se o protocolo hormonal deve ter em vista o tecido doador ou o eixo hipotalâmico-hipofisário do (a) receptor (a).

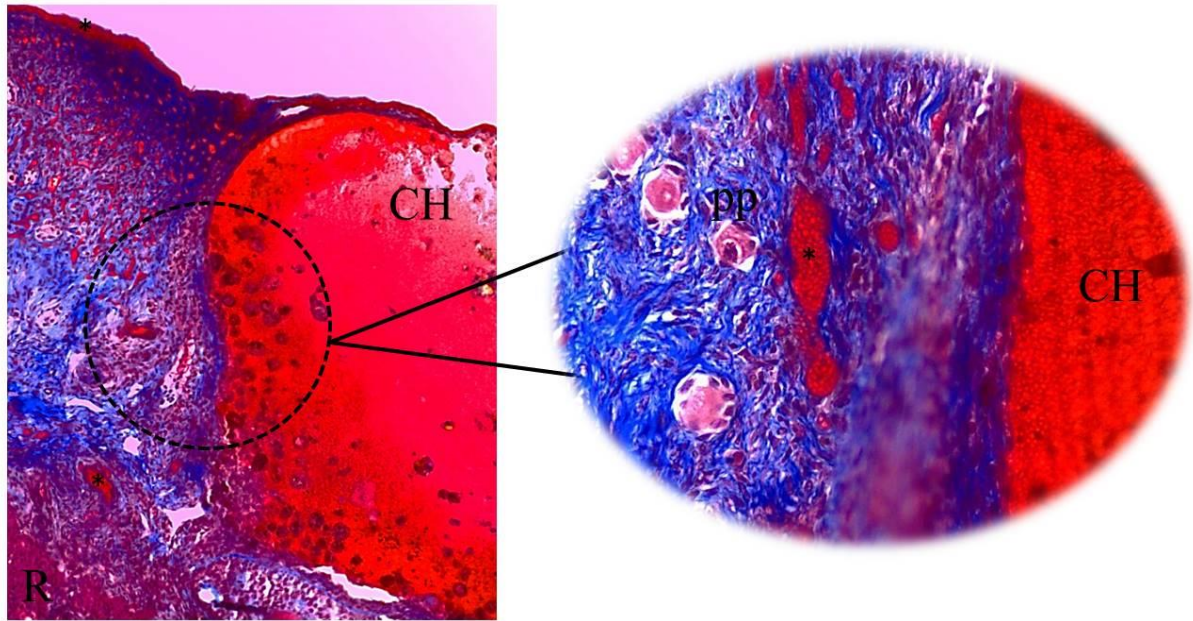


Figura 8 – Tecido ovariano bovino com presença de corpo hemorrágico (CH) após xenotransplante em camundongos C57BL6 SCID estimulados com uma associação de FSH e LH. R - região renal do receptor; pp - folículo primordial; * - presença de vascularização em todo o transplante e envolta do CH. Coloração: TM. Foto da esquerda - 10x. Foto da direita - 40x. Fonte: Acervo pessoal.

6.5 AVALIAÇÃO DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHA

No presente experimento, optou-se por fazer termografia, devido a esta promover a medição da distribuição de temperatura e identificar alterações localizadas de mudança de fluxo na superfície cutânea (RING, 1985). Os órgãos internos por sua vez, não são envoltos por um isolante térmico e prossegue sua fundamentação pela terceira lei de Newton, em que a temperatura é determinada basicamente pelo fluxo do sangue que perfunde o órgão, uma vez expostos ao ambiente (BRIOSCHI, 2000). Quando uma rede arterial em determinado órgão é suprida por sangue aquecido o seu padrão anatômico é claramente observado em imagens térmicas deste órgão (Figura 9) (SUMA, 2000).

