



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

FERNANDA ARAUJO DOS SANTOS

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS EM
CAMUNDONGAS C57BL/6 SCID E SUA RESPOSTA À GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA**

MOSSORÓ-RN
2015

FERNANDA ARAUJO DOS SANTOS

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS EM
CAMUNDONGAS C57BL/6 SCID E SUA RESPOSTA Á GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA**

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

MOSSORÓ-RN
2015

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Santos, Fernanda Araujo dos.

Xenotransplante ovariano de gatas domésticas em camundongas
C57BL/6 SCID e sua resposta á gonadotrofina coriônica equina /
Fernanda Araujo dos Santos. - Mossoró, 2015.

53f: il.

1. Roedor. 2. Camundonga. 3. Gata doméstica. 4. Xenotransplante
ovariano. 5. Indução hormonal - eCG. I. Título

RN/UFERSA/BOT/823
S237X

CDD 616.438

FERNANDA ARAUJO DOS SANTOS

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS EM
CAMUNDONGAS C57BL/6 SCID E SUA RESPOSTA Á GONADOTROFINA
CORIÔNICA EQUINA**

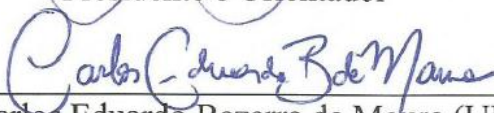
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, *Campus* de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: 29/09/2015

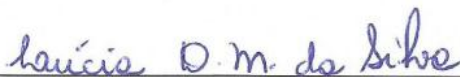
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)
Presidente e Orientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Examinador



Prof.ª Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva (UECE)
Examinadora

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA ARAUJO DOS SANTOS – Nascida em Salvador-BA, no dia 19 de abril de 1989, filha de Fabio Araújo dos Santos e Ivone Cristina Araujo dos Santos. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2013.1. Durante a graduação, foi monitora da disciplina de Patologia clínica por um semestre e aluna do programa de Iniciação Científica (PICI/UFERSA) durante um ano e meio. Em outubro de 2013 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação, ao nível de Mestrado em Ciência Animal pela UFERSA, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de mestrado, desenvolveu trabalhos com transplantes gonadais e produção *in vitro* de embriões.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se mostrou criador, que foi criativo. Pelo seu amor incondicional, sua graça abundante e constante em minha vida, por todas as vezes que ouviu as minhas orações e enxugou as minhas lágrimas e nunca ter me deixado só. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para continuar e finalizar essa etapa em minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

Ao meu orientador, Marcelo Barbosa Bezerra e à minha coorientadora, Michelly Fernandes de Macedo, pelos ensinamentos compartilhados, por sempre acreditarem em mim e por me mostrarem que eu posso ir mais longe!

Às camundongas do meu experimento (*in memoriam*), com as quais lidei todos os dias, pois sem elas eu não teria obtido esses resultados. Devemos sempre respeitar os animais, independente de serem de laboratório ou não.

Aos meus pais, Fabio Araujo dos Santos e Ivone Cristina Araujo dos Santos e minha mãe de criação Maria Ducicleide de Freitas, pela educação, apoio e oportunidade a mim dados. Por todas as sábias palavras ditas, todos os conselhos, todas as orações e todo o cuidado incessante. Vocês são meu alicerce e meus guias, ajudaram a me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão, Artur Araujo dos Santos, por todo apoio nesses anos, companheirismo, amizade, cumplicidade e amor. Por todas as vezes que se alegrou e chorou comigo, pelos segredos e sorrisos compartilhados e pelas vezes que me deixou com raiva também. Amo você!

A todos os meus familiares, que torceram e me deram apoio mesmo distantes.

Aos membros e ex-membros da equipe do laboratório (Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões), Marcelo Barbosa Bezerra, Michelly Fernandes de Macedo; Muriel Magda Lustosa Pimentel; Brenna de Sousa Barbosa; Ana Carolina Guimarães Teixeira; Denilsa Pires Fernandes; Érika Almeida Praxedes; Ícaro Coutinho Cosmo; Mikael Almeida de Lima; Roberta Gonçalves Izzo; Yago Dantas da Mata; Joelma Martins Pereira de Lima e Laysa Ohana Alves, pois vocês também foram parte importante na realização desse experimento. Além de trabalho braçal, vocês também me ajudaram psicologicamente, ouvindo meus desabafos ou me fazendo rir muito. Muito obrigada!

Aos membros da minha equipe, Muriel Magda Lustosa Pimentel, Ana Carolina Guimarães Teixeira, Mikael Almeida de Lima, Ícaro Coutinho Cosmo e Roberta Gonçalves Izzo (Betta), pois participaram ativamente do projeto e estavam sempre prontos e dispostos a trabalhar quando solicitados, independente de dia, data e hora. Agradeço de verdade!

A Muriel Pimentel em especial, pois foi meu braço direito e esquerdo durante toda essa jornada. Além de amiga, mãe, irmã e psicóloga em muitos momentos. A gente se estressa, mas a gente se entende!

Aos professores José Domingues Fontenele Neto e Moacir Franco de Oliveira, por terem fornecido o laboratório de histologia para realização de uma parte do meu experimento. E a Ferdinando Vinícius Fernandes Bezerra, por fornecer seu tempo me auxiliando com processamento histológico. Obrigada!

A meu amigo e companheiro Parmênedes Dias de Brito, por sua calma e paciência durante essa fase conturbada que é o mestrado e principalmente durante a redação da dissertação e também por fazer a estatística necessária para finalização desse trabalho. Obrigada!

A todos os que de alguma forma, por mais simples que seja, contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada de coração! Que Deus os abençoe!

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

XENOTRANSPLANTE OVARIANO DE GATAS DOMÉSTICAS EM CAMUNDONGAS C57BL/6 SCID E SUA RESPOSTA À GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA, SANTOS, Fernanda Araujo dos. Xenotransplante ovariano de gatas domésticas em camundongas C57BL/6 SCID e sua resposta a gonadotrofina coriônica equina, 2015. 53f. 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 – Xenotransplante ovariano é uma técnica reprodutiva auxiliar que permite a conservação do germoplasma de espécies de alto valor zootécnico ou em perigo de extinção. O uso de gonadotrofinas exógenas auxilia no desenvolvimento desses tecidos xenotransplantados e na obtenção de folículos viáveis para produção *in vitro* de embriões (PIVE), entretanto esse uso não foi relatado em xenotransplante de ovários de gatas com fêmeas C57BL/6 SCID como receptora. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta do xenotransplante ovariano de gata doméstica à gonadotrofina coriônica equina (eCG) quando transplantados em fêmeas C57BL/6 SCID. Para tanto, fragmentos de córtex ovariano de gatas domésticas foram transplantados sob a cápsula renal de quinze camundongas C57BL/6 SCID após ovariectomia bilateral. Ao final de 45 dias, as fêmeas foram divididas em dois grupos e aquelas que não receberam indução hormonal (eCG –) foram eutanasiadas no momento da indução. As fêmeas que receberam indução hormonal (eCG +) foram eutanasiadas 48h após. Todos os tecidos colhidos foram levados para processamento histológico. As proporções entre os diferentes folículos ovarianos foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. A análise morfométrica dos folículos foi comparada entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (folículos primordial, primário e secundário) e Kruskal-Wallis (folículo antral). Macroscopicamente foi possível observar um baixo número (16%) de folículos antrais com mais de 1mm nos transplantes tratados com eCG. Na análise microscópica, folículos de todas as categorias foram observados nos transplantes e todos apresentaram morfologia e morfometria normais para a espécie estudada (*Felis catus*), sendo, porém observado folículos primordiais e primários maiores naqueles transplantes eCG +. Houve uma redução nas porcentagens de folículos primordiais e aumento nas categorias subsequentes, principalmente nas de folículos antrais do grupo eCG +, sendo essa condição caracterizada como *Follicular Right Shift* (FRS). Folículos luteinizados também foram observados nos transplantes tratados com eCG. Dessa maneira, conclui-se que o tratamento com eCG foi eficaz em se tratando de desenvolvimento folicular, mas não apresentou boa resposta superovulatória.

Palavras-Chave: xenotransplante, camundonga, eCG, gata, ovário.

XENOGRAFTING OF QUEENS OVARIAN TISSUE INTO C57BL/6 FEMALE SCID MICE AND ITS RESPONSES TO EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN,

SANTOS, Fernanda Araujo dos. Xenografting of queens ovarian tissue into C57BL/6 female scid mice and its responses to equine chorionic gonadotropin, 2015. 53f. 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 – Ovarian xenografting is an auxiliary reproductive technique that allows the conservation of germplasm of high value livestock or endangered species. The use of exogenous gonadotropins assists in developing these xenografted tissues and obtaining viable follicles for *in vitro* embryo production (IVEP), however this use has not been reported in xenograftings of cats ovaries with C57BL/6 SCID female mice as recipients. Thus, the aim of this study was to evaluate the response of xenografting of domestic cat ovaries to equine chorionic gonadotropin (eCG) when grafted into C57BL/6 SCID female mice. Therefore, domestic cats ovarian cortex fragments were grafted under the kidney capsule of fifteen C57BL/6 SCID mice after bilateral ovariectomy. At the end of 45 days, the female mice were divided into two groups and those who did not receive hormone induction (eCG –) were euthanized at the time of induction. Females who received hormonal induction (eCG +) were euthanized after 48 hours. All collected tissues were taken for histologic processing. The proportions between the different ovarian follicles were compared by the chi-square test. The morphometric analysis of the follicles were compared between the experimental groups by the Tukey test (primordial follicles, primary and secondary) and Kruskal-Wallis (antral follicles). Macroscopically, it was possible to observe a low number (16%) of antral follicles with more than 1mm in transplants treated with eCG. In the microscopic analysis, follicles from all categories were observed in transplants and all had normal morphology and morphometry for the studied species (*Felis catus*), being however observed larger primordial and primary follicles in those eCG + transplants. There was a decrease in primordial follicles percentages and an increase in subsequent categories, mainly in antral follicles of eCG + group, and this condition is proposed here characterized as *Follicular Right Shift* (FRS). Luteinized follicles were also observed in transplants treated with eCG. Thus, it is concluded that the treatment with eCG is effective when it comes to follicular development, but it did not show a good superovulatory response.

