



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO DO TEMPO DE REVASCULARIZAÇÃO E
DOS EFEITOS DA SINVASTATINA NO AUTOTRANSPLANTE
DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO DE GATAS
DOMÉSTICAS**

MARCELLA MOTTA DA COSTA

TESE de DOUTORADO

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**INVESTIGAÇÃO DO TEMPO DE REVASCULARIZAÇÃO E
DOS EFEITOS DA SINVASTATINA NO AUTOTRANSPLANTE
DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO DE GATAS
DOMÉSTICAS**

MARCELLA MOTTA DA COSTA

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª CAROLINA MADEIRA
LUCCI

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

TESE de DOUTORADO

BRASÍLIA-DF

2020

“Uma pessoa que nunca cometeu um erro, nunca tentou nada novo.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Impossível caminhar sozinha por esses longos quatro anos de doutorado sem o auxílio de pessoas queridas ao redor me apoiando. Dessa forma, é imprescindível agradecer a cada um (a) por suas participações nessa jornada.

Primeiramente, presto meus mais sinceros agradecimentos à Carol Lucci, minha orientadora, que acreditou em mim e no meu trabalho ao me aceitar para o doutorado. Desde o começo me deu além da oportunidade, as melhores condições e total apoio para chegar até aqui no fim deste trabalho lindo. Você, Carol, sem dúvidas, me orientou não somente em um doutorado, mas me ajudou a amadurecer como pessoa e pesquisadora. A sua grandeza em ensinar foi mostrada dia após dia pela sua paciência, companheirismo e humildade.

Ao grupo de Reprodução Animal como um todo (Juliana Lis, Vanessa Nicolau, Cecibel León, Carolina Leme, Lara Oliveira, Adyla Damasceno e Larissa Silva), agradeço por toda ajuda durante os momentos de experimento. Principalmente a Cecibel León, que na segunda etapa deste trabalho, foi fundamental na realização e ajuda com procedimentos, técnicas e conselhos.

À Liudimila (Liu) pela realização das cirurgias, pelo carinho e apoio de sempre, Marcelle e Ana Bárbara (Babu) pelas anestésias e cuidados com as gatinhas e às três pelos melhores papos que animavam os nossos dias de cirurgia. À Aline Maragon, pela realização dos ultrassons dos animais de experimento e os papos sempre animados. À Janice Vilela pela contribuição na obtenção de parte dos resultados. E aos adotantes das gatas.

À professora Fernanda Cristina Alcantara dos Santos, da Universidade Federal de Goiás (UFG), pela colaboração na realização das imunohistoquímicas deste trabalho. Assim como a todo o restante do grupo Laboratório de Microscopia Aplicada à Reprodução, pela recepção e auxílio prestado, em especial a Janaína, Cíntia, Bárbara, Mayara, Luana, Edvaldo e Esther por terem tornada a minha estadia tão agradável e acolhedora.

À professora Connie McManus pela ajuda com as análises estatísticas e à professora Mônica Garcia por ceder o microscópio EVOS para a obtenção das fotos desta tese.

À distribuidora Alere S/A, pela contribuição com a doação dos testes de detecção de FIV/FELV utilizados nos animais do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas durante o período de doutorado. E à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo auxílio destinado a ida para congressos.

Inevitável não dirigir os meus maiores agradecimentos à minha família, em especial a minha mãe, por estar ao meu lado nesses quatro anos, me dando apoio incondicional e tantas vezes condições emocionais que em muitos momentos me deram força para continuar firme. O meu muito obrigada pelos melhores exemplos de superação e integridade, mãe! Ao meu pai, *in memoriam*, meu muito obrigada por tantas/todas palavras de apoio. Por quase sempre acreditar mais em mim do que eu mesma e por, da sua forma, várias vezes se fazer presente. Aos meus irmãos, cunhado e sobrinhos, meu grande agradecimento por toda força que me deram nesta jornada. Por cada palavra de incentivo e puxão de orelha que me ajudaram a chegar onde estou hoje. A vida ficou muito mais encantadora com os lindos sorrisos dos meus pequenos Rafael, Gabriel, Luara e Angelina. À Leide, amiga/tia querida de todas as horas que sempre me rodeou com seu carinho e preocupação, além de tantas risadas aos finais de semana. À minha querida namorada Cissi por estar nesses últimos dois anos me dando força para seguir em frente enxergando sempre o melhor em mim. Por acreditar tanto, quase sempre até mais do que eu mesma, de que sou capaz disso tudo e muito mais.

E por fim, mas não menos importante, agradeço imensamente aos meus grandes antigos ou novos amigos: Mariana Marzullo, Nazaré Klautau, Carla Vizzoto, Aline Queiroz, Cecibel León, Daiane Araújo e Natasha Portal por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem, cada um de sua forma, em todos os momentos nessa caminhada. Carrego todos comigo sempre! A vocês minha eterna gratidão!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar o tempo de revascularização após autotransplante de tecido ovariano fresco e criopreservado de gatas, bem como analisar os efeitos da sinvastatina no transplante de tecido ovariano criopreservado. Na primeira etapa foi realizada a investigação do tempo inicial da revascularização e dos danos iniciais após o transplante de tecido ovariano fresco e criopreservado em gatas domésticas durante os seis primeiros dias pós-transplante. No que diz respeito à análise de vascularização, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na área de tecido ocupada por vasos nos tecidos fresco e criopreservado transplantados, todavia a área de tecido ocupada por vasos foi significativamente maior ($p < 0,05$) em D4 e D6 em relação a D0. A análise de ultrassom, com auxílio de Doppler, também mostrou um aumento da vascularização na periferia dos transplantes com o passar dos dias de transplante. Porém, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de folículos primordiais e em crescimento morfológicamente normais após o transplante em comparação com o tecido não transplantado (D0), tanto no tecido fresco como no criopreservado. Contudo, a perda folicular nos primeiros dias pós-transplante se mostrou mais intensa no material congelado. Em suma, foi possível definir que a vascularização dos transplantes de tecido ovariano para o tecido subcutâneo ocorre até o quarto dia pós-transplante, sem diferença no tempo entre tecido fresco e criopreservado. Além disso, a perda folicular nos seis primeiros dias se mostrou mais intensa no tecido criopreservado do que no fresco. Na segunda etapa deste trabalho o objetivo foi avaliar os efeitos da administração de sinvastatina no desenvolvimento folicular e na revascularização do tecido ovariano de gatas criopreservado e transplantado para o tecido subcutâneo. Houve uma diminuição intensa do número de folículos encontrados, tanto no grupo que recebeu sinvastatina

como no grupo que não recebeu (Controle). Foram encontrados dois folículos antrais em D28 do grupo Controle e quatro folículos em crescimento em D14, D21 e D63 no grupo Sinvastatina, todos eles com células da granulosa proliferativas. Após o transplante, o tipo de degeneração mais comumente encontrado foram estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem a presença de ovócito (CGJ). Em relação a análise de vascularização, não foi observado aumento na porcentagem da área de tecido ocupada por vasos após o transplante entre os grupos Controle e Sinvastatina ($p>0,05$). Em conclusão, a sinvastatina não promoveu a melhora no desenvolvimento folicular após transplante de tecido ovariano criopreservado de gatas.