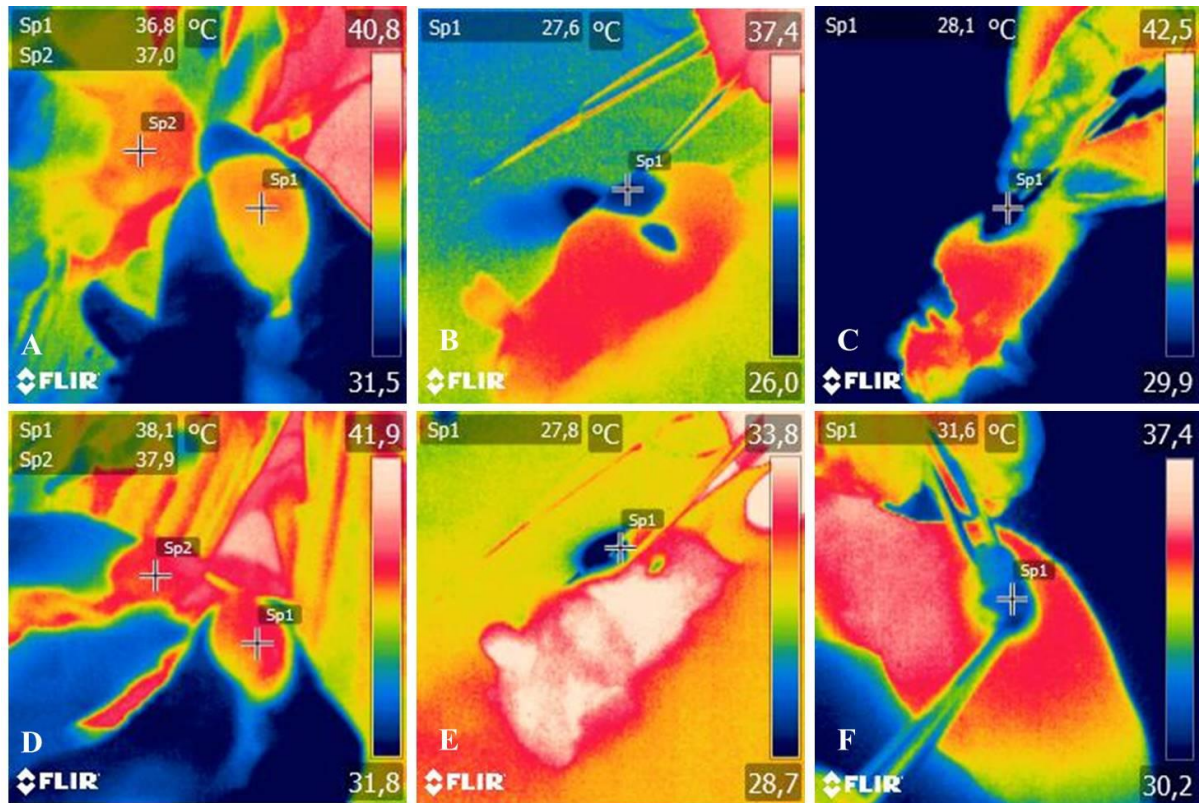


Figura 9 – Imagens de termografia infravermelha do xenotransplante do tecido cortical ovariano sob a cápsula renal em camundongas C57BL6 SCID e BALB/c Nude. A e D: ovário das doadoras (Sp1: direito; Sp2: esquerdo); B e E: implante do tecido ovariano de novilhas mestiças em camundongos imunossuprimidos BALB/c Nude e C57BL6 SCID respectivamente (Sp1: rim esquerdo); C e F: retirada do tecido ovariano após 60 e 62 dias do xenotransplante em BALB/c Nude e C57BL6 SCID respectivamente (Sp1: rim esquerdo). Fonte: Acervo Pessoal.