Keywords: xenografting, female mice, eCG, queen, ovary.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de distribuição dos ovários doadores.....	29
Figura 2 – Fragmento de córtex ovariano e oócito de gata colhido após a realização do xenotransplante em camundonga C57BL/6 SCID do grupo eCG +. A: Seta indica o desenvolvimento ovariano sob a cápsula renal. B: Seta indica folículos antrais visualizados macroscopicamente. C: oócito de gata doméstica coletado em receptora do grupo eCG +, sem coloração, aumento de 40x, barra de escala: 100 μ m.....	35
Figura 3 – Figura 3 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas C57BL/6 SCID após xenotransplante. A: proestro – células epiteliais nucleadas; B: estro – células queratinizadas; C: metaestro – pouca quantidade de células epiteliais, de descamação e leucócitos; D: diestro – grande concentração de leucócitos e muco. Fonte: acervo pessoal. Barra de escala: 50 μ m. Aumento de 20x.....	37
Figura 4 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID. Folículo primordial (pp). Parênquima renal (R). HE, 40x. Barra de escala: 50 μ m.....	38
Figura 5 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID. Círculo pontilhado: presença de vasos sanguíneos próximos aos folículos. Setas apontam para hemácias. Ovário (O), Parênquima renal da receptora (R), Folículo primário (P). HE, 40x. Barra de escala: 50 μ m.....	39
Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID. A. Folículos primordiais (pp), HE, 40x; B. Folículo primário (P) HE, 40x; C. Folículo primordial (pp) e secundário (S) HE, 40x; D. Folículo antral (A) e parênquima renal da receptora (R), HE, 20x. Núcleo do oócito (no), oócito (*), formação inicial de cavidade antral (a). Barra de escala: 50 μ m.....	40
Figura 7 – Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos normais em função dos grupos. Controle: Fragmento controle; eCG – : Transplantes que não receberam indução hormonal; eCG + : Transplantes que receberam indução hormonal (eCG). * Foi observada diferença estatística nas categorias de folículos primordiais e antrais entre os grupos comparados. Nas demais categorias foliculares não houve diferença (Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão (horas) das diferentes fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.....	37
Tabela 2 – Média $\pm$ desvio padrão dos diâmetros (μm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos em função dos diferentes grupos.....	41
Tabela 3 – Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos atresicos em função dos grupos.....	42
Tabela 4 – Valores plasmáticos da função renal e hepática dos diferentes grupos experimentais.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometros
A	Folículo Antral
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Corpo Lúteo
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CR	Creatinina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
eCG –	Animais Transplantados Não Tratados Com eCG
eCG +	Animais Transplantados Tratados Com eCG
F	Possível Folículo
FAL	Fosfatase Alcalina
FC	Fragmento Controle
FOPA	Folículos Pré-Antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FUSP	Fundação de Apoio da Universidade de São Paulo
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HE	Hematoxilina e Eosina
Kg	Quilogramas
LH	Hormônio Luteinizante
LTG-PIVE	Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros Cúbicos
O	Ovário
°C	Graus Célsius
P	Folículo Primário
p < 0,05	Probabilidade de erro menor que 5%
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> De Embriões
pp	Folículo Primordial
R	Parênquima Renal
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	Folículo Secundário
SCID	Síndrome da Imunodeficiência Severamente Combinada (Severe Combined Immunodeficiency)

TFG	Taxa de Filtração Glomerular
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UI	Unidades Internacionais
UR	Ureia
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

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 XENOTRANSPLANTES DE OVÁRIOS FELINOS.....	19
4.2 INDUÇÃO HORMONAL.....	20
4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO XENOTRANSPLANTE OVARIANO.....	21
4.3.1 Receptoras – Camundongas C57BL6 SCID.....	21
4.3.2 Doadoras – Gatas domésticas (<i>Felis catus</i>).....	22
4.4 FORMAS DE AVALIAÇÃO DO XENOTRANSPLANTE.....	23
4.4.1 Lavado vaginal.....	24
4.4.2 Histologia clássica.....	25
4.4.3 Bioquímica Renal e Hepática.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
5.1 SELEÇÃO DAS DOADORAS E PROCESSAMENTO DOS OVÁRIOS DESTINADOS AO TRANSPLANTE.....	28
5.2 ANIMAIS RECEPTORES E MANEJO EXPERIMENTAL.....	29
5.3 CIRURGIA.....	30
5.4 LAVADO VAGINAL.....	31
5.5 ESTÍMULO HORMONAL.....	31
5.6 COLHEITA DO MATERIAL E AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA.....	32
5.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	32
5.8 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO TECIDO OVARIANO.....	33
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA.....	35
6.2 LAVADO VAGINAL.....	36
6.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	38
6.4 INDUÇÃO HORMONAL.....	43
6.5 AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA.....	44
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O gato doméstico (*Felis catus*) é um modelo importante para a pesquisa em felinos que estão em risco de extinção, assim como para o estudo de disfunções genéticas, doenças infecciosas, infertilidade em seres humanos (PUKAZHENTHI et al., 2000) e da dinâmica folicular (BRISTOL; WOODRUFF, 2004). Ele é o único entre as 37 espécies de felinos que existem na natureza que não está sofrendo algum tipo de ameaça ou risco de extinção (IUCN, 2015). Dentre as ameaças existentes a estas espécies, uma das que mais contribui com a morte de felinos silvestres é a construção de rodovias em áreas de proteção ambiental e sua influência na destruição do *habitat* natural (ROEDENBECK, 2007). Estas situações acidentais e o não aproveitamento das gônadas para pesquisas causam prejuízos ambientais e científicos incalculáveis.

Na tentativa de conservação desse germoplasma e evitar a extinção total das espécies, técnicas de reprodução animal assistida podem ser aplicadas. Dentre elas pode-se destacar a inseminação artificial, fertilização *in vitro*, transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões, bem como, o xenotransplante de tecidos gonadais (HOSSEINI et al., 2014; LERMEN et al., 2009).

O xenotransplante ovariano foi descrito na década de 70 (KROHN, 1977) e consiste no cultivo de tecido ovariano em outra espécie receptora. Essa técnica associada ao uso de animais imunodeficientes, possibilita o desenvolvimento de folículos pré-antrais até um estágio em que possam ser maturados e posteriormente encaminhados para realização de fertilização *in vitro* (HOSSEINI et al., 2014).

A utilização de protocolos hormonais é importante para várias biotécnicas reprodutivas, pois permite a obtenção de folículos com oócitos viáveis para produção *in vitro* ou *in vivo* de embriões. Dentre os hormônios exógenos utilizados, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) apresenta atividade dual semelhante ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), pois possui a capacidade de se ligar aos receptores desses hormônios nos folículos e no corpo lúteo (BARRET et al., 2004). Devido sua ação dual e meia vida longa, tem sido utilizada em protocolos para superovulação em felinos (VILLAVEVERDE, 2005).

Em relação ao transplante ovariano de gatas domésticas, foram realizados estudos com autotransplante (CRESTANA et al., 2006; LEONEL, 2013) e de xenotransplantes utilizando diferentes receptores e protocolos de indução hormonal. Em 1994, Gosden et al. utilizaram camundongas SCID como receptoras e nenhuma adição de protocolo hormonal.

Posteriormente, Bosch et al. (2004) utilizaram camundongos machos NOD SCID aplicando uma associação de eCG e hCG (gonadotrofina coriônica humana) e Fassbender et al. (2007) realizaram transplantes em ratas NUDE utilizando eCG e pFSH (FSH suíno) em seu protocolo hormonal. Com essas metodologias, foram obtidos diferentes resultados em relação ao efeito dos hormônios utilizados.

Considerando os poucos relatos, uma importante lacuna deve ser preenchida no tocante à resposta de camundongas imunodeficientes SCID ao uso do eCG, neste sentido, o presente estudo visa avaliar o desenvolvimento de tecidos ovarianos xenotransplantados de felinos domésticos para cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID e sua resposta ao eCG.

2. HIPÓTESES

a) O xenotransplante do tecido ovariano felino sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes da linhagem C57BL/6 SCID permitirá o desenvolvimento do tecido doador;

b) Uso de eCG trará resultados positivos, incluindo melhor desenvolvimento de folículos pré-antrais, maior proporção de folículos antrais e grande número de folículos viáveis a produção *in vitro* de embriões.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento de tecidos ovarianos xenotransplantados de felinos domésticos para cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID e o efeito do protocolo hormonal utilizando gonadotrofina coriônica equina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Inferir sobre o desenvolvimento do tecido transplantado por citologia vaginal;
- b) Quantificar e observar histologicamente a interação entre tecidos doador e receptor;
- c) Comparar a proporção e morfometria folicular entre os grupos preconizados;
- d) Estudar a função renal e hepática das receptoras através da análise da bioquímica plasmática.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. XENOTRANSPLANTES DE OVÁRIOS FELINOS

Transplantar consiste em transferir o órgão ou tecido funcional de um indivíduo para outro ou para ele mesmo. Os transplantes são classificados, de acordo com a espécie receptora, como: auto (transplante no mesmo indivíduo), iso (transplante em indivíduos geneticamente idênticos), alo (transplante para outro indivíduo da mesma espécie) ou xenotransplante (transplante entre espécies diferentes); e, segundo suas localizações, são classificados em ortotópico ou heterotópico, sendo próximos ou distantes da localização anatômica original, respectivamente (KROHN, 1977).

O transplante de tecido ovariano possui algumas indicações, entre as quais estão a restauração da fertilidade de mulheres e crianças que passaram por perda de função dos ovários resultante de tratamentos quimioterápicos contra o câncer (DEMEESTERE et al., 2009) e preservação da diversidade genética tão necessária à conservação de animais ameaçados de extinção (DEMIRCI et al., 2003).

O conceito de xenotransplante ovariano remonta do final do século XIX e foi inicialmente aceito com reservas pela comunidade científica da época em função do desconhecimento das bases imunológicas necessárias para os transplantes entre espécies (CUPERSCHMID; CAMPOS, 2007) e de animais apropriados para tal finalidade. Com o advento das linhagens geneticamente modificadas e uso de animais imunodeficientes, surgiu uma nova possibilidade de obtenção de folículos com oócitos de tamanho apropriado para posterior maturação *in vitro* (AUBARD, 2003) fazendo com que o xenotransplante se tornasse um dos caminhos possíveis para a produção *in vitro* de embriões (PIVE).

O xenotransplante promove ainda a possibilidade de serem cultivados, em outra espécie receptora, folículos ovarianos provenientes de fêmeas de alto mérito zootécnico com infertilidade adquirida ou após sua morte, podendo também ser empregado na conservação de germoplasma em espécies silvestres e raças de animais domésticos em vias de extinção, com ou sem morte acidental (DEMIRCI et al., 2003). Os principais resultados com esta técnica em animais silvestres foram apresentados em saguis (CANDY et al., 1995), elefantes (GUNASENA et al., 1998), marsupiais (WOLVEKAMP et al., 2001) e leoa (WIEDEMANN et al., 2012) com crescimento de folículos pré-antrais (FOPA) até o estágio antral.

O número de estudos com xenotransplante de tecido ovariano de origem felina é muito reduzido e são restritos ao Reino Unido, Berlim, Estados Unidos e Copenhague. Gosden et al.

(1994) observaram, ao transplantar fragmentos frescos de córtex ovariano de gatas domésticas sob a cápsula renal de camundongas SCID, desenvolvimento de folículos ovarianos até o estágio antral. Resultados semelhantes foram obtidos por Bosch et al. (2004) que utilizaram camundongos NOD SCID como hospedeiros e criopreservaram os fragmentos antes de transplantar e Fassbender et al. (2007) que tiveram ratas NUDE como hospedeiras e fizeram acompanhamento ultrassonográfico para observar o desenvolvimento dos fragmentos e decidir qual o melhor momento de retirada dos mesmos. Além disso, ambos os autores utilizaram protocolo hormonal.

Em relação a felinos selvagens, realizou-se xenotransplante de fragmentos ovarianos de leoa no subcutâneo da região dorsal de uma camundonga NUDE. Após criopreservação dos fragmentos realizada antes do xenotransplante e sob ausência de protocolo hormonal observou-se a sobrevivência e crescimento dos folículos ovarianos, indicando que o xenotransplante é uma técnica de reprodução assistida indicada para conservação de gametas de felídeos (WIEDEMANN et al., 2012).

As metodologias utilizadas diferem entre os trabalhos, seja em relação à receptora utilizada, à realização ou não de indução hormonal ou mesmo à espécie felina estudada, dessa maneira, são necessários mais estudos para fechar as lacunas a respeito dessa técnica para felinos e obter melhores resultados, incluindo embriões.