Palavras chaves: Autotransplante, Sinvastatina, Isquemia, Folículos pré-antrais, Revascularização

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the revascularization time after autotransplantation of fresh and cryopreserved cat ovarian tissue, as well as to analyze the effects of simvastatin on the cryopreserved ovarian tissue transplantation. First, we investigated the revascularization time and the initial damage after transplantation of fresh and cryopreserved cat ovarian tissue during the first six days after transplantation. No significant difference ($p > 0.05$) in the tissue area occupied by vessels was observed between fresh and cryopreserved transplants, however the area of vessels was significantly greater ($p < 0.05$) in D4 and D6 in relation to D0, both for fresh and cryopreserved tissue. Ultrasound analysis, with Doppler, showed an improvement in vascularization around the implants over the days of transplantation. Nevertheless, there was a significant decrease ($p < 0.05$) in the percentage of primordial and growing morphologically normal follicles after transplantation compared to non-transplanted tissue (D0), both in fresh and cryopreserved tissue. However, follicular loss in the first days after transplantation was more intense in cryopreserved tissue. Briefly, it was possible to define that the vascularization of fresh and cryopreserved ovarian tissue transplanted to the subcutaneous tissue of domestic cats occurs within four days. Further, follicular loss in the first six days was more intense in cryopreserved material than in fresh material. In the second stage of this study, the aim was to evaluate the effects of simvastatin administration on follicular development and revascularization of cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to the subcutaneous tissue. There was an intense decrease in the number of follicles found, both in the group treated with simvastatin and the non-treated group (Control). Two antral follicles were found in D28 in the Control group and four growing follicles in D14, D21 and D63 in the Simvastatin

group, all with proliferative granulosa cells. After transplantation, the most common degeneration found was follicular structures with granulosa cells juxtaposed without the presence of an oocyte (CGJ). Concerning the analysis of vascularization, there was no increase in the tissue area occupied by vessels after transplantation between the Control and Simvastatin groups ($p>0.05$). In conclusion, simvastatin did not improve follicular development after transplantation of cryopreserved cat ovarian tissue.

Keywords: Autotransplantation, simvastatin, ischemia, preantral follicles, revascularization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da foliculogênese (adaptado de Mescher, 2016)	8
Figura 2. Classificação folicular (adaptado de Bristol-Gould & Woodruff, 2006)	10
Figure 1.1. Experimental design. A) Eight pieces were taken from each pair of ovaries, from which one was immediately fixed (fresh D0) and three were immediately grafted. Four fragments were cryopreserved and after thawing, one fragment was fixed (cryo D0) and three were grafted. B) Each cat had six ovarian tissue fragments grafted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck - three fresh grafts and three cryopreserved grafts. The grafts were recovered on days 2 (D2), 4 (D4) and 6 (D6) after transplantation, one fresh and one cryopreserved at each time point	48
Figure 1.2 Mean percentage of total tissue area occupied by blood vessels in fresh and cryopreserved ovarian tissue before transplantation (D0) and 2, 4 and 6 days after grafting.....	51
Figure 1.3 Representative images of Doppler ultrasound analysis of fresh (a, c and e) and cryopreserved (b, d and f) ovarian tissue on days 2, 4 and 6 after transplantation. Arterial (red) and venous (blue) blood flow evidenced adjacent to the ovarian tissue grafts (delimited by dashed lines)	52
Figure 1.4 Representative micrographs of morphologically normal (MN) and degenerated follicles. a) MN primordial follicles; b) MN growing follicle; c) totally degenerated growing follicle; d) growing follicle with shrunken oocyte, e) a growing follicle with oocyte detached from granulosa cells (arrow) and a primordial follicle with pyknosis of oocyte nucleus (arrowhead), and f) growing follicle with vacuoles in the ooplasm. Bars = 50 µm.....	54

Figura 2.1. Delineamento experimental. Desenho esquemático do delineamento experimental começando com a fragmentação dos ovários de cada animal em oito fragmentos (~5x3x3 mm), a criopreservação das amostras, o transplante para o tecido subcutâneo do dorso dos animais, as retiradas dos fragmentos nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 e as análises de histologia, fibrose, vascularização e proliferação celular realizada no tecido ovariano.	69
Figure 2.2. Imagens representativas dos folículos normais encontrados nos fragmentos de tecido ovariano. a) Folículos primordiais morfologicamente normais e b) Folículos em crescimento morfologicamente normais. Barras = 100 µm.	75
Figura 2.3. Imagens representativas das estruturas foliculares sem ovócito encontradas no tecido ovariano. a) Estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem ovócito em coloração de hematoxilina e eosina. b) Estruturas foliculares sem ovócito com células da granulosa justapostas imunomarcadas positivamente pela imuno-histoquímica de Ki67 evidenciadas pelas setas pretas. Barras = 100µm.....	79
Figura 2.4. Imagens representativas dos folículos em crescimento encontrados nos dias 14, 21 e 63 pós-transplante, corados em hematoxilina e eosina (a, c, e, g) e os mesmos folículos com células da granulosa marcadas positivamente em marrom pela imuno-histoquímica para Ki67 (b, d, f, h). Barra = 100µm.	80
Figura 2.5. Figura representativa das células proliferativas do estroma ovariano em tecido transplantado.....	81
Figura 2.6. Imagem representativa do tecido ovariano corado pelo Tricrômico de Gomori nos dias D0 fresco e D0 crio e nos dias pós-transplante (7, 14, 28, 49 e 63). A marcação em verde representa o tecido conjuntivo, evidenciando a fibrose induzida no material transplantado.	82

Figura 2.7. Áreas representativas de regiões de inflamação dos fragmentos transplantados. a) Região do estroma ovariano com uma grande área de processo inflamatório (barra = 200µm). b) Maior aumento de uma região de inflamação na qual é possível observar células imunológicas (cabeças de setas azuis), hemácias extravasadas no tecido inflamatório (setas pequenas pretas) e células gigantes multinucleadas características de inflamações crônicas (setas maiores onduladas) (barra = 50µm) 83

Figura 2.8. Percentual médio da área total de tecido ocupado por vasos sanguíneos nos fragmentos de tecido ovariano do grupo Controle e do grupo Sinvastatina, antes do transplante (D0 fresco e D0 crio) e 7, 14, 28, 49 e 63 dias após o transplante. 84

Figura 2.9. Imagens representativas dos vasos do estroma ovariano imunomarcadas por Von Willebrand. (a) tecido ovariano do grupo Controle e (b) tecido ovariano do grupo Sinvastatina 84

LISTA DE TABELAS

Table 1.1 Total number of follicles counted, number and mean percentage (\pm SD) of primordial and growing follicles, and number and mean percentage (\pm SD) of morphologically normal (MN) follicles in fresh and cryopreserved ovarian tissue fragments non-transplanted (D0) and on D2, D4 and D6 post-transplantation 53

Tabela 2.1. Folículos totais, número de folículos MN e porcentagem dos folículos MN (\pm DP) dentro dos grupos de folículos primordiais e em crescimento nos dias D0 fresco, D0 crio e nos dias pós-transplante (D7, D14, D28, D49 e D63) do grupo Controle 76

Tabela 2.2. Folículos totais, número de folículos MN e porcentagem dos folículos MN (\pm DP) dentro dos grupos de folículos primordiais e em crescimento nos dias D0 fresco, D0 crio e nos dias pós-transplante (D7, D14, D21, D28, D49 e D63) do grupo Sinvastatina 76

Tabela 2.3. Porcentagem de estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito em relação aos folículos degenerados encontrados (% CGJ / Fols. Deg.) nos grupos controle e grupo sinvastatina 79

Tabela 2.4. Classificação (em +) da área de tecido conjuntivo nos dias D0 fresco e criopreservado e nos dias pós-transplante (D7, D14, D21, D28, D49 e D63) para os grupos controle e sinvastatina..... 82

SIGLAS E ABREVIACÕES

ANOVA – Análise da variância

bFGF - Fator de crescimento de fibroblastos

CGJ – Estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem a presença de ovócito

CEUA - Comissão de ética no uso animal

DAB - Diaminobenzidine

DIVAL – Diretoria de Vigilância Ambiental

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EG - Etileno glicol

EPR - Electronic paramagnetic resonance oximetry

FELV- Feline leukemia virus

FIV - Feline immunodeficiency syndrome

FMN - morphologically normal follicles

FSH - Hormônio folículo-estimulante

GLI - Glicerol

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

HE – Hematoxilina e eosina

HMG - Gonodotrofinas da menopausa humana

I-M - Intramuscular

I-V - Intravenoso

IUCN - União internacional para conservação da natureza e recursos naturais

IVEP - Vitro embryo production

LH - Hormônio luteinizante

MN – Morfológicamente normais

OPU - Ovum pick up

OSH – Ovariohisterectomia

PROH - Propanodiol

rFSH - Hormônio Folículo-estimulante recombinante

SAS - Statistical analysis system

SD - Standard deviation

SFB – Soro fetal bovino

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

V-O – Via oral

SUMÁRIO

Introdução	1
Revisão de literatura	4
Felinos	4
Tecido ovariano	6
Criopreservação de tecido ovariano	12
Transplante de tecido ovariano	18
Isquemia	22
Sinvastatina	26
Justificativa	27
Objetivos	28
Objetivo geral	28
Objetivos específicos	28
Referência bibliográfica	29