Embora o método de coleta e fragmentação aplicados aos ovários antes do implante mantenham o tecido ovariano com temperatura aproximada a do animal doador, a isquemia a qual o tecido foi submetido torna a diferença entre os momentos 1 e 2 / 1 e 3 dos BALB/c Nude e C57BL6 SCID significativa (Tabela 3). Todavia, devido ao tamanho reduzido do fragmento e o alto nível de reperusão da cápsula renal, não foi observada diferença estatística entre os momentos 2 a 3 das BALB/c Nude. Houve diferença estatística entre os momentos 2 e 3 dos C57BL6 SCID, sugerindo que esta linhagem, como o esperado, tivesse vantagens na manutenção de sua homeotermia, devido à presença de pelos. Os resultados obtidos com o presente trabalho mostram que a termografia infravermelha não permitiu a distinção entre os tecidos doador e receptor, possivelmente devido ao tamanho dos fragmentos (1mm^3). Contudo, esta técnica demonstrou ser efetiva no monitoramento da temperatura das receptoras e nos sítios de transplante que permitiram o desenvolvimento dos tecidos nos animais de ambas as linhagens sob temperaturas corporais significativamente diferentes.

Tabela 3 – Temperatura (°C) de superfície do ovário íntegro e dos tecidos ovarianos transplantados nos diferentes momentos experimentais.

Momentos	BALB/c Nude	C57BL6 SCID
M1	35,77 ± 1,54 ^{aA}	35,97 ± 1,5 ^{aA}
M2	29,09 ± 2,92 ^{bA}	27,95 ± 2,04 ^{cA}
M3	30,78 ± 1,66 ^{bB}	32,79 ± 1,58 ^{bA}

Letras minúsculas indicam comparação dentro da linhagem. Letras maiúsculas indicam comparação entre as linhagens. M1: momento de avaliação do ovário do doador minutos após o abate; M2: momento de avaliação logo após o implante do tecido ovariano sob a cápsula renal da receptora e M3: momento referido a retirada do transplante após 60 e 62 dias.

6.6 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA

Testes bioquímicos que demonstrem o grau de comprometimento hepático e renal associado aos dados comportamentais permitem uma caracterização do quadro clínico do animal transplantado, avaliando com isso, se o xenotransplante ocasionou algum dano ao receptor. Sendo assim, os dados deste estudo não apresentaram diferença significativa quando a comparação for entre linhagens do mesmo grupo experimental com o controle de seus respectivos grupos, com exceção da ureia (Tabela 4). Como a velocidade de excreção é relativamente constante e a sua proporção não é influenciada pelo metabolismo proteico ou outros fatores externos, a concentração da creatinina é uma excelente medida para avaliar a função renal. As concentrações de creatinina são mais sensíveis e específicas do que a medida da concentração de ureia plasmática no estudo da velocidade e filtração glomerular reduzida. Ainda em relação as concentrações de creatinina, estas muitas vezes não ultrapassam os limites de referência até que 50 – 70% da função renal estejam comprometidas. Portanto, teores dentro da faixa de referência não implicam necessariamente em função renal normal (EMANUELLI et al., 2008). Logo, a importância de avaliar juntamente a função hepática do animal transplantado, sabendo-se com isso, o estado geral do animal e confirmando mais uma vez, que o xenotransplante ovariano sob a cápsula renal de animais imunossuprimidos não altera as condições fisiológicas dos receptores.

Tabela 4 – Valores plasmáticos da função renal e hepática de camundongas imunossuprimidas.