4.2. INDUÇÃO HORMONAL

Indução hormonal é um passo importante utilizado em várias biotécnicas reprodutivas com o intuito de obter folículos viáveis para produção *in vitro* ou *in vivo* de embriões. No xenotransplante ovariano não seria diferente. Há vários estudos que demonstram desenvolvimento de córtex ovariano com obtenção de folículos antrais sem estimulação hormonal (CANDY et al., 1995; GOSDEN et al., 1994; GUNASENA et al., 1988; WOLVEKAMP et al., 2001), mas já foi constatado que o uso de gonadotrofinas exógenas traz resultados positivos pra essa técnica (MALTARIS et al., 2006; YANG et al., 2006), dependendo apenas do estabelecimento do melhor protocolo a ser utilizado.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é produzida por fêmeas equinas entre os dias 40 e 120 da gestação (ALLEN; MOOR, 1972). Possui uma meia-vida longa de até 3 dias e tem a capacidade de se ligar aos receptores de hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) dos folículos e aos receptores de LH no corpo lúteo, apresentando então atividade semelhante à do hormônio folículo estimulante (80%) e hormônio luteinizante

(20%) (BARRET et al., 2004). Devido sua ação dual e meia vida longa, o eCG pode ser utilizado em dose única em protocolos para superovulação em felinos (VILLAYERDE, 2005).

A administração de 100 UI de eCG seguido de 50 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) em gatas no anestro produz bons resultados comparados até a reprodução natural, contudo, administração diária de eCG resulta em gestações malsucedidas e menor taxa de sobrevivência dos filhotes ao desmame (CLINE et al., 1980). Altas dosagens dessa gonadotrofina são prejudiciais aos ovários felinos, causando hiperestimulação ovariana e produção de folículos císticos com alteração do perfil hormonal (CLINE et al., 1980; COLBY, 1970; WILDT et al., 1978). Em contrapartida, quando utilizada nas doses adequadas, as gatas apresentam características funcionais da fase lútea bem próximas ao fisiológico para esta espécie, principalmente se tratando dos níveis hormonais séricos (POPE, 2000).

A utilização de gonadotrofinas exógenas em tecido ovariano de gata xenotransplantado tem por objetivo auxiliar no desenvolvimento dos folículos ovarianos e aumentar a taxa de recuperação de folículos antrais, porém, os resultados obtidos com o uso do eCG ainda são conflituosos, pois a dose adequada para tal fim ainda não foi estipulada, não se sabe ao certo como o tecido transplantado responde a gonadotrofina exógena (BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007) bem como se a indução hormonal deve está relacionada com a doadora ou a receptora do tecido xenotransplantado. Dessa maneira, mais estudos devem ser realizados para dirimir tais dúvidas.

4.3. ANIMAIS UTILIZADOS NO XENOTRANSPLANTE OVARIANO

4.3.1. Receptoras – Camundongos C57BL/6 SCID

O camundongo pertence à classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus* e tem acompanhado o homem há milênios, sendo descrito até em citações bíblicas (CHORILLI et al., 2007). São animais de pequeno porte, fácil manuseio, prolíferos, de período gestacional curto (em torno de 21 dias) e com características genéticas bem definidas, desse modo são muito utilizados como modelos experimentais (SANTOS, 2002).

Com o advento de novas pesquisas, principalmente relacionadas a transplantes e cânceres, um modelo animal imunodeficiente foi requisitado, surgindo então os roedores com

essa característica. Esses animais permitem a realização de xenotransplantes, pois reduzem consideravelmente as chances de rejeição dos tecidos e estão sendo utilizados largamente em experimentos com xenotransplante de gônadas. Dentre as espécies, ratas NUDE e camundongos NUDE e SCID têm sido bastante utilizados para realização de xenotransplante ovariano (AERTS et al., 2010; BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007; WIEDEMANN et al., 2012).

Camundongos C57BL/6 SCID (do inglês *Severe Combined Imunno Deficiency*) possuem um gene autossômico mutante no cromossomo 16 que induz a formação de células precursoras do sistema linfóide defeituosas. Como resultado, eles apresentam uma imunodeficiência severamente combinada, com baixos níveis ou ausência de imunoglobulinas do tipo IgA, IgM ou IgG, redução do tamanho dos órgãos linfóides em até 10 vezes, ausência de linfócitos T e B e as células esplênicas não conseguem produzi-los; dessa maneira, raramente rejeitam transplantes. Sua mutação aconteceu a partir da linhagem CB-17 (ANDRADE et al., 2002; BOSMA et al., 1983; FULOP; PHILLIPS, 1990).

Esses animais podem sobreviver por 1 ano ou mais se forem mantidos em condições *germfree*, que se resume em mantê-los em ambientes totalmente estéreis, desde a gaiola até alimentação e água. Para reproduzi-los, são utilizados machos scid/scid x fêmeas scid/scid, sendo obtidas ninhadas com todos os animais imunodeficientes (ANDRADE et al., 2002).

4.3.2. Doadoras – Gatas domésticas (*Felis catus*)

Biotécnicas reprodutivas são uma importante ferramenta para a preservação das espécies felinas, principalmente, para a criação de um banco de germoplasma, que visa o armazenamento de materiais biológicos e envolve a congelação de gametas e embriões (LEONEL, 2014). Nesse contexto, o gato doméstico torna-se um importante modelo experimental para todas as 37 espécies de felinos selvagens ameaçadas de extinção (IUNC, 2015). Fatores como problemas comportamentais, físicos, de distância entre os reprodutores e destruição do *habitat* natural tem induzido a maior procura por biotécnicas reprodutivas nessas espécies. As gatas domésticas apresentam características peculiares em sua fisiologia reprodutiva, que devem ser compreendidas antes da aplicação de biotécnicas como inseminação artificial, transferência de embrião, fertilização *in vitro*, xenotransplante ovariano, entre outras, nas espécies de felinos em ameaça de extinção.

A gata é classificada como poliéstrica sazonal, fotoperiódica positiva, já que desenvolve vários ciclos estrais por ano nos períodos de primavera e verão, reduzindo a

quantidade durante o outono e inverno, em regiões de clima temperado. Entretanto, são poliétricas contínuas em regiões tropicais, onde não há definição das estações do ano e, conseqüentemente, a quantidade de horas de luz por dia não se altera entre as estações. Além do fator circadiano, o ciclo estral felino também pode ser influenciado pelo ambiente social do indivíduo (MICHEL, 1993).

Nos animais fotoperiódicos, a incidência luminosa nos fotorreceptores da retina gera impulsos que são enviados à glândula pineal que posteriormente converte essas informações neurais recebidas em liberação de melatonina (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A secreção de melatonina é inversamente proporcional à incidência de luz. Nos felinos, a melatonina é um hormônio anti-gonadotrófico. Desta maneira, em períodos com alto número de horas luz por dia, haverá baixas concentrações séricas de melatonina, induzindo a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Este induz a secreção cíclica de hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise (MIALOT, 1988). O FSH é responsável pelo crescimento folicular final. Quando um ou mais folículos ovarianos encontram-se em crescimento final, ocorre uma secreção profusa de estradiol que causa modificações no comportamento reprodutivo das gatas, que a partir daí vão manifestar sinais de estro. Essa elevação do estradiol é importante para sensibilizar o eixo hipotálamo-hipófise para o pico de LH induzido pelo coito (FARSTAD, 2000). Após a ovulação, as concentrações de estradiol retornam aos níveis basais dentro de 5 dias.

Não se sabe ao certo até onde todas essas peculiaridades reprodutivas da gata (fotoperiódica positiva, ovulação induzida) vão influenciar no xenotransplante. São necessários mais estudos para elucidar todos os questionamentos.

4.4. FORMAS DE AVALIAÇÃO DO XENOTRANSPLANTE OVARIANO

Após a realização do cultivo de folículos, seja *in vivo* ou *in vitro*, é necessária uma avaliação para garantir que a técnica foi bem sucedida. Existem formas que avaliam o tecido transplantado em si, como por exemplo, avaliação histológica por microscopia óptica, eletrônica de transmissão ou por fluorescência, biologia molecular e imunohistoquímica; até as formas indiretas de avaliação, como ultrassonografia, citologia vaginal, avaliação hormonal (FASSBENDER et al., 2007; KIM et al., 2002; VAN EYCK et al., 2010) e bioquímica sérica renal e hepática que permitem avaliar as funções do tecido receptor bem como a saúde geral do animal. A seguir, serão abordadas apenas as técnicas empregadas nesse estudo.

4.4.1. Lavado vaginal

O sistema reprodutor feminino passa por alterações cíclicas periodicamente se manifestando de forma macro e microscópica (MENDONÇA et al., 2007). Essas alterações são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário (por meio de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos), a partir do momento em que o hipotálamo sintetiza GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que induz a produção e liberação de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) pela hipófise, que conseqüentemente vão agir nos folículos ovarianos induzindo a produção de hormônios, entre eles o estradiol (RICHARDS et al., 2002).

A determinação do ciclo estral é valiosa em pesquisas, pois informa o *status* hormonal em que a fêmea se encontra, reduzindo assim erros metodológicos e permitindo a obtenção de grupos mais homogêneos, caso seja o objetivo do experimento (VILELA et al., 2007). O lavado vaginal permite observar e caracterizar facilmente mudanças observadas durante esse ciclo estral (BYERS et al., 2012; VILELA et al., 2007).

O ciclo estral das camundongas é dividido em 4 fases: proestro, estro, metaestro e diestro, que se repetem a cada 4 ou 5 dias se não ocorrer gestação, pseudociese ou anestro (BYERS et al., 2012). O estrógeno produzido nos ovários pelos folículos é responsável por alterar os tipos celulares encontrados no canal vaginal, então, em cada fase do ciclo, serão encontrados tipos diferentes (NELSON et al., 1982). O proestro é caracterizado pela fase folicular e apresenta células nucleadas na avaliação citológica; no estro ocorre a ovulação e é possível observar células de descamação/queratinizadas no lavado vaginal. No metaestro se inicia a fase luteínica e há presença de todos os tipos celulares ditos anteriormente com acréscimo de leucócitos, sendo que todas as células se encontram em menores concentrações. No diestro, o tipo celular predominante é o leucócito, encontrado em grandes concentrações e associado a presença de muco (ANDRADE et al., 2002).

Logo após o transplante espera-se um anestro inicial nas fêmeas, caracterizado por baixas concentrações de leucócitos no lavado vaginal. Com o decorrer do tempo e a interação adequada dos fragmentos ovarianos transplantados com o sítio receptor, as fêmeas iniciarão um novo ciclo estral e será possível observar mudanças na celularidade dessas fêmeas a partir do lavado vaginal. A partir disso, informações importantes para o experimento serão obtidas, como por exemplo: tempo e taxa de retorno ao ciclo após o procedimento cirúrgico; presença ou ausência de ciclo estral completo, bem como, duração desse ciclo.

4.4.2. Histologia clássica

Histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos do corpo e a forma como eles se organizam para formar órgãos, bem como suas funções (GARTNER, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No xenotransplante ovariano, a histologia básica a partir da microscopia óptica permite avaliar a integridade dos tecidos (ovariano e renal), condição da vascularização, a qualidade dos folículos ovarianos e realizar classificação folicular e morfometria, possibilitando avaliar se a técnica foi bem sucedida.

O protocolo histológico que utiliza hematoxilina e eosina (HE) como coloração tem sido utilizado de forma rotineira para avaliação de tecido ovariano xenotransplantado, podendo ser aplicado para folículos inclusos no fragmento ovariano ou folículos isolados, com avaliações satisfatórias em ambos os casos (AERTS et al., 2010; BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007; WIEDEMANN et al., 2012).

A hematoxilina é uma base que cora em azul/lilás os componentes ácidos da célula, como por exemplo, o núcleo e as regiões do citoplasma ricas em ribossomos, pois possuem ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA). Já a eosina é um ácido que cora em rosa os componentes básicos das células, como por exemplo, o citoplasma das células (GARTNER, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Com essa coloração é possível então observar todos os componentes celulares do fragmento ovariano.