Capítulo I - Investigação do tempo de revascularização e dano inicial após transplante de tecido ovariano fresco e criopreservado de gatas domésticas

Resumo	41
---------------------	----

Artigo: *Investigation of revascularization time and initial damage after transplantation of fresh and cryopreserved ovarian tissue in domestic cats*

Abstract	43
Introduction	44
Material and methods	46
Results	51
Discussion	55
References	58

Capítulo II - Análise dos efeitos da sinvastatina no autotransplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado de gatas

Resumo	64
Introdução	65
Material e métodos	68

Animais	68
Delineamento experimental	68
Protocolo de criopreservação	70
Procedimento cirúrgico e anestésico.....	70
Processamento histológico	72
Histoquímicas	72
Análises estatística	74
Resultados	75
Discussão	85
Referência Bibliográfica	88
Considerações finais	93

INTRODUÇÃO

O uso de biotecnologias na área da fisiologia da reprodução tem sido muito empregado com diversas finalidades, inclusive nas muitas áreas da reprodução. Um exemplo disto é o uso de biotecnias na preservação de germoplasma de animais ameaçados. Esta metodologia nada mais é do que a conservação adequada do material genético do animal para utilização futura (Lermen *et al.*, 2009). A principal biotecnologia empregada para essa finalidade é a criopreservação. O método consiste basicamente no congelamento e conservação de células germinativas (ovócitos e/ou espermatozoides) ou tecidos gonadais (ovário ou testículo) em nitrogênio líquido (-196° C), podendo ficar armazenado por tempo indeterminado (Mazur, 1984).

A criopreservação é ainda hoje a melhor forma de agir diretamente sob a problemática de extinção ou vulnerabilidade de espécies selvagens ameaçadas. Esta preocupação tem se tornada global frente aos dados tão atuais e cada vez mais preocupantes de vulnerabilidade que a população de felinos selvagens enfrenta. Dentro da família felidae, os gatos domésticos são uma das poucas espécies que não apresenta nenhum tipo de ameaça, conforme o demonstrado em 2019 pela Lista Vermelha publicada pela União Internacional para Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN). Aliado à ausência de risco, uma outra característica importante é a semelhança filogenética entre os felinos selvagens e os gatos domésticos, o que faz com que esta espécie seja o principal modelo experimental para estudos de preservação de espécies felinas selvagens.

Para trabalhar diretamente na manutenção da população de felinos selvagens, a utilização de transplantes é uma ferramenta promissora, visto que é uma técnica que propicia a verificação da viabilidade do desenvolvimento folicular de tecido ovariano criopreservado pois promove condições mais próximas do natural (*in vivo*). No entanto o

sucesso do transplante é dependente do tempo de revascularização do tecido transplantado, já que neste período sem o aporte sanguíneo ideal, o material sofre danos isquêmicos muitas vezes irreversíveis. O prejuízo é ainda maior em materiais criopreservados pois além da isquemia, há também danos causados pelas crioinjúrias promovida diretamente pelo processo de congelamento. As lesões isquêmicas ocorridas imediatamente após o transplante são as principais responsáveis pela drástica depleção folicular do material (Kim *et al.*, 2003).

Desta forma, inúmeros grupos veem trabalhando na tentativa de encontrar maneiras mais eficientes de reduzir os danos isquêmicos e aumentar a revascularização pós-transplante. Alguns agentes químicos já são amplamente utilizados com este intuito, como por exemplo o fator de crescimento endotelial, o fator de crescimento de fibroblastos e a vitamina E, entre outros (Nugent *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012, 2013).

Uma alternativa mais recente é a utilização de fármacos como agentes diretos na diminuição do tempo de revascularização do tecido transplantado. Neste âmbito, a literatura tem demonstrado que as estatinas possuem efeitos protetivos em transplantes de diferentes tipos de órgãos. Dentro deste grupo, a sinvastatina é um fármaco com grande potencial a ser usado em transplantes de tecido ovariano. É sabido que os efeitos colaterais deste fármaco possuem ações angiogênicas, anti-inflamatórias e de inibição de apoptose em tecidos transplantados (Russo *et al.*, 2012; Tuuminen *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2016). Alguns estudos recentes revelaram, inclusive, que a administração de sinvastatina antes da OSH em camundongos possui efeitos benéficos e promissores em relação a preservação da população folicular do tecido ovariano transplantado (Lee *et al.*, 2015a).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo realizar uma avaliação do tempo necessário para iniciar a revascularização após o autotransplante subcutâneo em gatas de

tecido ovariano. Além de analisar se a sinvastatina possui efeitos benéficos na revascularização do tecido transplantado.

REVISÃO DE LITERATURA

FELINOS

A grande importância destes mamíferos carnívoros se dá principalmente pelo fato de serem um dos maiores predadores do topo da cadeia alimentar, garantindo dessa forma o equilíbrio necessário ao ecossistema. A família *Felidae* ocupa todos os continentes, exceto os hemisférios polares, sendo que nos demais continentes podem ser encontrados em florestas, regiões frias ou quentes e até mesmo regiões de deserto. Muitas destas espécies vivem entre 13 e 20 anos estando em vida selvagem, e atingem a maturidade sexual entre os nove meses e quatro anos de idade, sendo esta uma característica muito variável de acordo com a espécie. Estes animais podem se reproduzir durante todo o ano, apenas uma vez ao ano ou até mesmo a cada três anos, como é o caso dos tigres (*Panthera tigris*). Em sua grande maioria, são animais de hábitos solitários, à exceção dos leões que vivem mais comumente em bandos (Beisiegel *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2016).

Geralmente, os felinos são poliesticos sazonais com atividade sexual durante os meses com dias mais longos e inatividade sexual durante os meses com dias mais curtos em climas temperados. Estes indivíduos geralmente possuem ovulação induzida, ou seja, ocorre a ovulação apenas 24 a 48 horas após a liberação do pico de LH pós-coito (Wildt *et al.*, 1981; Goodrowe *et al.* 1988). No entanto, algumas espécies de felinos demonstraram a capacidade de ovular independente da estimulação externa (revisado por Barnes *et al.*, 2015). As gatas domésticas, especificamente, possuem o ciclo estral com duração de ~2 semanas, com duração do estro de 3 a 7 dias. Assim como a maioria dos felinos, a ovulação em gatas é descrita como ovulação induzida. No entanto, ovulações espontâneas são relatadas em fêmeas mantidas em laboratórios sendo esta condição dependente das características individuais de cada animal (possivelmente genéticas), das

condições nas quais são mantidas ou até mesmo da proximidade de um macho (revisado por Brown, 2006). Há uma variação no tamanho do folículo pré-ovulatório dentro das diversas espécies da família *Felidae*, sendo que entre as gatas domésticas, folículos com tamanhos maiores a 4 mm são geralmente ovulados (revisado por Evans, 2003).

De acordo com Clavijo & Ramírez (2009), das 38 espécies existentes atualmente oito ocorrem no Brasil. São elas:

- Seis espécies de pequenos felinos selvagens: o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), o gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), a Jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*).
- Duas espécies de grandes felinos: a onça-parda (*Puma concolor*) e a onça-pintada (*Panthera onca*).

Os felinos, de um modo geral, representam um grupo taxonômico de grande interesse no que se refere a sua importância científica, principalmente por causa do tão crescente risco de extinção ao qual eles têm sido expostos. Estes indivíduos são altamente vulneráveis em virtude da constante ação antrópica, seja ela por causa da caça descontrolada ou pela gradual diminuição de seu habitat original através do desmatamento. Não bastando apenas políticas de criminalização e de conscientização mundial sobre o grave problema da extinção, outras estratégias se fazem necessárias para atuar nesta problemática. Uma alternativa é a preservação do material genético em bancos de germoplasmas, os quais são capazes de comportar coleções-base para uma enorme variabilidade genética animal (Primack & Rodrigues, 2001).