Linhagens	Grupos	Parâmetros				
		UR (mg/dl)	*CR (mg/dl)	*ALT (u/L)	*AST (u/L)	*FAL (u/L)
BALB/C NUDE	Controle	76 ± 4,43 ^b	0,30 ± 0,08	113 ± 6,50 ^a	165 ± 44,80 ^a	183 ± 45,14 ^a
	Controle transplante	57 ± 1,53 ^a	0,26 ± 0,06 ^a	116 ± 24,57 ^a	159 ± 27,56 ^a	187 ± 11,34 ^a
	FSH+LH	67 ± 0,58 ^a	0,30 ± 0,00 ^a	110 ± 27,15 ^a	166 ± 62,45 ^a	189 ± 41,79 ^a
	ECG	62 ± 2,52 ^a	0,30 ± 0,10 ^a	117 ± 44,82 ^a	157 ± 55,12 ^a	185 ± 29,69 ^a
C57BL6 SCID	Controle	63 ± 5,12 ^a	0,35 ± 0,06	79 ± 9,54 ^a	175 ± 36,27 ^a	186 ± 8,42 ^a
	Controle transplante	59 ± 3,813 ^b	0,32 ± 0,08 ^a	83 ± 12,53 ^a	159 ± 1,15 ^a	177 ± 12,34 ^a
	FSH+LH	57 ± 7,40 ^b	0,32 ± 0,04 ^a	82 ± 4,16 ^a	166 ± 29,67 ^a	178 ± 25,42 ^a
	ECG	54 ± 5,81 ^b	0,32 ± 0,11 ^a	79 ± 10,00 ^a	160 ± 27,68 ^a	181 ± 22,19 ^a

Letras minúsculas indicam comparação entre linhagens do mesmo grupo experimental. * Em ambas as linhagens não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FAL: Fosfatase Alcalina.

7. CONCLUSÕES

A análise histológica permitiu o monitoramento da reperfusão e desenvolvimento folicular do transplante, demonstrando ser um método eficaz para avaliar o xenotransplante ovariano complementar ao lavado vaginal.

Novos protocolos hormonais devem ser testados em comparação ao eCG para a obtenção de oócitos aptos para fertilização.

A termografia infravermelha não foi eficiente para distinguir o tecido receptor do doador, devido o tamanho dos fragmentos e a possível influência dos rins na emissão de calor, mas constitui um método de monitoramento do tecido doador pré-transplante, do próprio receptor e de seus tecidos receptores para transplante.

Os animais C57BL6 SCID são mais indicados para procedimento do xenotransplante, quando comparados aos BALB/c Nude, sendo necessárias mais comparações quanto à viabilidade dos tecidos transplantados em ambos modelos

O xenotransplante sob a cápsula renal não compromete as funções renal e hepática do animal receptor, reafirmando a escolha acertada do sítio receptor.

8. REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M.; MARTINEZ-MADRID, B.; LEROY, J. L.; VAN AELST, S. V.; BOLS, P. E. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of nude mice. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.
- ALMEIDA, A. S.; FALEIROS, A. C. G.; TEIXEIRA, D. N. S.; COTA, U. A.; CHICA, J. E. L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 6, p. 429-32, 2008.
- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V. K. O. G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; DE MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. 1 ed. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. p.122, 2004.
- ANDRADE, E. R.; SILVA, L. D. M.; MORAES, M. O.; SENEDA, M. M.; TONIOLLI, R. Cultivo in vivo de folículos pré-antrais - Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-72, 2004.
- ARAÚJO, S. A. C. **Anestesia em Roedores. Dissertação** (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2010.
- AUBARD, Y. Ovarian tissue xenografting. **European Journal of Obstetrics e Gynecology and Reproductive Biology**, v. 108, p.14-18, 2003.
- BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B.; DE SOUZA, C.; TELFER, E. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.113(Suppl 1), p.55–59, 2004.
- BAIRD, D. T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; HARKNESS, L. M.; GOSDEN, R.G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. **Endocrinology**, v.140, p.462–471, 1999.
- BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, p.565-587, 1991.
- BARROS, F. F. P. C.; TEIXEIRA, P. P. M.; SILVA, M. A. M.; SILVA, A. S. L.; MEDEIROS, R. M.; COELHO, C. M. M.; VICENTE, W. R. R. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.38, n.2, p.121-126, 2014.

- BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 36, n.2, p. 433-448, 2008.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.479-486, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, p. 218, 2000c.
- BEDAIWY, M. A.; SHAHIN, A. Y.; FALCONE, T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. **Fertility and Sterility**, v.90, n.6, p. 2031-2055, 2008.
- BENITES, N. R. Medicamentos empregados para a sincronização do ciclo estral e transferência de embriões. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 287-298, 1999.
- BERGONSO, T. H. D. **Valores bioquímicos referenciais de javali (*Sus scrofa scrofa*, *Linnaeus, 1758*)**, confinados em fazendas do estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2007.
- BEZERRA, M. B. 2010. **Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante**. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo.
- BEZERRA, M. B.; CARMO, N. A.; MACEDO, M. F. Transplantes Gonadais: estado da arte. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.325-338, 2012.
- BEZERRA, M. B.; MACEDO, M. F. Transplante Ovariano. In: OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R.; TEIXEIRA, P. P. M. **Biotecnias Reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1ed. São Paulo: MedVet Livros, v. 1, p. 235-245, 2013.
- BEZERRA, M. B.; PACHECO, M. R.; MINGOTI, G. Z.; MACEDO, M. F.; VICENTE, W.R.R. Potencial do cultivo in vitro e do xenotransplante na sobrevida e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.483-489, 2011.
- BEZERRA, M. B.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; TEIXEIRA, A. C. G.; SANTOS, N. O.; MACEDO, M. F.; IZZO, R. G.; RICARTE, A. R. F. Avaliação termográfica de tecido ovariano autotransplantado em camundongas da linhagem Balb-C. **Anais... XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. Natal-RN. p.195. 2014.

- BLEACH, E. C.; GLENCROSS, R. G.; FEIST, S. A.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Plasma inhibin A in heifers: relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. **Biol. Reprod.**, v. 64 n. 3, p. 743-52, 2001.
- BOLS, P. E. J.; AERTS, J. M. J.; LANGBEEN, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; LEROY, J. L. M. R. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. **Theriogenology**, v.73, n.6, p.740-747. 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.
- BRIOSCHI, M. L.; CIMBALISTA, J. R. M.; COLMAN, D.; MACHUCA, T. N.; ROCHA LOURES, D. R. L. Termo-coronário-angiografia: padronização do método e primeiras aplicações clínicas no Brasil. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, São Paulo, v.17 n.2, p.15-19, 2002.
- BRIOSCHI, M. L.; CIMBALISTA, J. R. M.; NAKAGAWA, C. R.; VON BAHTEN, L. C.; BROFMAN, P. S. Avaliação intraoperatória da revascularização cardíaca por angiografia térmica coronária: estudo experimental preliminar. **Arq. Méd. PUCPR**, Curitiba, v.2, p.33, 2000.
- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. . **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 10, n. 9, p. 2334-2338, 1995.
- CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1300-1304, 2000.
- CLEARY, M.; PARIS, M. C. J.; SHAW, J.; JENKIN, G.; TROUNSON, A. Effect of ovariectomy and graft position on cryopreserved common wombat (*Vombatus ursinus*) ovarian tissue following xenografting to nude mice. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, n. 6, p. 333-342, 2003.
- COOPER, R. I.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH, J. G. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In: **Female Reproductive Toxicology, Methods**