4.4.3. Bioquímica Renal e Hepática

A determinação dos parâmetros bioquímicos vem sendo bastante utilizada em Medicina Veterinária e fornece informações individuais ou de um conjunto de animais com relação ao estado clínico geral, balanço nutricional, situações deficitárias, monitorações de tratamentos, prognóstico (GONZÁLEZ et al., 2001) e alterações funcionais dos órgãos (ALMEIDA et al., 2008). Avaliando as funções hepática, pancreática, renal e cardíaca, são evidenciadas alterações dos equilíbrios hídrico, eletrolítico e mineral e também do metabolismo endócrino e atividade muscular (BERGONSO, 2007).

Na prática clínica os exames mais solicitados são de função hepática e renal (BERGONSO, 2007) e nesse projeto as avaliações não seriam diferentes, dessa maneira foram avaliados ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL) para investigar se o xenotransplante ovariano não causou dano ao rim (sítio receptor) ou fígado (local de metabolização).

Os exames laboratoriais que avaliam a função renal normalmente estimam a taxa de filtração glomerular (TFG) (SODRÉ et al., 2007), definida como o volume plasmático de uma substância que pode ser completamente filtrada pelos rins em uma determinada unidade de tempo (RENNÓ et al., 2000). A TFG é uma das mais importantes ferramentas na análise da função renal, sendo também um indicador do número de néfrons funcionais (SODRÉ et al., 2007).

A ureia é o principal metabólito nitrogenado proveniente da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretada pelos rins. O restante é eliminado pelo trato gastrointestinal e pela pele. Após a lise das proteínas em aminoácidos, a biossíntese da ureia ocorre em processo hepático intracelular, no qual o nitrogênio contido no aminoácido é convertido em ureia por um ciclo enzimático. Apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não ser reabsorvida nem secretada ativamente, a ureia é uma fraca referência da TFG. A principal utilidade clínica da ureia está na determinação em conjunto com a creatinina (SODRÉ et al., 2007).

A creatinina é um produto nitrogenado não-proteico, resultante do fosfato de creatinina, existente principalmente nos músculos (esquelético e cardíaco), e em menor quantidade no fígado e rins (RESTEL, 2012). Dessa maneira, a quantidade de creatinina produzida é dependente da massa muscular e não apresenta grandes variações diárias. A creatinina é filtrada livremente no glomérulo. Ao contrário da ureia, a creatinina é secretada em uma pequena parcela, mas o suficiente para estimar a TFG. Seu aumento ocorre em todas as doenças renais que causam redução na TFG. Para melhor avaliação da reversibilidade da lesão glomerular é necessário que faça um paralelo com a quantidade de ureia sérica (RESTEL, 2012; SODRÉ et al., 2007).

Para avaliação hepática, testes de enzimas séricas com ALT, AST e FAL podem ser realizados. O aumento dessas enzimas pode ser ocasionado por lesão celular extensa, proliferação celular, aumento na renovação celular, aumento na síntese enzimática ou obstrução de ductos; em todos os casos, a atividade fisiológica normal do órgão está alterada. A análise individual dessas enzimas não fornecerá informações consistentes para avaliação hepática, pois elas podem ser encontradas em diferentes tecidos no organismo, mas a análise simultânea pode indicar qual o provável local da lesão (MOTTA, 2000).

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída nos tecidos, principalmente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos) e placenta (BERGONSO, 2007). No fígado, está localizada na membrana celular que une a

borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares e seu aumento pode ser observado nos casos de obstrução intra-hepática (MOTTA, 2000).

As enzimas AST e ALT catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. Elas estão amplamente distribuídas nos tecidos. As atividades mais elevadas de AST encontram-se no miocárdio, fígado, músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos. A ALT é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética (SCHUMANN et al., 2002). Lesões ou destruição das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação. A ALT está presente no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST na mitocôndria. Em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da AST, elevando a relação entre essas enzimas. Esta diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas (MOTTA, 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 (UFERSA) sob os números de protocolo 23091.000971/2014-97 e 23091.003217/2014-17.

5.1. SELEÇÃO DAS DOADORAS E PROCESSAMENTO DOS OVÁRIOS DESTINADOS AO TRANSPLANTE

Foram coletados de cinco gatas domésticas sem padrão racial definido com idade entre 1 ano e 2,5 anos ovários sem patologias macroscópicas. As gatas fizeram parte de projetos de castração que ocorreram na UFERSA.

A colheita ocorreu imediatamente após a ovariossalpingohisterectomia. Os ovários foram lavados em solução fisiológica a 0,9%, inseridos em tubos cônicos estéreis (50 mL), identificados de acordo com a idade da doadora e transportados em solução fisiológica a 0,9% acrescida de antibiótico (100 µg/mL de penicilina). Dessa forma, os ovários foram transportados e mantidos a 37°C até o momento do procedimento cirúrgico (o tempo entre o transporte e o procedimento cirúrgico não ultrapassou 4h).

No momento do procedimento cirúrgico, o tecido ovariano foi dissecado para retirada de folículos visíveis e corpo lúteo. Posteriormente, o tecido cortical ovariano esquerdo foi delicadamente manipulado com auxílio de pinças e lâminas de bisturi, obtendo-se no mínimo 20 fragmentos de aproximadamente 1 mm³ selecionados sob estereomicroscópio. Em seguida, foram acondicionados em 2 mL de meio TALP-HEPES até o momento do transplante.

Os ovários direitos e fragmentos dos ovários esquerdos foram submetidos à processamento histológico de rotina (Figura 1).

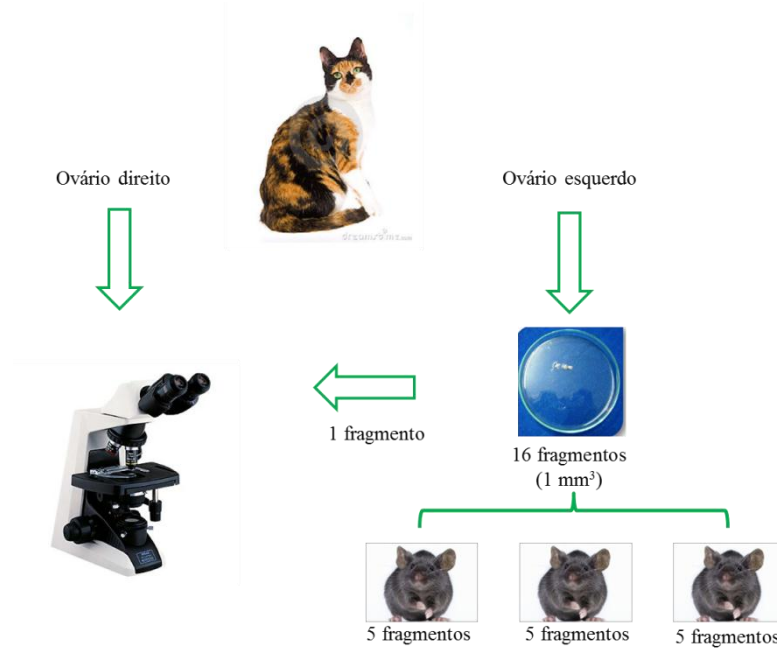


Figura 1 – Esquema de distribuição dos ovários doadores.

5.2. ANIMAIS RECEPTORES E MANEJO EXPERIMENTAL

Trinta camundongas imunodeficientes da linhagem C57BL/6 SCID, em maturidade sexual (60 dias de idade) foram utilizadas no experimento, sendo 15 fêmeas para o grupo controle (citologia vaginal) e 15 fêmeas para os grupos transplantados. Todas as fêmeas foram submetidas à lavado vaginal prévio ao início do experimento para comprovar que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal estava responsivo. Aquelas que não apresentaram essa responsividade foram trocadas por animais que a apresentaram.

Todas as camundongas foram obtidas após cruzamentos realizados no Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões (LTG-PIVE). As matrizes utilizadas para a replicação da colônia foram provenientes do Biotério da Fundação de Apoio da Universidade de São Paulo – FUSP.

Todos os animais foram mantidos em estantes com mini-isoladores de pressão positiva a 22°C com fotoperíodo de 14:10 (luz:escuridão), alimentados *ad libitum* com ração autoclavável, água filtrada e sementes de girassol, sendo todos os itens autoclavados 24h antes da oferta aos mesmos. Também foram autoclavados semanal e individualmente, os mini-isoladores, contendo a maravalha e os bebedouros. Os procedimentos de manutenção (troca do mini-isolador, alimento, girassol e água) e manejo geral dos animais foram realizados semanalmente em fluxo laminar. Adicionalmente, os animais foram inspecionados

diariamente quanto a possíveis alterações de comportamento ou sanidade. Todos os outros procedimentos realizados que necessitavam de manipulação direta dos animais também foram realizados no fluxo laminar.

5.3. CIRURGIA

Todas as camundongas que seriam submetidas aos procedimentos cirúrgicos foram individualmente pesadas para o cálculo da dose anestésica. O protocolo anestésico utilizado foi 2,2,2-tribromoetanol a 2,5%, na dose de 18 ml/kg, administrados intraperitonealmente. A dose anestésica foi ajustada individualmente durante o procedimento cirúrgico para manutenção do plano anestésico desejado. Não foi realizado jejum hídrico e nem alimentar nas fêmeas, pois os camundongos apresentam altas taxas metabólicas e o jejum poderia acarretar numa hipoglicemia grave e levar o animal a óbito (ARAÚJO, 2010). O jejum só se faz necessário em um procedimento no trato gastrointestinal, sendo assim, deve-se realizar no tempo máximo de 6-8 horas (ANDRADE, 2002).

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 tricotomia bilateral prévia e posteriormente a antisepsia dos campos cirúrgicos com solução alcoólica de iodo a 2%, seguida pela colocação de panos de campo estéreis.

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 antúmeros 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 cirúrgico, 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.

5.4. LAVADO VAGINAL

Transcorridos cinco dias do procedimento cirúrgico, foi realizado lavado vaginal nas fêmeas transplantadas para avaliação do ciclo estral a cada 12 horas, durante 40 dias. Para tanto, o animais foram devidamente contidos e com uma micropipeta de 20 µl acoplada com ponteiros de 10-100 µl e solução fisiológica a 0,9% realizou-se o procedimento. 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 Nelson et al. (1982) com camundongas e Byers et al. (2012) com ratas.

5.5. ESTÍMULO HORMONAL

As fêmeas receptoras foram divididas em 2 grupos experimentais de acordo com a realização ou não de estímulo hormonal, em que:

- Grupo 1: eCG – (n = 5), animais que não receberam tratamento hormonal;
- Grupo 2: eCG + (n = 10), animais que receberam 10 UI de eCG*;

Quarenta e cinco dias após o procedimento cirúrgico, o transplante foi retirado das receptoras do grupo 1 e procedeu-se com a aplicação de eCG nas fêmeas do grupo 2. Quarenta e oito horas após aplicação, foi realizada a retirada dos transplantes das receptoras do grupo 2.

* eCG: Novormon®

5.6. COLHEITA DO MATERIAL E 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) juntamente com a colheita do material transplantado. 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. Posteriormente, os transplantes foram colhidos e então encaminhados para processamento histológico.

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 plasma. Todas as análises bioquímicas foram validadas e realizadas no Laboratório do Hospital Veterinário Dix Sept Rosado – UFRSA, 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, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina, sendo utilizados kits comerciais.

5.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os ovários direitos e fragmentos dos ovários esquerdos das doadoras serviram como controle, sendo remetidos para processamento histológico de rotina logo após sua obtenção.

Os tecidos colhidos após 45 e 47 dias do início do experimento foram fixados em solução Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) durante 8h e, posteriormente, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina e seccionados de forma semi-seriada à espessura de 5 µm, sendo uma sessão montada em lâmina histológica a cada 50 µm. Os cortes foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE).