A questão do risco iminente de extinção em diversas espécies de animais é uma preocupação incessante e amplamente difundida. Em todo o mundo, a família *Felidae*

possui 38 espécies em sua totalidade, sendo que destas 5 espécies estão em ameaça de extinção, 13 encontram-se vulneráveis, 7 estão quase ameaçadas e apenas 13 apresentam estado pouco preocupante, sendo que destas, somente seis populações estão realmente estáveis, com apenas seis populações já estáveis. Dentre as espécies, o gato doméstico (*Felis catus*) é um dos poucos que se encontram totalmente fora de qualquer forma de risco ou vulnerabilidade de acordo com a Red List of Threatened Species publicada em 2019-3 pela IUCN.

Não somente pelo fato de estar fora de risco, devido ao grande número de indivíduos em todo o mundo, mas principalmente por serem filogeneticamente próximos e fisiologicamente semelhantes aos felinos selvagens, o gato doméstico é um excelente modelo experimental para estudos inseridos no contexto de preservação de espécies felinas (Rojo *et al.*, 2015).

TECIDO OVARIANO

Os ovários são compostos por duas regiões morfológicamente distintas. A região mais interna, denominada medula ovariana, é constituída por tecido conjuntivo frouxo e muitos vasos sanguíneos e por este motivo detém como principal função o suprimento sanguíneo do órgão. A outra região é o córtex ovariano, que consiste na porção mais periférica do órgão e é onde está localizado o *pool* de folículos ovarianos. Esta região é responsável pela função endócrina e exócrina dos ovários, por meio da produção de hormônios esteroides, da ovogênese e foliculogênese (Junqueira & Carneiro, 2012).

O sistema hormonal reprodutivo feminino consiste basicamente na hierarquia de três hormônios essenciais para o funcionamento e desenvolvimento normal do órgão e seus tipos celulares específicos. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) liberado pelo hipotálamo controla a secreção de duas gonadotrofinas da adeno-hipófise que são o

hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Por sua vez, o FSH e o LH, os quais atuam diretamente nas gônadas, são pequenas glicoproteínas liberadas em variações cíclicas. Em resposta a esta variação as células da granulosa são estimuladas a produzir uma maior quantidade de receptores para a ligação destes hormônios. O FSH juntamente com os hormônios esteroides agem no início e manutenção da gametogênese. Já o LH atua particularmente sobre as células endócrinas estimulando a produção dos hormônios gonodais, que no caso das fêmeas são o estrógeno e a progesterona.

A ausência dos hormônios FSH e LH, que ocasiona a inexistência dessa cadeia de estímulos para a produção dos demais hormônios sexuais, é o que promove a inativação dos ovários, fato este que ocorre durante toda a infância, quando quase nenhum hormônio gonadotrópico é secretado. A comunicação e ações destes hormônios são as responsáveis pelos processos de desenvolvimento do folículo e do ovócito, conhecidos como foliculogênese e ovogênese, respectivamente (Drummond & Findlay, 1999; Silverthorn, 2017).

A ovogênese é o processo de diferenciação celular da linhagem germinativa feminina que se inicia ainda na fase embrionária e que dará origem a população total de ovócitos das fêmeas. As células germinativas primordiais ($2n$) migram para as gônadas femininas (ovário), onde iniciam inúmeros processos de mitose originando a diferenciação para ovogônias ($2n$). Esta proliferação ocorre em um número predeterminado de divisões mitóticas, espécie-específica. As ovogônias então entram em processos de meiose, aumentam de tamanho, duplicam seu DNA e param em prófase I na primeira meiose, diferenciando-se, assim, em ovócitos primários. O processo de diferenciação dos ovócitos primários para secundários é iniciado somente com a maturidade sexual/hormonal e concluído com a fecundação do ovócito após a ovulação. Na transição da mitose para

meiose, os ovócitos primários são envolvidos em uma camada de células somáticas, chamadas pré-granulosa e uma lâmina basal, formando os folículos ovarianos (Sherwood, 2011).

O crescimento e maturação folicular ocorre por meio de uma série de transformações moleculares e celulares, de modo sequencial, e dos diversos componentes estruturais do folículo, como o ovócito, as células da granulosa e as células da teca (interna e externa). Este desenvolvimento, chamado de foliculogênese, é mediado não somente por fatores intra-ovarianos, como também por fatores extra-foliculares e principalmente por meio de sinais hormonais (Bukovsky *et al.*, 2005; Aerts & Bols, 2010).

Os folículos são classificados em: a) pré-antrais, que são constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários e b) antrais, que são os folículos terciários e pré-ovulatórios. A diferença entre estes dois grupos está apenas na presença ou não do antro, cavidade existente entre as células da granulosa que são preenchidas pelo líquido antral (Figura 1). A quase totalidade do quantitativo folicular é constituída por folículos pré-antrais, que representam cerca de 90 a 95% do *pool* ovariano (Van den Hurk & Zhao, 2005).

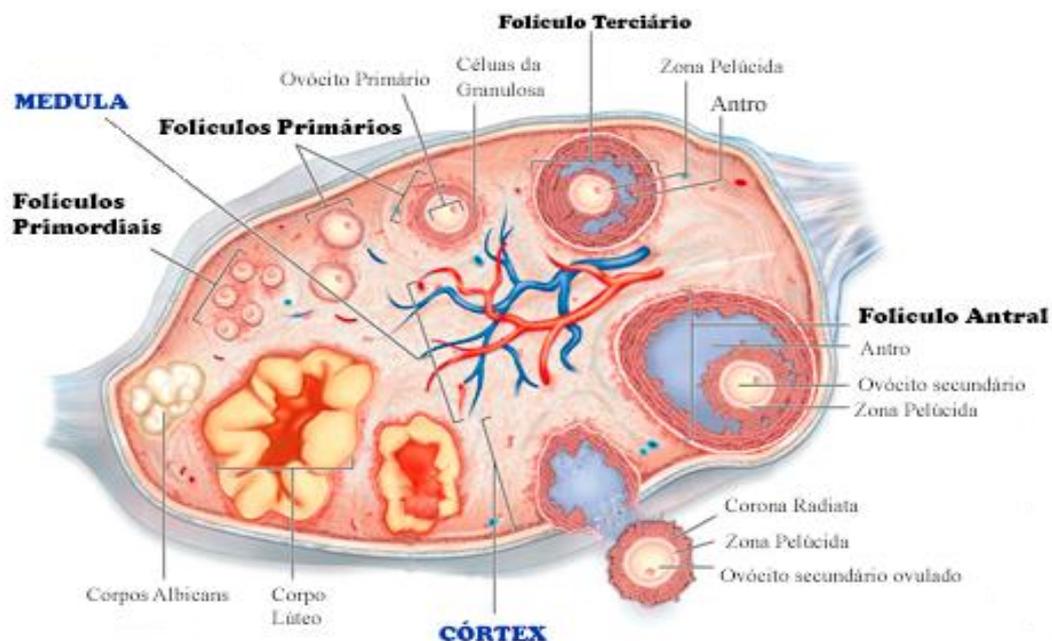


Figura 1. Esquema da foliculogênese (adaptado de Mescher, 2016).

A maior parte desse *pool* de folículos pré-antrais é composta pelos folículos primordiais os quais são formados por uma camada de células da granulosa com formato achatado circundando o ovócito primário. A organização estrutural deste folículo é muito simples, visto que eles passam por um longo período de quiescência. Após iniciado o desenvolvimento, o folículo primordial se desenvolve para o estágio de folículo primário, sendo a principal mudança nesta etapa o crescimento e aumento de volume da única camada de células da granulosa, que antes era achatada e se torna cubóide. Mais adiante, o folículo primário se desenvolve em folículo secundário, que possui como principal diferença a formação de duas ou mais camadas de células da granulosa cuboide ao redor do ovócito (Bristol-Gould & Woodruff, 2006). É também neste estágio que se inicia a diferenciação das células da teca ao redor do folículo e o início da formação da zona pelúcida, que se origina da produção de glicoproteínas que formam uma camada em volta do ovócito com a principal função de proteção (Silva-Santos *et al.*, 2013). Permeando a zona pelúcida há o contato entre as células da camada da granulosa e o ovócito, que é realizado por meio de prolongamentos que terminam em junções do tipo *Gap*. Estas junções permitem as trocas de nutrientes e outras substâncias entre as células (Anderson, *et al.*, 1976; Luciano *et al.*, 2009). Juntamente com o desenvolvimento das células da granulosa, em relação tanto ao volume quanto ao número, há também aumento do volume do ovócito.