- in **Toxicology**, v. 3, Part B, Heindel, J. J., Chapin, R. E. (eds), Capítulo 4. San Diego: Academic Press, p. 45.55, 1993.
- CUPERSCHMID, E. M.; CAMPOS, T. P. R. Os curiosos xenoimplantes glandulares do doutor Voronoff. **História, Ciências e Saúde**, v.14, n.3, p.737-760, 2007.
- DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. **Oncologist**, v.12, p.1437-1442, 2007.
- DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The lancet**, v. 16, p. 1405-1410, 2004.
- DONNEZ, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; JADOUL, P.; LANGENDONCKT, A. V.; 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.; PIRARD, C.; DEMYLLE, D.; DELBAERE, D.; ARMENIO, L.; ENGLERT, Y.; CHERON, A.; JADOUL, P.; DOLMANS, M.M. Live birth after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. **Human Reproduction**, v.26 n.6: p.1384-1388, 2011.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. 567p.
- EIMANI, H.; SIADAT, S. F.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; PARIVAR, K.; VALOJERDI, M. R.; SHAHVERDI, A. Comparative study between intact and non-intact intramuscular auto-grafted mouse ovaries. **Reproductive biomedicine online**, v. 18, n. 1, p. 53-60, 2009.
- EMANUELLI, M. P.; DOS ANJOS, LOPES. S. T.; MACIEL, R. M.; GARMATZ, B. C.; DE OLIVEIRA, TAVARES M. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 251-255, 2008.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim. Reprod., Sci.**, v. 78, n. 3/4, p. 203-216, 2003.
- FAIR, T.; HULSHOF, S. C.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, n. 2, p. 208-15, 1997.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

- FELICIO, L. S.; NELSON, J. F.; GOSDEN, R. G.; FINCH, C. E. Restoration of ovulatory cycles by young ovarian grafts in aging mice: potentiation by long term ovariectomy decreases with age. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 19, p. 6076-6080, 1983.
- FOSTER, H.; SMALL, D.; FOX, G. **The mouse in biomedical research**. New York: Academic Press, p.272, 1983.
- FURUKAWA, F. Photosensitivity in cutaneous lúpus erythematosus: lessons from mice and men. **J. Dermatol. Sci.**, v.33, p.81-89, 2003.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca; 2008.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; CARVALHO, V.; MÖLLER, V. A.; DUARTE, F. R. Perfil bioquímico sangüíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**. 2001; 29:1-6.
- GORBACH, A. M.; WANG, H.; DHANANI, N. N.; GAGE, F. A.; PINTO, P. A.; SMITH, P. D.; ELSTER, E. A. Assessment of critical renal ischemia with real-time infrared imaging. **J. Surg. Res.**, New York, v.149, p.310-318, 2008.
- GOSDEN, R. G.; BOULTON, M. I.; GRANT, K.; WEBB, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal Reproduction and Fertility**, v.101, n.3 p. 619-23, 1994.
- GOSDEN, R. G.; BYATT-SMITH, J. G. Oxygen concentration gradiente across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. **Human Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 65-68, 1986.
- GUNASENA, K. T.; LAKEY, J. R. T.; VILLINES, P. M.; BUSH, M.; RAATH, C.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal reproduction science**, v. 53, n. 1, p. 265-275, 1998.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol. Reprod.**, v.62, n.5, p.1322-1328, 2000.
- GUYTON, S. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; BOSCH, P.; MILLER, D. P.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKETT, B. G. Time course of follicular development after bovine

- ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. **Fertility and Sterility**, v.83, n.1, p.1180-1187, 2005.
- HERNANDEZ-FONSECA, H.; BOSCH, P.; SIRISATHIEN, S.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKETT, B. G. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. **Fertility and sterility**, v. 81, p. 888-892, 2004.
- HERRMANN, G.; SPANEL-BOROWSKI, K. A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary. **Anatomy Histology and Embryology**. v.27, n.3, p.143-6, 1998.
- HOFF, J. Methods os blood colletion in the mouse. **Lab. Anim.** v.29, n.10, p.47-53, 2000.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.
- IBGE, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 12/12/2014.
- JOHNSON, M. Laboratory Mice and Rats. 2012. Disponível em: <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>. Acesso em: 28/12/2014.
- JONES, E. C.; KROHN, P. L. Orthotopic ovarian transplantation in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 20, p. 135-146, 1960.
- JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina Ci. Agr.**, v.27, p. 289–298, 2006.
- KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; HOSOE, M.; AKITA, T. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1488-1493, 2003.
- KANEKO, H.; KIKUCHI, K.; NOGUCHI, J.; OZAWA, M.; OHNUMA, K.; MAEDOMARI, N.; KASHIWAZAKI, N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 279-288, 2006.
- KANEKO, H.; NAKAI, M.; TANIHARA, F.; NOGUCHI, J.; KIKUCHI, K. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 887-892, 2013.
- KELLAND, L. R. "Of mice and men": values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. **Eur. J. Cancer**, v.40, p.827-836, 2004.
- KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; KASHIWAZAKI, N.; KANEKO, H. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. **Anim. Sci. J.**, v.82, p.495-503, 2011.