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, presença de vascularização. Adicionalmente, realizou-se classificação folicular tanto nos ovários e fragmentos ovarianos 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 Bosch et al. (2004). Os folículos pré-antrais (FOPA) foram assim divididos: primordiais – oócito circundado por uma única camada 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 – aqueles com uma, ou mais, pequenas áreas de fluido folicular (antro). Os folículos atresícos 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 oócito, bem como, irregularidades na membrana basal (MACEDO, 2007).

A análise morfométrica foi realizada nos folículos ovarianos classificados em normais com auxílio do programa de computador Image J® 1,49v. Os diâmetros do núcleo do oócito, oócito e folículo foram mensurados, sendo realizadas duas medições em cada estrutura para obtenção da média. Foram aferidas 10 unidades dos folículos primordiais, primário, secundário e antrais de cada grupo experimental, obtendo-se a média dos tamanhos dos núcleos dos oócitos, oócitos e folículos (μm).

Não foram contabilizados folículos pré-ovulatórios devido à aspiração prévia realizada antes da fixação dos tecidos.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados relativos ao procedimento cirúrgico, morfologia da cápsula renal e tecido transplantado foram expressos descritivamente. As proporções entre os diferentes folículos ovarianos (normais e atresícos) foram comparados pelo teste de qui-quadrado. Os diâmetros nuclear, oocitário e folicular foram comparados entre os grupos experimentais pelo teste de Tukey (folículos primordial, primário e secundário) e Kruskal-Wallis (folículo antral). As fases do ciclo estral foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados da bioquímica sérica renal e hepática foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todas as comparações

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

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA

A técnica cirúrgica utilizada pra realização do xenotransplante consistiu em ovariectomia bilateral, exposição do rim esquerdo, inserção dos fragmentos sob a cápsula renal, diérese e sutura dos planos cirúrgicos. O tempo médio de cirurgia foi de 18 minutos e 35 segundos ($18'35'' \pm 4'29''$), permitindo que todos os procedimentos fossem realizados minuciosamente. Todos os animais tiveram completa recuperação e cicatrização da ferida cirúrgica quatro dias após o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o experimento.

O sítio receptor escolhido para realização desse experimento foi o rim, por fornecer bom suporte vascular para o transplante (CHRISTIE; BJORLING, 1998) e por ser o sítio de eleição quando se pensa em sucesso no xenotransplante ovariano (BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007; KANEKO et al., 2013).

Em todos os animais foram recuperados os tecidos transplantados. Desses, 12/15 (80%) apresentaram a existência de uma região parenquimatosa compatível macroscópica e morfológicamente com o tecido ovariano, confirmada após avaliação histológica. Macroscopicamente, observou-se um número de cinco folículos antrais acima de 1 mm em 2/12 (16%) dos transplantes viáveis, sendo esses pertencentes ao grupo eCG +. Estes folículos foram dissecados e então observou-se oócitos circundados por várias camadas de células do *cumulus* (Figura 2).

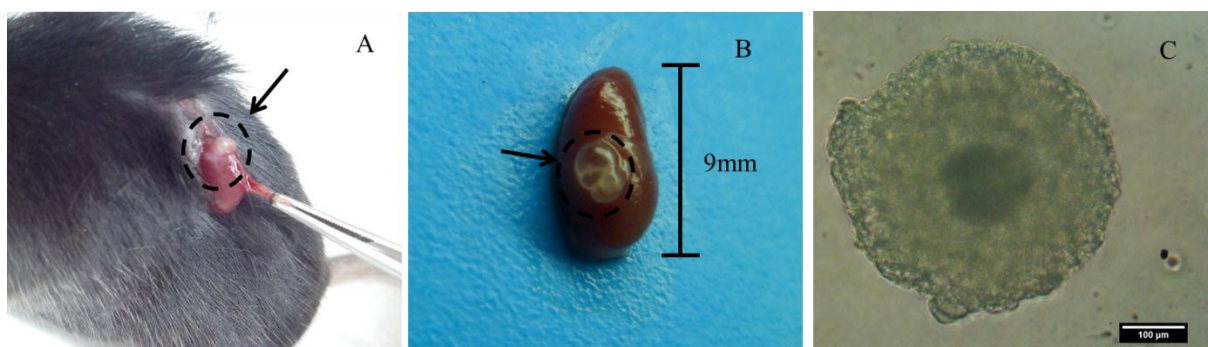


Figura 2 – Fragmento de córtex ovariano e oócito de gata colhido após a realização do xenotransplante em camundonga C57BL/6 SCID do grupo eCG +. A: Seta indica o desenvolvimento ovariano sob a cápsula renal. B: Seta indica folículos antrais visualizados macroscopicamente. C: oócito de gata doméstica coletado em receptora do grupo eCG +, sem coloração, aumento de 40x, barra de escala: 100 µm.

Bosch et al. (2004), Fassbender et al. (2007) e Gosden et al. (1994) também conseguiram observar presença de folículos antrais sob a cápsula renal após a realização de xenotransplante ovariano de gatas domésticas em receptoras imunodeficientes. A formação de folículos antrais é um pré-requisito para que ocorra a ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo, assim como para manter a fertilidade feminina (DRUMMOND, 2006), consequentemente, a presença desses folículos nos transplantes permite concluir que a técnica utilizada nesse trabalho não interferiu nas funções ovarianas básicas, ou seja, no desenvolvimento folicular e produção de estrógeno.

6.2. LAVADO VAGINAL

Todas as receptoras transplantadas e quinze fêmeas inteiras (que serviram como controle) foram submetidas ao lavado vaginal para descrição da duração das fases do ciclo estral e avaliação do retorno da atividade ovariana. A avaliação foi realizada a fresco, sem coloração e sob microscopia de luz em aumento de 20x para observação das características celulares, de acordo com o ciclo ovariano, tomando por base os estudos publicados por Nelson et al. (1982) com camundongas e Byers et al. (2012) com ratas. O lavado vaginal permite avaliar mudanças na ciclicidade das fêmeas, principalmente quando se almeja identificar as quatro fases do ciclo estral (BYERS et al., 2012) e tem sido utilizado como método auxiliar na avaliação de xenotransplante ovariano (GOSDEN et al., 1994; MALTARIS et al., 2006).

Após o transplante, o fragmento ovariano passa por um período de isquemia com posterior reperfusão dos tecidos. A partir desse momento, o tecido retorna às suas funções normais permitindo o desenvolvimento dos folículos e produção de hormônios (ISRAELY et al., 2006). Nesse trabalho, o tempo necessário para o retorno dessas funções, observado a partir do início de um novo ciclo estral, foi de $19,4 \pm 8,0$ dias após a realização do xenotransplante. Considerando o proestro como fase inicial do ciclo estral, 80% (12/15) fêmeas transplantadas retornaram a ciclicidade. Dessas fêmeas, 92% (11/12) apresentaram ciclo estral completo com todas as fases estrais. O ciclo estral durou em média $11,5 \pm 2,1$ dias, sendo o diestro a fase predominante, seguida do estro. Não houve mudanças significativas no ciclo estral das receptoras, pois apesar do tempo médio das fases de proestro, estro e diestro das fêmeas transplantadas ter se apresentado maior do que as respectivas fases das fêmeas do grupo controle, o diestro foi a única fase a apresentar diferença (Tabela 1).

Tabela 1 – Média e desvio padrão (horas) das diferentes fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Fases do ciclo estral			
	Proestro*	Estro*	Metaestro*	Diestro
Controle (n = 15)	28,8 ± 11,8	65,6 ± 34,8	8,8 ± 3,1	49,6 ± 14,2 ^b
Transplante (n = 15)	42,5 ± 29,0	103,6 ± 58,5	7,6 ± 2,8	124,4 ± 73,8 ^a

*Não houve diferença estatística entre os grupos comparados.

Mudanças nos padrões citológicos observadas no lavado vaginal refletem o *status* hormonal das fêmeas (NELSON et al., 1982). Essas mudanças estão sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovário por meio de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos. A produção de estradiol pelos folículos presentes nos ovários ocorre em resposta a mudanças nas concentrações de FSH e LH (RICHARDS et al., 2002). No proestro é caracterizado pela fase folicular e no lavado vaginal a presença de células epiteliais nucleadas; no estro ocorre a ovulação e é possível observar altas concentrações de células descamação/queratinizadas no lavado vaginal; no metaestro se inicia a fase lútea e há presença de células nucleadas, de descamação e leucócito no lavado vaginal, sendo todas em baixas concentrações; o diestro é caracterizado por baixos níveis de estradiol com presença de altas concentrações de leucócitos e muco (COOPER et al., 1993; LONG; EVANS, 1922; NELSON et al., 1982). Esse padrão foi observado nas fêmeas desse experimento (Figura 3) e demonstra que houve retorno da atividade ovariana, pois os fragmentos transplantados produziram estradiol suficiente para induzir mudanças na citologia vaginal.

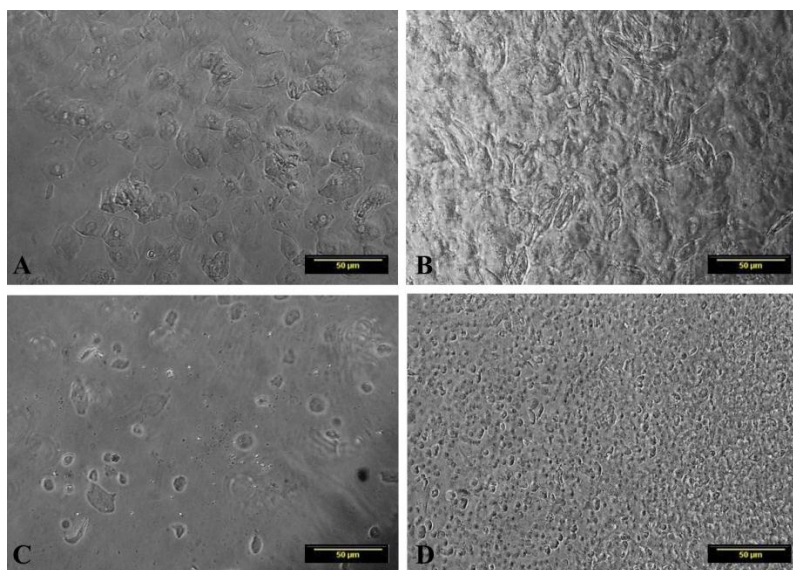


Figura 3 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas C57BL/6 SCID após xenotransplante. A: proestro – células epiteliais nucleadas; B: estro – células queratinizadas; C: metaestro – pouca quantidade de células epiteliais, de descamação e leucócitos; D: diestro – grande concentração de leucócitos e muco. Fonte: acervo pessoal. Barra de escala: 50 µm. Aumento de 20x.

6.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

Não foram observados danos no parênquima renal de nenhuma das receptoras. A interação entre os tecidos, receptor e transplantado, ocorreu de forma efetiva, podendo ser visualizada macroscopicamente (Figura 2) e certificada por meio de análise histopatológica (Figura 4) e de bioquímica sérica. Esses resultados demonstram que houve total recuperação do tecido após injúria causada pelo procedimento cirúrgico e que o transplante não altera a morfologia e a função do tecido receptor.