Posterior a fase de folículo secundário, é iniciada uma reorganização das células da granulosa dentro deste folículo e há formação do(s) antro(s). Estas estruturas são cavidades, dispostas entre as células da granulosa, preenchidas por um líquido constituído por fatores de crescimento, enzimas, glicoproteínas, gonadotrofinas, esteroides entre outras inúmeras substâncias, secretado pelas próprias células foliculares. Estes folículos

são então denominados como folículos terciários. Posteriormente os folículos terciários se desenvolvem a folículos pré-ovulatórios, que diferentemente de todas as demais fases foliculares anteriores, apresentam uma organização muito bem definida na qual parte das células da granulosa circundam o ovócito (*corona radiata*) e a outra parte migra para a periferia do folículo, formando no centro um grande antro que é preenchido pelo líquido antral. A *corona radiata* é a região responsável por coordenar o desenvolvimento folicular e a maturação do ovócito.

Todas as estruturas acima citadas podem ser melhor observadas na esquematização da Figura 2.

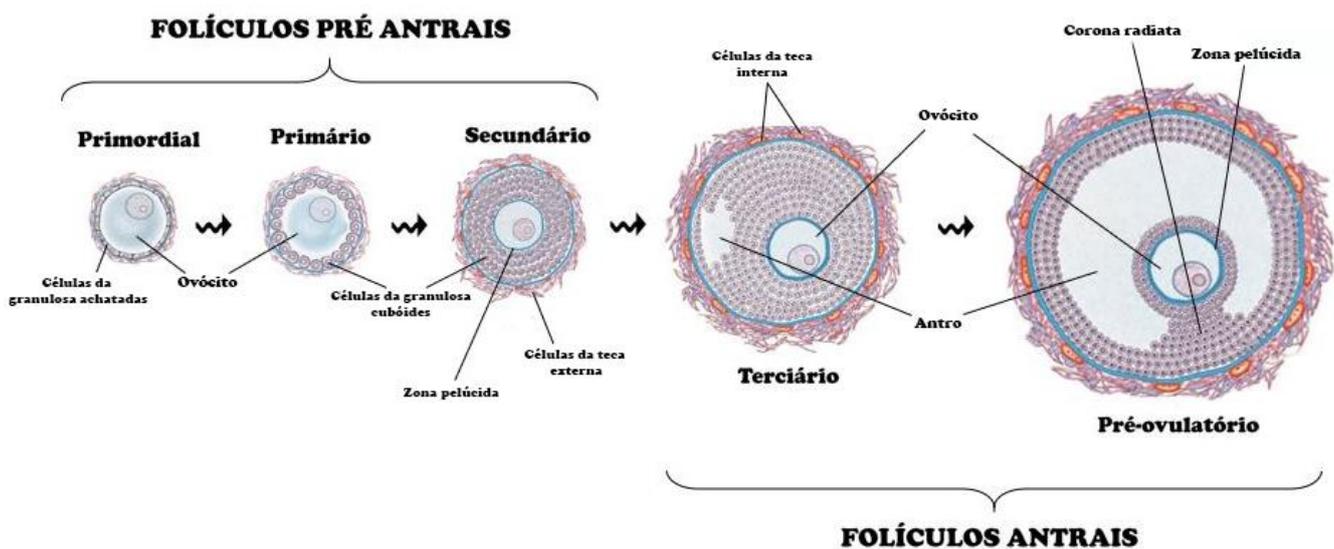


Figura 2. Classificação folicular (adaptado de Bristol-Gould & Woodruff, 2006).

Uma característica única e muito importante, com relação a dinâmica reprodutiva de fêmeas, é que os folículos primordiais constituem o *pool* total de reserva deste órgão, ou seja, todas as fêmeas já nascem com a quantidade finita de folículos que irá ovular durante toda a sua vida fértil. Estima-se que em mulheres este número chega a 2,5 milhões de folículos primordiais (Sarma *et al.*, 2019) e nas demais espécies, apesar de o número ser

menor em relação a humanos, ainda assim é uma quantidade muito elevada, como por exemplo: 235.000 folículos em vaca (Betteridge, 1989), 160.000 folículos em ovelha (Driancourt, 1991), 35.000 folículos em cabra (Lucci *et al.*, 1999), e 38.000 folículos em gatas domésticas (Carrijo *et al.*, 2010).

O *pool* de folículos primordiais permanece quiescente, até o momento em que uma porção é ativada iniciando o desenvolvimento folicular. A ativação dos folículos primordiais e o desenvolvimento folicular até o estágio de folículo secundário ocorre independente dos hormônios gonadotróficos FSH e LH. A partir da formação dos folículos terciários (folículos antrais pequenos), a foliculogênese passa a ser dependente de gonadotrofinas. Inicialmente, um grupo de folículos terciários é recrutado pela ação do FSH e inicia uma fase de desenvolvimento acelerado. Num dado momento, um folículo deste grupo, denominado folículo dominante, começa a secretar mais estrógeno que os demais, induzindo uma maior proliferação celular e o aumento da sensibilidade folicular ao hormônio LH. Simultaneamente com a elevação dos níveis de estrógeno, os folículos passam a secretar mais inibina, e juntos, estes hormônios propiciam a retroalimentação negativa no hipotálamo e na hipófise anterior, promovendo a redução de FSH. Esta diminuição faz com que os folículos menos desenvolvidos ainda dependentes de FSH não consigam continuar seu desenvolvimento e entrem em atresia, resultando na continuidade de crescimento apenas do folículo dominante, que possui mais receptores para o LH ainda secretado. O folículo dominante continua o seu desenvolvimento atingindo ao final o estágio de folículo maduro, o qual irá ovular caso haja um pico pré-ovulatório de LH. Com todo esse processo atrésico, apenas 0,1% do total folicular consegue chegar à ovulação. Embora a atresia folicular afete todos os estágios do desenvolvimento folicular, a maior incidência de degeneração é observada na

fase dependente de gonadotrofinas, ou seja, no estágio inicial do folículo antral (Chun *et al.*, 1996; Kaipia & Hsueh, 1997; Curi & Procopio, 2009).

No entanto, na tentativa de minimizar a perda de tantos folículos por causa da atresia, a criopreservação é a técnica de escolha para preservação do tecido ovariano. Amplamente utilizada em trabalhos com finalidade de restauração da fertilidade em fêmeas, esta biotecnologia possibilita o congelamento do tecido como um todo ou de células germinativas para utilizações futuras.

CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

A possibilidade de preservação do tecido ovariano tem sido bastante adotada em mulheres com câncer, devido aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia serem extremamente agressivos ao sistema reprodutor feminino e poderem levar à infertilidade. Antes do tratamento quimioterápico, é realizada a retirada de um dos ovários e sua criopreservação. Após a remissão total da doença, o descongelamento do órgão e seu transplante para o local de origem pode ser realizado promovendo o reestabelecimento das funções normais. Entre os anos de 2004 e 2005 foram relatados os dois primeiros nascimentos de bebês vivos advindos desta metodologia de congelamento dos ovários e retransplante em mulher após a remissão do câncer (Donnez *et al.*, 2004; Meirow *et al.*, 2005). Com uma taxa de sucesso de aproximadamente 30%, o protocolo de criopreservação e autotransplante ganhou visibilidade e até hoje é realizado mundialmente, sendo que, no ano de 2015, já haviam relatados mais de 86 nascimentos oriundos dessa técnica (Gosden *et al.*, 2000; Oktay *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001; Wininger & Kort, 2002; Hovatta, 2005; Donnez *et al.*, 2006; Tao & Valle, 2008; Anderson *et al.*, 2008; Donnez *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2012; Dolmans *et al.*, 2013; Stern *et al.*, 2013; Donnez & Dolmans, 2014;; Donnez e Dolmans, 2015; Meirow *et al.*,

2016; Van der Ven *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Jensen *et al.*, 2017). Atualmente o número de nascimentos relatados na literatura científica já chega a 150 (Lakhoo *et al.*, 2019).