- KOOPMAN, D. E. Cholesteric plate thermography: the state of the art. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.181, p.475-480, 1980.
- KRONH, 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. cap. 3, p. 101-128. 1977.
- 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**, v.17, n.3, p.605-611, 2002.
- MACEDO, M. F. 2007. **Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do autoenxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas**. Jaboticabal, SP: Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), 2007. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 78p.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v.42, n. 4A, p.609-614, 2002.
- MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 433-442, 2007.
- MATTISKE, D.; SHAW, G.; SHAW, J. M. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 143-153, 2002.
- MCDONALD, L. E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.571. 1989.
- MIHM, M.; BLEACH, E. C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, n.3/4, p.217-37. 2003.
- NUGENT, D.; MEIROW, D.; BROOK, P. F.; AUBARD, Y.; GOSDEN, R. G. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 3, p. 267-280, 1997.
- OKTAY, K.; BUYUK, E.; ROSENWAKS, Z.; RUCINSKI, J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **Fertility and sterility**, v. 80, n. 1, p. 193-198, 2003.
- OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, v.13, n.5, p. 1133-1138, 1998.

- PARIS, M. C.; SNOW, M.; COX, S. L.; SHAW, J. M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. **Theriogenology**, v. 61, n. 2, p. 277-291, 2004.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v.42, p.405–426. 2005.
- RIBEIRO, H. D. W.; SILVA, G. A. P.; BRIOSCHI, M. L.; NASCIMENTO, A. J.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; MATIAS, J. E. F. Termografia infravermelha em tempo real como método de avaliação da viabilidade do baço em modelo de esplenectomia parcial em porcos. **Rev. Col. Bras. Cir**, 2009; v.36, n.5, p.438-441. 2009.
- RICARTE, A. R. F.; FAÇANHA, D. A. E.; COSTA, L. L. M. Possibilidades na utilização da Termografia Infravermelha no Diagnóstico Reprodutivo de Caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 380-384, 2014.
- RING, E. F. J.; WATSON, C.; BARKER, J. Infrared thermography and thermal clearance of the skin. **Applied Thermology**. VCH: Weinheim, Germany, p. 133-141, 1985.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 309-318, 2010.
- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. Histórico, avanços e aspectos éticos das biotécnicas de reprodução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.24, n.1, p.10-17, 2000.
- RODRIGUEZ, K. F.; FARIN C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, n.1/2, p.55- 67, 2004.
- SAMANIEGO, M.; BECKER, B. N.; DJAMALI, A. Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 12, p. 688-699, 2006.
- SAMUELSON, PAUL. **Tratado de histologia veterinária**. 1 ed. Rio de janeiro: Elsevier, p.527-563. 2007.
- SANTOS, B. F. **Camundongos mutantes mais utilizados**. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.139-42, 2002a.
- SANTOS, B. F. **Criação e manejo de camundongos**. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.115-8, 2002b.
- SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F.; FÉRARD, G.; FERRERO, C. A.; FRANCK, P. F. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical

- Chemistry and Laboratory Medicine. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gammaglutamyltransferase. **Clin Chem Lab Med.** v.40, n.7, p.734-8, 2002.
- SCOLARI, S. C.; CLARK, S. G.; KNOX, R. V.; TAMASSIA, M. A. Vulvar skin temperature changes significantly during estrus in swine as determined by digital infrared thermography. **J. Swine Health Prod**, v.19, n.3, p.151–155, 2011.
- SENBON, S.; ATSUSHI, O.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Xenotransplantation of Bovine Secondary Follicles into Male and Female SCID Mice. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.21, p.157-161, 2004.
- SENBON, S.; ISHII, K.; FUKUMI, Y.; MIYANO, T. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. **Zygote**, v.13, n.4, p.309-315, 2005.
- SENBON, S.; OTA, A.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v.11, n.2, p.139–149, 2003.
- SHULTZ, L. D.; SCHWEITZER, P. A.; CHRISTIANSON, S. W.; GOTT, B.; SCHWEITZER, I.B.; TENNENT, B.; MCKENNA, S.; MOBRATEEN, L.; RAJAN, T.V; GREINER, D. L. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. **The Journal Immunology**, v.154, n.1, p.180–191, 1995.
- SILBER, S. J. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. **Molecular human reproduction**, v. 18, n. 2, p. 59-67, 2012.
- SILBER, S.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.; GOSDEN, R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 6, p. 2191-2196, 2010.
- SILBER, S.J.; DEROSA, M.; PINEDA, J.; LENAHAAN, K.; GREINER, D.; GORMAN, K.; GOSDEN, R.G. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. **Human Reproduction**, v.23, No.7 pp. 1531–1537, 2008.
- SILVA FILHO, A. R. S.; BURLÁ, J. M. Citologia vaginal a fresco: importância e limitações. **Femina**, v. 30, n. 6, p. 377-380, 2002.
- SIMÕES, M. J. **Aspectos morfológicos e morfométricos de endométrio de ratas albinas nas subfases inicial, intermediária e final do poestro e do metaestro.** 1984. Tese (Doutorado em Histologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.
- SOLEIMANI, R.; HEYTENS, E.; OKTAY, K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19475, 2011.

- SONMEZER, M.; OKTAY, K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 24, n. 1, p. 113-126, 2010.
- STEWART, M., WEBSTER, J. R., SCHAEFER, A. L., COOK, N. J., SCOTT, S. L. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. **Animal Welfare, South Mimms**, v.14, p.319-325, 2005.
- SUMA, H.; ISOMURA, T.; HORII, T.; SATO, T. Intraoperative coronary artery imaging with infrared camera in off-pump CABG. **Ann. Thorac. Surg., Boston**, v.70, p.1741-1742, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Hum. Reprod. Update.**, v.6, n.5, p.457-74, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v.63, n.6, p.17-51, 2005.
- VAN EYCK, A.; JORDAN, B. F.; GALLEZ, B.; HEILIER, J. F.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNEZ, J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 374-381, 2009.
- VILELA, M. G.; SANTOS, JR. J. L. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, 2007.
- VON SCHONFELDT, V.; CHANDOLIA, R.; OCHSENKUHN, R.; NIESCHLAG, E.; KIESEL, L.; SONNTAG, B. FSH prevents depletion of the resting follicle pool by promoting follicular number and morphology in fresh and cryopreserved primate ovarian tissues following xenografting. **Reproductive biology and endocrinology [electronic resource]: RB&E**, v. 10, n. 1, p. 98-98, 2012.
- WOLVEKAMP, M. C. J.; CLEARY, M. L.; COX, S. L.; SHAW, J. M.; JENKIN, G.; TROUNSON, A. O. Follicular development in cryopreserved common wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1, p.135-147, 2001.
- 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.
- YEN, M. H.; WENG, T. C.; LIU, S. Y.; CHAI, C. Y.; LIN, C. C. The hepatoprotective effect of Bupleurum kaioi, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Biol Pharm Bull**. v.28, n.3, p.442-8, 2005.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v.140, p.489-504. 2010.