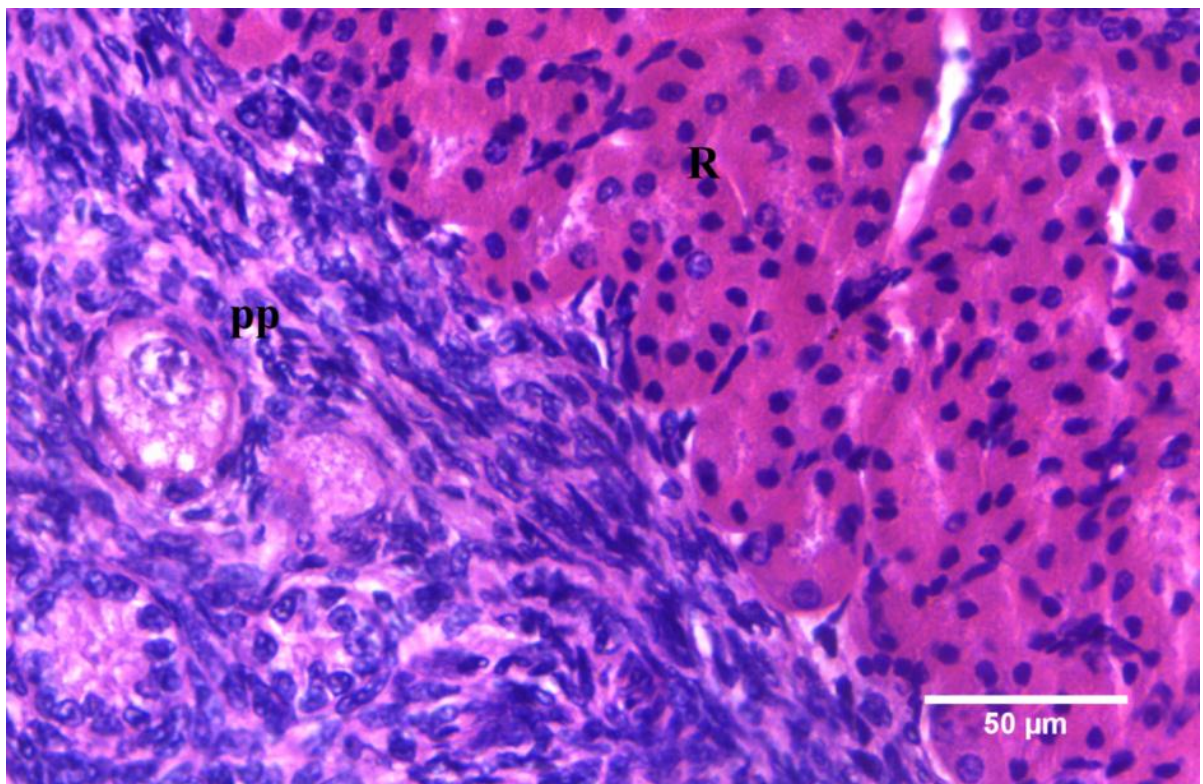


Figura 4 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID. Folículo primordial (**pp**). Parênquima renal (**R**). HE, 40x. Barra de escala: 50 µm.

O suprimento vascular oferecido pelo tecido renal ao córtex ovariano foi considerado morfológicamente semelhante àquele existente no ovário *in situ* de gata a partir de $19,4 \pm 8,0$ dias após a realização do transplante quando se observou a primeira fase do ciclo estral (proestro) nas fêmeas. Ocorreu neovascularização em 12/15 (80%) transplantes, a mesma taxa obtida no retorno da ciclicidade das fêmeas. Os vasos sanguíneos observados nos transplantes foram morfológicamente equivalentes aos presentes em ovários íntegros de gatas (Figura 5).

A presença de ciclicidade nas fêmeas transplantadas permite inferir que a revascularização dos fragmentos ovarianos após o procedimento cirúrgico foi eficiente, pois mudanças na ciclicidade das fêmeas só podem ocorrer a partir do momento que os estrogênios produzidos pelos folículos ovarianos consigam realizar *feedback* com o hipotálamo induzindo a liberação de gonadotrofinas (RICHARDS et al., 2002), para tanto, é necessário que essas substâncias atinjam a corrente sanguínea. É sabido que há presença de fatores angiogênicos (Fator de crescimento endotelial vascular – VEGF e angiopoietinas) no tecido ovariano que estimulam a rápida migração de células endoteliais e permitem o restabelecimento da circulação sanguínea (ISRAELY et al., 2006; NISOLLE et al., 2000).

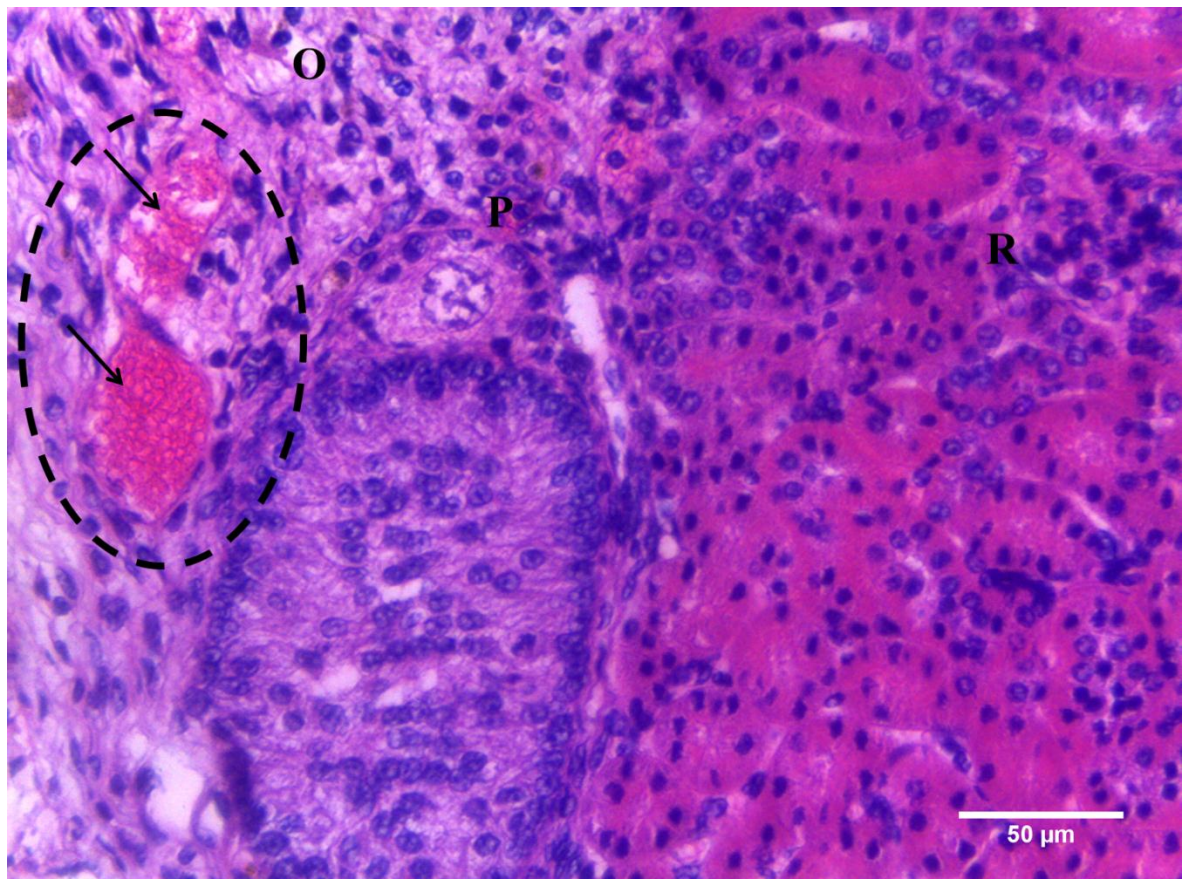


Figura 5 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongos C57BL/6 SCID. Círculo pontilhado: presença de vasos sanguíneos próximos aos folículos. Setas apontam para lúmen vascular repleto de hemácias. Ovário (O), Parênquima renal da receptora (R), Folículo primário (P). HE, 40x. Barra de escala: 50 µm.

Folículos luteinizados foram observados em 3/15 (20%) transplantes, sendo todos observados no grupo eCG +. Morfologicamente essas estruturas são caracterizadas por apresentarem um oócito imaturo circundado por células da granulosa luteinizadas. Eles podem surgir quando ocorre um pico de LH em um momento inoportuno, ocasionado

geralmente pelo uso de gonadotrofina coriônica equina (BOSCH et al., 2004). Essa situação também foi mencionada em protocolos de superovulação realizados após transplante em ovários de gatas (BOSCH et al., 2004; LEONEL, 2013).

Assim como nos outros estudos com ovários de gatas xenotransplantados (BOSCH et al., 2004; FASSBENDER et al., 2007; GOSDEN et al., 1994), foi observado em todos os grupos experimentais a presença de folículos pré-antrais (primordial, primário e secundário) (Figura 6.A, 6.B e 6.C) e folículos antrais (Figura 6.D), sem diferenças morfológicas com relação ao órgão *in situ*, demonstrando que o rim não restringiu o processo de desenvolvimento folicular, principalmente dos folículos antrais, que ocupam uma grande área do parênquima ovariano.

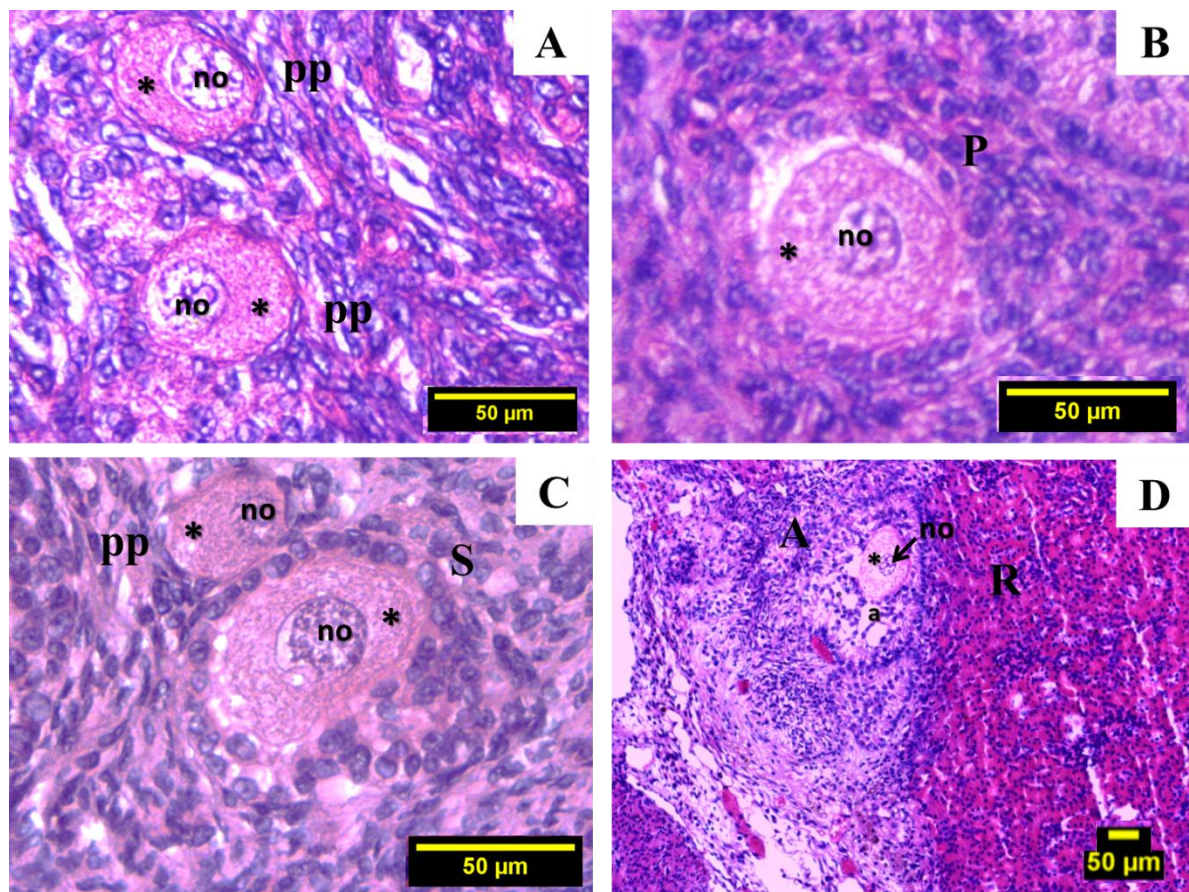


Figura 6 – Fotomicrografia de ovário de gata xenotransplantado sob a cápsula renal de camundongas C57BL/6 SCID. **A.** Folículos primordiais (pp), HE, 40x; **B.** Folículo primário (P) HE, 40x; **C.** Folículo primordial (pp) e secundário (S) HE, 40x; **D.** Folículo antral (A) e parênquima renal da receptora (R), HE, 20x. Núcleo do oócito (no), oócito (*), formação inicial de cavidade antral (a). Barra de escala: 50 µm.