O sucesso de trabalhos com criopreservação de tecido ovariano não se limitam apenas a humanos, mas também em diversas outras espécies domésticas como por exemplo: camundongas (Cleary *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015), ratas (Sugimoto *et al.*, 2000; Milenkovic *et al.*, 2012), porcas (Kaneko *et al.*, 2003), éguas (Tharasanit *et al.*, 2006; Leon *et al.*, 2012), vacas (Lucci *et al.*, 2004; Celestino *et al.*, 2008, 2010), ovelhas (Salle *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2007; Faustino *et al.*, 2010), cabras (Santos *et al.*, 2007, 2009), cadelas (Ishijima *et al.*, 2006; Ackermann *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2016) e gatas (Bosch *et al.*, 2004; Jewgenow & Paris, 2006; Lima *et al.*, 2006; Luvoni *et al.*, 2006, 2012; Tanpradit *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2018; Leonel *et al.*, 2018b).

Outros estudos com a técnica de criopreservação também relataram sucesso em animais selvagens de diversas espécies, como: elefantes (Gunasena *et al.*, 1998), marsupiais (Cleary *et al.*, 2003; Czarny & Rodger, 2010), cervos (Bainbridge *et al.*, 1999), baleias (Asada *et al.*, 2000; Fujihira *et al.*, 2006), primatas não humanos (Schnorr *et al.* 2002; Yeoman *et al.* 2005; Amorim *et al.*, 2013) e felinos selvagens (Crichton *et al.*, 2003; Jewgenow *et al.*, 2011; Wiedemann *et al.*, 2012).

A preservação a longo prazo do material genético, independentemente da espécie em estudo, se dá pela criopreservação, uma técnica bastante utilizada no congelamento de gametas, embriões, células somáticas, tecidos ou até mesmo órgãos inteiros. Esta técnica consiste basicamente na interrupção do funcionamento biológico do material através de sua exposição a baixíssimas temperaturas, sendo armazenados em botijões de nitrogênio

líquido a uma temperatura de -196° C ou estando em contato com vapor de nitrogênio que possui a temperatura de -150° C (McGee Jr & Martin, 1962).

A baixa temperatura promove a paralisação dos processos metabólicos celulares fundamentais, em especial a interrupção de reações enzimáticas e o processo de apoptose celular, o que faz com que o material possa ser armazenado por tempo indeterminado nestas condições, sendo necessário apenas a manutenção dos níveis ideais de nitrogênio no botijão. A capacidade de sobrevivência do material biológico ao processo de criopreservação depende diretamente da tolerância do tecido aos agentes crioprotetores utilizados, do método de congelamento utilizado, bem como de um correto resfriamento e descongelamento (Elmoazzen *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009).

Os crioprotetores são substâncias orgânicas adicionadas ao meio de congelamento e responsáveis pela prevenção da formação de cristais de gelo no processo de congelamento. De forma geral, os crioprotetores são classificados como intracelulares ou extracelulares (Mazur, 1984). Os intracelulares são substâncias de baixo peso molecular que penetram o interior das células provocando a diminuição da temperatura de congelamento intracelular e desta forma prevenindo a formação de cristais maiores de gelo no citoplasma celular. Dentre os mais utilizados estão o Dimetilsulfóxido (DMSO), o Propanodiol (PROH), o Etileno glicol (EG) e o Glicerol (GLI) (Acker *et al.*, 2001). Essas substâncias atuam de diferentes formas, como: a) interagindo com a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (Dobrinsky, 1996); b) reduzindo o ponto de congelamento da solução; c) aumentando a viscosidade do meio; (Santos *et al.*, 2007); d) substituindo parcialmente as moléculas de água das células (Rall & Fahy, 1985) e e) se ligando ao hidrogênio da água presente no meio intracelular (Jain & Paulson, 2006).

Em contrapartida, os crioprotetores extracelulares são substâncias com elevado peso molecular e por isso não possuem a capacidade de ultrapassar a membrana celular, no entanto exercem proteção ao formarem uma barreira menos permeável originada de sua ligação com a membrana celular. Além disso, agem reduzindo o choque osmótico, controlando a entrada de água na célula (Shaw *et al.*, 2000) e promovendo uma desidratação celular mais equilibrada antes do congelamento. Porém, mesmo com a necessária utilização de crioprotetores, intra ou extracelulares é de fundamental importância considerar a toxicidade inerente a cada tipo de crioprotetor, sendo este um fator limitante para o sucesso da criopreservação. Desta forma a escolha do melhor crioprotetor, bem como a sua concentração, é dependente das peculiaridades do material a ser congelado (Hovatta, 2005).

Outro ponto importante a ser considerado é a escolha da forma de criopreservação mais adequada ao tipo de material que se está criopreservando. Dentre elas se destacam a vitrificação e o congelamento clássico. A vitrificação é um método que envolve um processo muito rápido onde a temperatura é reduzida drasticamente pois se dá pela imersão do material diretamente em nitrogênio líquido, promovendo a formação de um estado vítreo no tecido. A vantagem da vitrificação é que a técnica possui baixo custo de execução, além de não ser necessário a utilização de equipamentos de alto custo, somente o uso de uma pequena quantidade de nitrogênio líquido. No entanto, a principal desvantagem é o curto tempo para a distribuição homogênea dos crioprotectores no material durante o congelamento, desta forma, em tecidos complexos, há a dificuldade em alcançar a taxa de resfriamento ideal tão rapidamente, levando a uma vitrificação incompleta e, portanto, danificando o tecido vitrificado. Outro fato a ser considerado é a necessidade do uso de altas concentrações de crioprotetores na técnica de vitrificação,

sendo que quanto maior a concentração, maior a toxicidade destes crioprotetores às células (Dittrich *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008).

Já o congelamento clássico, que é considerado o método convencional de criopreservação para tecido ovariano, preserva melhor não somente a arquitetura celular do tecido ovarino, mas principalmente os folículos inseridos no estroma, sendo essa a principal característica a ser considerada (Gandolfi *et al.*, 2006). O protocolo de congelamento clássico envolve a queda controlada e lenta da temperatura e o uso de baixas concentrações de crioprotetores. Inicialmente, o tecido deve passar por um período de equilíbrio imerso em uma solução de crioprotetores. Este momento inicial consiste no tempo essencial para a difusão dos agentes crioprotetores em todo o material a ser congelado. Usualmente, são utilizadas concentrações que não ultrapassam 1,5 M ou 10% dos crioprotetores selecionados. Após a penetração dos crioprotetores no material é dado início ao congelamento propriamente dito. Nesta etapa o material imerso na solução crioprotetora dentro de criotubos é colocado em uma máquina de congelamento programável, que realizará o decaimento gradual da temperatura de acordo com as curvas de congelamento pré-estabelecidas. Normalmente, são programadas duas rampas distintas de congelamento, com um platô entre elas no qual é realizada a indução da cristalização do meio crioprotetor. A primeira rampa de resfriamento irá promover a diminuição da temperatura em 1 a 2 °C/min da temperatura inicial de equilíbrio (10 °C) até -7 °C, quando haverá o platô para a indução da cristalização (*seeding*) (Lima *et al.*, 2006). Este processo é muitas vezes realizado manualmente através do toque de um objeto metálico, pré-resfriado em nitrogênio líquido (-196 °C), diretamente na parede do criotubo ou nas palhetas, promovendo assim o congelamento instantâneo do meio crioprotetor no qual o material está imerso (Fabbri *et al.*, 2000). Em seguida, a máquina

de congelamento programada roda a segunda curva, que é a mais lenta, na qual há a diminuição da temperatura em torno de 0,2 °C a 0,5 °C/min (Tanpradit & Chatdarong, 2011).

Finalizado o processo de criopreservação, independentemente do método utilizado, a amostra é armazenada no botijão de nitrogênio líquido, a – 196°C. Esta temperatura é suficiente para paralisar e manter inerte todo o metabolismo celular e por este motivo a amostra pode ficar armazenada, nestas condições, por tempo indeterminado. Estudos sobre a influência do tempo de armazenamento mostraram que o processo de criopreservação, e não o tempo de estocagem, exercem os principais efeitos deletérios sobre as células (Schmidt *et al.*, 2005).