A análise morfométrica dos folículos ovarianos é outra maneira de avaliar histologicamente se houve comprometimento do desenvolvimento folicular das gatas após a

realização do xenotransplante, pois demonstra se o crescimento dos mesmos foi semelhante ao que ocorre no ovário *in situ*. Os dados obtidos por essa técnica estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Média $\pm$ desvio padrão dos diâmetros (μm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos em função dos diferentes grupos.

Categoria folicular	Grupos experimentais	Diâmetro (μm)		
		Núcleo do oócito	Oócito	Folículo
Primordial	FC	$14,6 \pm 1,3^b$	$29,6 \pm 3,7^b$	$34,3 \pm 5,1^b$
	eCG –	$15,2 \pm 2,4^b$	$32,4 \pm 4,9^b$	$39,2 \pm 5,1^a$
	eCG +	$20,2 \pm 2,2^a$	$38,3 \pm 4,6^a$	$44,0 \pm 4,3^a$
Primário	FC	$15,8 \pm 2,7^b$	$33,8 \pm 4,1^b$	$45,7 \pm 6,6^b$
	eCG –	$19,1 \pm 4,1^b$	$44,6 \pm 5,7^a$	$59,8 \pm 6,2^a$
	eCG +	$22,1 \pm 2,8^a$	$46,4 \pm 10,2^a$	$63,6 \pm 15,0^a$
Secundário	FC	$20,2 \pm 3,6^a$	$55,3 \pm 10,2^a$	$107,1 \pm 15,4^a$
	eCG –	$21,4 \pm 6,3^a$	$59,4 \pm 8,7^a$	$105,6 \pm 35,0^a$
	eCG +	$25,6 \pm 5,6^a$	$63,5 \pm 11,4^a$	$124,8 \pm 32,0^a$
Antral	FC	$28,9 \pm 2,9^a$	$84,9 \pm 4,8^a$	$272,4 \pm 64,8^a$
	eCG –	$30,2 \pm 5,7^a$	$78,6 \pm 10,7^a$	$232,8 \pm 36,1^a$
	eCG +	$32,6 \pm 0,9^a$	$74,9 \pm 5,4^a$	$278,1 \pm 44,8^a$

FC: fragmento controle; eCG – : transplantes que não receberam indução hormonal; eCG + : transplantes que receberam indução hormonal (eCG). a, b: letras diferentes na mesma coluna de cada categoria folicular indicam valores significativamente diferentes, Teste de Tukey (folículo primordial, primário e secundário) e Kruskal-Wallis (folículo antral) ($p < 0,05$).

Todos os folículos avaliados apresentaram tamanho esperado para a espécie (*Felis catus*) (REYNAUD et al., 2009). Porém, foram observadas diferenças entre os grupos ($p < 0,05$) nas categorias iniciais dos folículos (primordial e primário) nos parâmetros avaliados (núcleo do oócito, oócito e folículo). Além disso, os diâmetros médios dos folículos existentes nos transplantes do grupo eCG + foram maiores do que dos grupos eCG – e grupo controle (FC). O eCG possui atividade dual semelhante ao FSH e LH, promovendo nos folículos pré-antrais aumento do diâmetro folicular e auxiliando na proliferação celular, diferenciação, produção de estrógeno e posterior maturação (BARRETT et al., 2004). Dessa maneira, o eCG administrado nos animais foi responsável pela diferença observada entre os folículos pré-antrais dos fragmentos do grupo eCG + e eCG – e pode ter induzido o desenvolvimento rumo aos estádios mais avançados.

Os dados obtidos a partir da contagem dos folículos normais (Figura 7) e atresícos (Tabela 3) encontrados nos fragmentos controle e transplantados foram convertidos em proporções de folículos em função dos grupos experimentais.

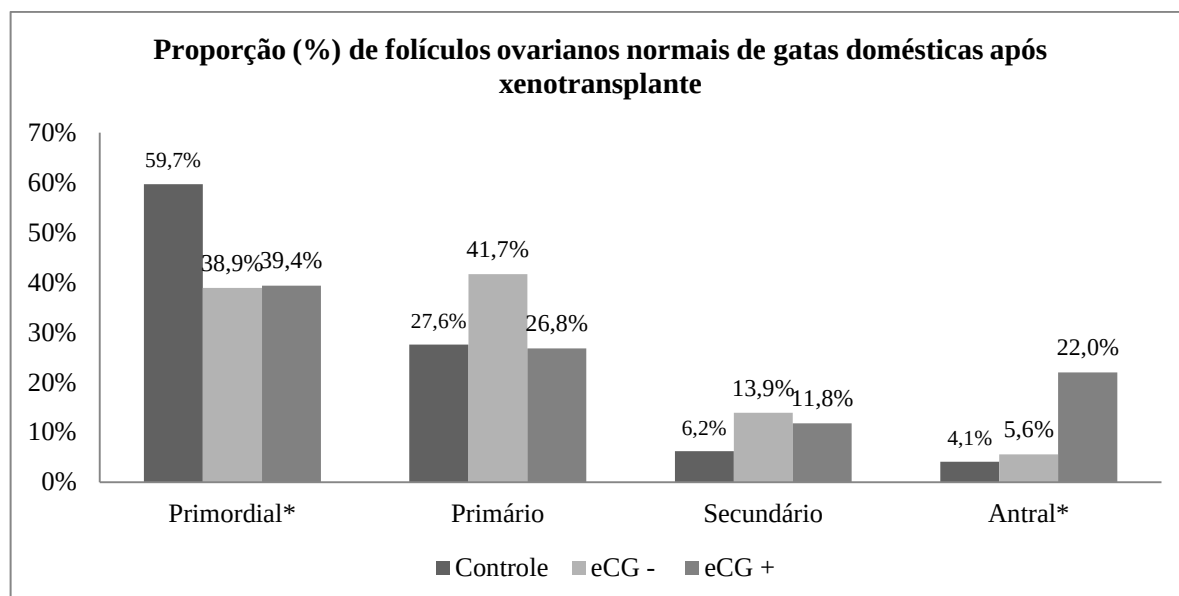


Figura 7 – Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos normais em função dos grupos. Controle: Fragmento controle; eCG – : Transplantes que não receberam indução hormonal; eCG + : Transplantes que receberam indução hormonal (eCG). *Foi observada diferença estatística nas categorias de folículos primordiais e antrais entre os grupos comparados. Nas demais categorias foliculares não houve diferença (Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$).

Tabela 3 – Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos atresícos em função dos grupos.

Grupos experimentais*	Categoria folicular			
	Primordial	Primário	Secundário	Antral
Fragmento controle (n = 7)	1,4%	0,7%	0,3%	0,0%
eCG – (n = 0)	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
eCG + (n = 0)	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

*Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$).

A maior porcentagem de folículos normais nos transplantes foi de primordial e primário devido às baixas taxas metabólicas requeridas por essas categorias de folículo, o que os tornam mais resistentes a isquemia pós-transplante (GOSDEN; BYATT-SMITH, 1986; HUANG et al., 2010), além disso, possuem morfologia simples (ISRAELY et al., 2003) e estão concentrados na periferia do córtex ovariano, sendo os primeiros a se beneficiarem com a revascularização (NUGENT et al., 1997). No entanto, não se sabe ao certo por quanto tempo esse ambiente se manterá, pois os transplantes podem permanecer viáveis por vários meses (BOSCH et al., 2004; GOSDEN et al., 1994); porém já foi observado consumo folicular completo com presença de áreas de fibrose onde outrora fora o parênquima ovariano após um ano (CRESTANA et al., 2006).

Avaliando a microdinâmica de desenvolvimento dos folículos pré-antrais a antrais, não foram observadas diferenças nas porcentagens de folículos atresícos. Já em relação aos

folículos normais, diferenças foram observadas nas categorias de folículos primordiais e antrais entre os grupos estudados. Esse panorama ocorreu inicialmente devido à ativação folicular, causando redução nas proporções de folículos primordiais e aumento nas proporções dos folículos primário, secundário e antral dos transplantes em relação aos fragmentos controle; bem como, pelo uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no protocolo hormonal, que aumentou consideravelmente a proporção de folículos antrais no transplante. Traçando um paralelo com o que ocorre com leucócitos que tendem ao desvio à direita quando ocorre uma maior segmentação rumo à maturação, os folículos apresentados neste estudo demonstraram um padrão equivalente à medida que aumentam suas proporções além do normal rumo aos estádios mais avançados da foliculogênese, o que aqui denominamos como *Follicular Right Shift* (FRS). Situação semelhante foi observada no xenotransplante ovariano de bovino (SENBON et al., 2005) e suíno (KIKUCHI et al., 2006), ambos quando tratados com eCG.

6.4. INDUÇÃO HORMONAL

A foliculogênese é um processo de formação, crescimento e maturação folicular pelo qual folículos primordiais se desenvolvem até o estágio de folículos pré-ovulatórios (DRUMMOND, 2006) e depende da ação conjunta dos hormônios produzidos no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, podendo também ser auxiliada por gonadotrofinas exógenas. Em gatos domésticos, os protocolos que visam o desenvolvimento folicular englobam a utilização do FSH ou eCG exógenos. Para maturação final dos folículos e ovulação podem ser utilizados GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) ou hCG (gonadotrofina coriônica humana) (VILLAYERDE, 2005). A intenção nesse experimento foi obter melhor desenvolvimento folicular com maiores taxas de folículos antrais, dessa maneira, optou-se pelo uso apenas do eCG.

A dose de eCG comumente utilizada em gatas domésticas é de 50-150 UI, aplicada em dose única (DONOGHUE et al., 1992; HOWARD et al., 1992; SWANSON et al., 1997; WHEELER et al., 1988), mas considerando a nova receptora e o tamanho reduzido do fragmento ovariano (1 mm^3), optou-se por um protocolo hormonal que contemplasse as receptoras, haja vista o respeito aos processos metabólicos próprios das camundongas, assim, a dose utilizada nesse experimento foi de 10 UI, que foi aplicada em dose única e está dentro dos limites utilizados pra esse espécie (GUI;JOYCE, 2005; ILLERA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2009).

Como observado nos resultados apresentados anteriormente, o desenvolvimento folicular ocorreu de forma satisfatória nos transplantes, principalmente naqueles tratados com eCG. Observou-se folículos pré-antrais com diâmetros maiores que os dos demais grupos, bem como, maiores proporções de folículos antrais. Com esse protocolo, não foi observado superdosagem hormonal, hiperestimulação ovariana e produção de folículos císticos, resultados normalmente observados em doses inadequadas de eCG (BROWN, 2011). Por outro lado, não foi eficiente para promover superovulação, pois o número de folículos antrais com tamanho viável (acima de 3 mm, MALANDAIN et al., 2011) para serem levados à produção *in vitro* de embriões foram baixos.

6.5. AVALIAÇÃO DA BIOQUÍMICA RENAL E HEPÁTICA

Ao final do experimento foi coletado sangue total de todas as receptoras transplantadas. Os dados de bioquímica sérica, renal e hepática, obtidos a partir dessa coleta foram expressos em média e desvio padrão (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores plasmáticos da função renal e hepática dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Parâmetros				
	*UR (µg/dl)	*CR (µg/dl)	*ALT (µ/L)	*AST (µ/L)	FAL (µ/L)
eCG – (n = 5)	44,5 ± 8,1	0,7 ± 0,1	30,7 ± 1,1	147,5 ± 41,8	229,1 ± 4,6 ^b
eCG + (n = 10)	53,8 ± 9,9	0,6 ± 0,1	26,2 ± 6,6	163,1 ± 43,4	236,5 ± 15,7 ^a

Letras minúsculas indicam comparação entre os grupos experimentais em cada parâmetro avaliado. * Não apresentou diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). eCG – : Animais transplantados que não receberam indução hormonal; eCG + : Animais transplantados que receberam indução hormonal (eCG); UR: Ureia; CR: Creatinina; ALT: Alanina Aminotransferase; AST: Aspartato Aminotransferase; FAL: Fosfatase Alcalina.

Nos parâmetros avaliados, a fosfatase alcalina (FAL) foi a única enzima a apresentar diferença entre os grupos. A FAL está distribuída em vários tecidos, inclusive no fígado (BERGONSO, 2007), mas para afirmar que há um dano hepático é necessário que os valores das outras enzimas hepáticas também apresentem alterações (MOTTA, 2000). Ademais, todos os valores obtidos das fêmeas transplantadas ficaram dentro de parâmetros observados em camundongos da linhagem C57BL/6 (ALMEIDA et al., 2008; ARAÚJO, 2012). Dessa maneira, pode-se inferir que não houve dano hepático nas receptoras.

Valores bioquímicos do plasma sanguíneo permitem avaliação individual e de populações (CARVALHO et al., 2013), além de fornecer informações relevantes relacionadas

ao estado clínico dos animais, ao balanço nutricional, prognósticos e monitoração de tratamentos e experimentos (CARVALHO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2001). Os valores obtidos dos animais desse experimento encontram-se dentro dos parâmetros normais para a espécie, permitindo inferir que o fragmento ovariano alocado sob a cápsula renal dos animais não alterou a função normal do órgão; e que o procedimento cirúrgico e toda a manipulação realizada durante o período experimental não alteraram o estado clínico geral dos animais, concluindo então que a técnica de xenotransplante ovariano felino não altera a fisiologia normal das receptoras imunodeficientes.

7. CONCLUSÕES

As camundongas C57BL/6 SCID foram bons modelos experimentais para realização do xenotransplante ovariano felino.

A citologia vaginal permitiu averiguar o retorno da ciclicidade das fêmeas transplantadas. Associada a análise histológica, foram eficientes para avaliar o desenvolvimento folicular do transplante e também a interação entre o tecido receptor e doador.

A aplicação do eCG na dose utilizada estimulou o desenvolvimento folicular a estádios mais avançados, fenômeno aqui denominado como desvio folicular à direita. Apesar disso, o aumento foi insuficiente para assegurar uma superovulação, satisfatória numericamente, para fins de produção *in vitro* de embriões.

O xenotransplante sob a cápsula renal não alterou o estado de higidez das receptoras e não comprometeu as funções renal e hepática, demonstrando ser o sítio receptor adequado para este procedimento.

8. REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J. et al. 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.
- ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. The origin of the equine endometrial cups. **Journal of reproduction and fertility**, v. 29, n. 2, p. 313-316, 1972.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2002.
- ARAÚJO, F. T. M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas e do centro de criação de animais de laboratório/FIOCRUZ**. 2012. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou.
- 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 & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 108, n. 1, p. 14-18, 2003.
- BARRETT, D. M. W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, v. 61, n. 2, p. 311-327, 2004.
- BERGONSO, T. H. D. **Valores bioquímicos referenciais de javali (sus scrofa scrofa, linnaeus, 1758), confinados em fazenda do estado de São Paulo**. 2007.
- BOSCH, P., et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2, p. 581-594, 2004.
- BOSMA, G. C.; CUSTER, R. P.; BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**, 1983.
- BRISTOL, S. K.; WOODRUFF, T. K. Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor β superfamily ligands in the feline ovary. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 3, p. 846-859, 2004.

- BROWN, J. L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3, p. 155-162, 2011.
- BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35538, 2012.
- CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after xenotransplantation. **Human Reproduction**, v.10, n.9, p.2334–2338, 1995.
- CARVALHO, C. C. D. et al. Perfil hematológico, bioquímico sérico, proteína C reativa e cortisol de ararajubas (*Guaroba guarouba*) mantidas em cativeiro¹. **Pesq. Vet. Bras**, v. 33, n. 3, p. 394-398, 2013.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 11-23, 2007.
- CHRISTIE, B. A.; BJORLING, D. E. Rins. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ª edição, v.2, São Paulo, P 1698-1713: Manole, 1998.
- CLINE, E. M.; JENNINGS, L. L.; SOJKA, N. J. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. **Laboratory animal science**, v. 30, n. 6, p. 1003-1005, 1980.
- COLBY, E. D. et al. Induced estrus and timed pregnancies in cats. **Laboratory animal care**, v. 20, p. 1075-1080, 1970.
- 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.
- CRESTANA, F. M., et al. **Autotransplantação de ovário no subcutâneo e consumo folicular em gatas domésticas (*felis catus*)**. v. 12, n. 2, Uberlândia: Veterinária Notícias, 2006.
- CUPERSCHMID, E. M.; CAMPOS, T. P. R. de. Os curiosos xenoimplantes glandulares do doutor Voronoff. **Hist. ciênc. saúde-Manguinhos**, v. 14, n. 3, p. 737-760, 2007.
- DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human reproduction update**, v. 15, n. 6, p. 649-665, 2009.
- DEMIRCI, B. et al. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 999-1010, 2003.

- DONOGHUE, A. M. et al. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 5, p. 972-980, 1992.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, n. 16, p. 450, 2006.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 375-387, 2000.
- FASSBENDER, M. et al. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. **The Journal of reproduction and development**, v. 53, n. 5, p. 1023, 2007.
- FULOP, G. M.; PHILLIPS, R. A. The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. **Nature**, v. 347, n. 6292, p. 479-482, 1990.
- GARTNER, L. **Tratado de histologia**. Elsevier Brasil, 2011.
- GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2001.
- GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 3, p. 619-623, 1994.
- GOSDEN, R. G.; BYATT-SMITH, J. G. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicular epithelium: model, predictions and implications. **Human Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 65-68, 1986.
- GUI, LM.; JOYCE, I. M. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 1, p. 195-199, 2005.
- GUNASENA, K. T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal reproduction science**, v. 53, n. 1, p. 265-275, 1998.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal, 7^a. 2004.
- HOFF, J. Methods os blood colletion in the mouse. **Lab. Anim.** v.29, n.10, p.47-53, 2000.
- HOSSEINI, L. et al. Ovarian Tissue Transplantation versus Follicular Culture. **JFIV Reprod Med Genet**, v. 2, p. 129, 2014.
- HOWARD, J. G. et al. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. **Journal of reproduction and fertility**, v. 96, n. 1, p. 175-186, 1992.

- HUANG, KY. et al. Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. **Cryobiology**, v. 60, n. 2, p. 129-137, 2010.
- ILLERA, M. J. et al. Blockade of the $\alpha v\beta 3$ integrin adversely affects implantation in the mouse. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1285-1290, 2000.
- ISRAELY, T. et al. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. **Human Reproduction**, v. 21, n. 6, p. 1368-1379, 2006.
- ISRAELY, T. et al. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2055-2064, 2003.
- IUCN 2015. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. <www.iucnredlist.org>. Acesso em: **10 de julho de 2015**.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. In: **Histologia básica**. Guanabara Koogan, 2004.
- 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.
- KIKUCHI, K. et al. In vitro and in vivo developmental ability of oocytes derived from porcine primordial follicles xenografted into nude mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p. 51-57, 2006.
- KIM, S. S.; SOULES, M. R.; BATTAGLIA, D. E. Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 1, p. 77-82, 2002.
- KROHN, P. L. Transplantation of the ovary. In: Zuckerman, L.; Weir, B.J. **The Ovary**, v.2. 2.ed. New York, San Francisco and London: Academic Press. cap. 3, p. 101-128. 1977
- LEONEL, Ellen Cristina Rivas. **Criopreservação e autotransplante heterotópico de tecido ovariano de gatas domésticas**, 80p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, 2013.
- LERMEN, D. et al. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. **Molecular ecology**, v. 18, n. 6, p. 1030-1033, 2009.
- LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6, p. 141-148, 1922.

- 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.
- MALANDAIN, E. et al. Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1337-1346, 2011.
- MALTARIS, Theodoros et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue pieces in gonadotropin-stimulated SCID mice: the effect of ovariectomy. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4171-4176, 2006.
- MENDONÇA, F. et al. Aspectos citopatológicos da mucosa vaginal de camundongas tratadas com progesterona. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 313-318, 2007.
- MIALOT, JP. Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos. **A Hora veterinária**, p. 160, 1988.
- MICHEL, C.. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. **Laboratory animals**, v. 27, n. 3, p. 278-280, 1993.
- MOTTA, Valter T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Editora: Médica Massau**, 2000.
- NELSON, J. F. et al. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 2, p. 327-339, 1982.
- NISOLLE, Michelle et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertility and sterility**, v. 74, n. 1, p. 122-129, 2000.
- NUGENT, D. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 3, p. 267-280, 1997.
- POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 163-174, 2000.
- PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E.; HOWARD, J. G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 57, p. 423-433, 2000.
- RENNÓ, L. N. et al. Concentração plasmática de uréia e excreções de uréia e creatinina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1235-1243, 2000.

- RESTEL, T. I. **Avaliação ponderal, hematológica e bioquímica em camundongos mus musculus, linhagem swiss, machos e fêmeas de diferentes idades, do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.** 2012.
- REYNAUD, K. et al. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in the feline ovary. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. 2, p. 174-179, 2009.
- RICHARDS, JA. S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, n. 1, p. 195-220, 2002.
- RODRIGUES, M. V. et al. Qualidade embrionária de camundongos ("Mus musculus") suplementados com geléia real. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, 2009.
- ROEDENBECK, I. A. E. **Landscape-scale effects of roads on wildlife.** 2007. Tese de Doutorado. Universitätsbibliothek Giessen.
- SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. **Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 115-8, 2002.
- SCHUMANN, G. et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 7, p. 725-733, 2002.
- SENBON, S. et al. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. **Zygote**, v. 13, n. 04, p. 309-315, 2005.
- SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-37, 2007.
- SWANSON, W. F. et al. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 2, p. 295-302, 1997.
- VAN EYCK, AS. et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 5, p. 1676-1685, 2010.
- VILELA, M. G.; DOS SANTOS JÚNIOR, J. L; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, 2007.
- VILLAYERDE, A. I. S. B. **Protocolos de indução de estro e ovulação em gatas domésticas.** 2005.

- WHEELER, A. G.; WALKER, M.; LEAN, J. Function of hormonally-induced corpora lutea in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 29, n. 4, p. 971-978, 1988.
- WIEDEMANN, C. et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 300-304, 2012.
- WILDT, D. E.; KINNEY, G. M.; SEAGER, S. W. Gonadotropin induced reproductive cyclicity in the domestic cat. **Laboratory animal science**, v. 28, n. 3, p. 301-307, 1978.
- WOLVEKAMP, M. C. J. et al. 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. et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, n. 5, p. 851-859, 2006.