O descongelamento do material é uma etapa também muito crítica, uma vez que do mesmo modo pode promover danos. O reaquecimento do material pode provocar lesões celulares devido ao processo de recristalização, ou até mesmo ao crescimento de microcristais de gelo que provocam à ruptura das estruturas celulares. Além disso, a presença dos crioprotetores no material em temperaturas maiores pode aumentar a toxicidade intrínseca do agente crioprotetivo gerando dano ao tecido e as células (Santos *et al.*, 2007). Desta forma é muito importante a remoção completa dos crioprotetores para a obtenção de um material bem preservado e apto ao desenvolvimento.

TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

Após a criopreservação o material pode ser designado para o desenvolvimento *in vitro*, para os transplantes ou até mesmo uma combinação de ambas as técnicas. Para tecido ovariano, a melhor alternativa é o transplante, pois estabelece uma tentativa de desenvolvimento folicular “*in vivo*”. A principal vantagem do transplante no caso deste tipo de tecido especificamente é a interação com os componentes biológicos do animal

como hormônios, fatores de crescimento e substâncias fundamentais ao desenvolvimento ideal do tecido ovariano, e em especial do folículo. Ainda não se sabe muito bem quais são ou como funcionam esses fatores que influenciam no sucesso do desenvolvimento celular e por isso o estabelecimento *in vivo*, só proporcionado pelo transplante, é ainda o mais efetivo e importante.

Os transplantes consistem basicamente na transferência de células, tecidos ou órgãos de um doador para um indivíduo receptor, seja ele mesmo ou outro indivíduo, tendo como principal objetivo a restauração total de sua função original após a implantação.

No que tange à relação filogenética entre doador e receptor, os transplantes podem ser classificados em:

- Autotransplante: quando o doador e receptor do enxerto são o mesmo indivíduo;
- Isotransplante: quando o doador e o receptor, além de pertencerem à mesma espécie, também são geneticamente semelhantes;
- Alotransplante: quando o doador e o receptor do enxerto pertencem à mesma espécie, porém são geneticamente distintos;
- Xenotransplante: quando tanto o doador, quanto o receptor pertencem a espécies diferentes.

Outra forma de classificação é quanto ao local de realização do transplante. Desta forma, eles podem ser classificados em:

- Ortotópico: quando a localização do enxerto é em posição anatômica muito próxima ou igual à de origem;
- Heterotópico: quando o enxerto é realizado em posições anatômica distinta da original.

Mesmo que o início de estudos preliminares com transplante de tecido ovariano tenha se dado em meados da década 40, os experimentos com transplantes de tecido ovariano humano começaram apenas na década de 90, com estudos de xenotransplante de tecido ovarino para camundongos imunodeficientes (Weissman *et al.*, 1999). Alguns anos mais tarde os estudos com transplantes em animais de laboratório começaram a se difundir e Aubard e colaboradores (2001) conseguiram descrever com sucesso a efetividade de transplantes em humanos após tratamento quimioterápico.

Em humanos, é bem estabelecida a utilização de transplantes autólogos para a manutenção da fertilidade de mulheres que enfrentam o câncer e seus respectivos tratamentos, como a quimioterapia e a radioterapia. Neste sentido, inúmeros são os trabalhos bem-sucedidos que comprovam o reestabelecimento total da fertilidade das mulheres que tiveram seus ovários retransplantados ao local de origem (Ernst *et al.*, 2010; Dolmans *et al.*, 2013). Até o momento já foram relatados 150 nascimentos de bebês vivos advindos de ovários retransplantados (Lakhoo *et al.*, 2019).

O relato de êxito em transplantes não se limita somente a humanos (Donnez *et al.*, 2005, 2006, 2011, 2013, 2014), mas também em outros animais, como por exemplo em ovinos (Gosden *et al.*, 1994; Denschlag *et al.*, 2005), bovinos (Kagawa *et al.*, 2009), primatas (Scalercio *et al.*, 2015), coelhos (Petroianu *et al.*, 2004), camundongos (Wang *et al.*, 2013), caprinos (Santos *et al.*, 2009), cadelas (Terazono *et al.*, 2012), felinos selvagens (Wiedemann *et al.*, 2012) e gatas (Bosch *et al.*, 2004; Demirel *et al.*, 2018; Leonel *et al.*, 2018b; Vilela *et al.*, 2019).

Mais especificamente no contexto de transplantes em felinos, Bosch e colaboradores, em 2004, iniciaram os estudos com xenotransplante de tecido ovariano criopreservado de gatas para a cápsula renal de camundongos imunodeficientes (NOD SCID). O intuito foi

avaliar a sobrevivência folicular no córtex ovariano após a criopreservação e transplante, além de avaliar os efeitos do tratamento com gonadotrofinas exógenas no desenvolvimento do tecido transplantado. Diante dos resultados foi possível concluir que o tecido de córtex ovariano criopreservado não somente sobreviveu ao xenotransplante e estava bem vascularizado, como também possuía folículos aptos a se desenvolverem a estágios antrais, apresentando 10% de folículos morfologicamente normais (MN) após 68 dias.

Anos mais tarde, Crestana e colaboradores (2006) realizaram um estudo com autotransplante de tecido ovariano fresco em gatas domésticas (*Felis catus*). Apenas um ovário foi seccionado e autotransplantados para o tecido subcutâneo das gatas e o remanescente permaneceu intacto. Transcorridos quatro meses (120 dias), retirou-se os transplantes e o ovário intacto para serem avaliados em microscopia de luz. Porém, os implantes ovarianos recuperados continham apenas folículos primordiais e primários, com fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular.

Trabalhando com felinos selvagens, Wiedemann e colaboradores (2012) investigaram a viabilidade de preservação de células germinativas de ovários de leões (*Panthera leo*). Neste estudo parte do córtex ovariano foi fragmentado e submetido à criopreservação por congelamento lento. Posteriormente, os fragmentos de córtex ovariano descongelados foram xenotransplantados para o tecido subcutâneo de camundongos imunodeficientes, previamente ovariectomizados, e acompanhadas por 28 dias. O grupo obteve como resultados que após o xenotransplante o número de folículos primordiais decaiu drasticamente, havendo a sobrevivência folicular de somente ~20% após 28 dias, sendo que os folículos primordiais remanescentes possuíam suas células proliferativas. Desta forma, a conclusão dos autores foi que folículos antrais podem ser obtidos após longo

período de xenotransplantação, e que se unida a técnica de maturação *in vitro*, poderia potencialmente representar uma maneira eficaz de salvar espécies de felídeos ameaçadas de extinção.

Com foco em trabalhos com felinos domésticos (gatas), há estudos prévios do nosso grupo, no qual Leonel e colaboradores (2018b) estabeleceram um protocolo de transplantes autólogos de tecidos ovarianos frescos para o tecido subcutâneo do dorso das gatas. Esta localização foi escolhida por não acumular muito tecido adiposo, o que facilita a identificação dos implantes para as análises ultrassonográficas e no momento das retiradas. Neste estudo foram encontradas todas as classes foliculares (primordiais, primários e secundários) em todos os dias (7, 14, 28, 49 e 63) pós-transplante. Além disso, nos dias 28, 49 e 63 foram encontrados folículos antrais em todos os animais (em momentos diferentes), bem como folículos luteinizados. Alguns animais também apresentaram o comportamento de cio durante o tempo de transplante. Picos hormonais correlacionados a estruturas ultrassonográficas encontradas no material também foram observados e coincidiram com os achados histológicos dos folículos antrais citados.

Com material criopreservado há apenas um estudo, também desenvolvido por nosso grupo, com transplante autólogo de tecido ovariano congelado (Vilela *et al.*, 2019). Vilela e colaboradores constataram que já nos sete primeiros dias pós-transplante há uma depleção drástica na população folicular do tecido ovariano previamente congelado, contrariando assim as expectativas advindas do estudo com tecido fresco (Leonel *et al.*, 2018b).

As hipóteses levantadas para estes resultados são as de que as crioinjúrias inerentes ao processo de congelamento somadas aos problemas oriundos dos danos típicos da

isquemia do tecido ovariano recém transplantado levaram a grande morte folicular nos sete primeiros dias pós-transplante.

ISQUEMIA

A isquemia é caracterizada por um tempo, longo ou curto, em que o tecido fica sem aporte sanguíneo adequado, promovendo a morte celular do tecido, gerando o acúmulo de metabólitos tóxicos celulares e radicais livres no interior das células. O período no qual o tecido transplantado fica sem aporte sanguíneo é crítico para o sucesso do transplante, visto que a dimensão da apoptose e necrose ocasionadas pela falta de oxigenação e de nutrientes celulares é determinante para o consequente reestabelecimento celular do tecido após a reperfusão no enxerto. Para minimizar os danos é necessário que o tecido transplantado recupere o mais rápido possível o suprimento vascular para que haja o descarte de metabólitos celulares nocivos ao tecido. Os danos celulares ocasionados no momento da reperfusão são criados por inúmeros fatores, mas principalmente pelo acúmulo de radicais livres que são rapidamente gerados no tecido em hipóxia (Zimmerman & Granger, 1994; Boyle *et al.*, 1997; Anaya-prado *et al.*, 2002).

Experimentos com autotransplante heterotópico de tecido ovariano para a cápsula renal de camundongos constataram que de 2 a 12 horas imediatamente após o enxerto já é possível observar a degradação de RNAs essenciais para a sobrevivência celular, ou seja, a morte do tecido se estabelece muito rapidamente sendo necessário que a revascularização ocorra o mais rápido possível para tentar minimizar os efeitos deletérios (Liu *et al.*, 2002).

As lesões resultantes da isquemia tecidual são responsáveis por uma diminuição drástica no número de folículos dos transplantes. A junção das crioinjúrias durante o processo de congelamento e das lesões isquêmicas após o transplante do tecido ovariano

é a principal causa de comprometimento na qualidade do tecido ovariano transplantado. Até a atualidade, poucos estudos trabalharam na investigação de qual dos dois processos (crioinjurias ou isquemia) é o mais prejudicial ao tecido. A conclusão destes trabalhos foi que de fato os processos isquêmicos promovem danos mais sérios ao tecido ovariano do que o processo de congelamento, fazendo com que a perda folicular seja irreversível (Nisolle *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Amorim *et al.*, 2011; David *et al.*, 2011, 2012; Jafarabadi *et al.*, 2015).

Newton e colaboradores demonstraram já em 1998 que pelo menos 25% da população folicular sofre apoptose devido ao tempo de isquemia em xeno enxertos. Em concordância com o relatado por Kim e colaboradores (2004), que afirmam que o córtex ovariano consegue tolerar com danos mínimos apenas três horas de isquemia. Igualmente relatado por Israely e colaboradores (2003), os quais afirmaram que o dano isquêmico ocorrido nas primeiras 24-48 horas após o enxerto foram cruciais para a maior perda dos folículos morfolologicamente normais (MN), visto que são nessas primeiras horas que ocorrem os principais danos oxidativos promovidos pelas lesões de isquemia-reperusão. Nisolle e colaboradores (2000), trabalhando com tecido ovariano humano fresco e criopreservado transplantados para o tecido subcutâneo e o peritônio, constataram que a isquemia após o transplante se mostrou mais prejudicial ao estroma ovariano do que as lesões do congelamento. Porém, essa conclusão foi feita sem a investigação dos efeitos das lesões isquêmicas iniciais uma vez que os fragmentos transplantados foram recuperados apenas 24 dias após o xeno enxerto. Da mesma forma, Liu *et al.* (2002) e Jafarabadi *et al.* (2014) também concluíram que a isquemia foi de fato mais prejudicial ao tecido ovariano criopreservado, porém a recuperação dos fragmentos nesse estudo foi aos 14 dias pós-transplante. O pouco período em que o estroma ovariano fica em hipóxia promove

rapidamente danos nas células foliculares, muitas vezes irreversíveis (Kim *et al.*, 2004). Estima-se que aproximadamente 25% dos folículos primordiais de transplantes de tecido ovariano criopreservado em camundongos são perdidos por conta das lesões isquêmicas (Lee *et al.*, 2015a).

Mesmo que o tecido ovariano possua diversos mecanismos e vias moleculares que agem como fatores angiogênicos, o processo de angiogênese leva algum tempo para revascularizar uma pequena faixa de córtex ovariano, sendo ele variável de acordo com a espécie (Aubard *et al.*, 1999). Trabalhos iniciais demonstraram que a revascularização de tecido ovarino autotransplantado estava profusa após 48 horas do enxerto em ratos (Dissen *et al.*, 1994), ou seja, os danos isquêmicos ao qual o tecido transplantado é exposto são crescentes até no mínimo 48 horas após o corte do aporte sanguíneo local. Em contrapartida, para humanos, esse tempo de revascularização é consideravelmente maior, sendo de quase 5 dias para a restauração vascular do transplante (revisado por Torrents *et al.*, 2003; Van Eyck *et al.*, 2010). Ainda mais demorada é a revascularização em ovelhas, a qual é de aproximadamente 7 dias (Gosden *et al.*, 1994). O tempo de revascularização de transplantes de tecido ovariano em gatas não é conhecido.

Na tentativa de reverter ou contornar os danos causados pelas injúrias isquêmicas, inúmeros estudos demonstram o sucesso na melhora da revascularização pós transplante com a utilização de agentes químicos antioxidantes e/ou hormônios, tais como o gonodotrofinas da menopausa humana (HMG) (Wang *et al.*, 2012), Hormônio Folículo-estimulante recombinante (rFSH) (Rodrigues *et al.*, 2010), Gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Macêdo *et al.*, 2018), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (Hoeben *et al.*, 2004) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (bFGF) (Wang *et al.*, 2013;

Kang *et al.*, 2015) , vitaminas E, (Nugent *et al.*, 1998) e C, Verapamil e Manitol (Sagoz *et al.*, 2002)

Uma alternativa eficaz já utilizada em diferentes tipos de transplantes é o uso de fármacos como indutores diretos na revascularização mais rápida no tecido implantado. Neste contexto, a literatura científica tem demonstrado que as estatinas possuem resultados promissores de seus efeitos pró-angiogênicos, modulando diretamente a angiogênese em tecidos transplantados (Weis *et al.*, 2002; Lee et al, 2015a).

SINVASTATINA

Dentro do grupo das estatinas a sinvastatina é um fármaco com grande potencial a ser introduzido na rotina de transplantes de tecido ovariano, devido ao sucesso já existente em transplantes de outros órgãos (Tuuminen *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2018; Nykanen *et al.*, 2019). A sinvastatina é um medicamento com ação principal na diminuição dos níveis de colesterol sistêmico, porém foram descobertos efeitos colaterais promissores como os efeitos angiogênicos, anti-inflamatórios e de inibição de apoptose. Essas características são muito interessantes para acelerar a revascularização de tecidos recém transplantados (Nykanena *et al.*, 2013). Um outro papel importante da sinvastatina é a ação protetiva por meio de sua ação direta na redução do estresse oxidativo celular promovido pela reação imunológica local no transplante (Russo *et al.*, 2012).

A administração deste fármaco já têm se mostrado eficaz para a revascularização em diversos tipos de órgãos transplantados, tais como pulmão (Naidu *et al.*, 2003), coração (Wolfrum *et al.*, 2004; Tuuminen *et al.*, 2011; Nykanena *et al.*, 2013), fígado (Gracia-Sancho *et al.*, 2013) e rim (Teshiman *et al.*, 2012). Mais especificamente em transplantes de tecido ovariano, Lee e colaboradores (2015a) demonstraram os efeitos benéficos da sinvastatina por meio da melhora da revascularização e conseqüentemente o aumento da

sobrevivência folicular após 21 dias de tecido ovariano criopreservado autotransplantado para a cápsula renal de camundongos. Desta forma, ficou claro que a sinvastatina parece ter efeitos diretos capazes de minimizar os danos isquêmicos também em transplantes de tecido ovariano.

JUSTIFICATIVA

Os trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa conseguiram demonstrar o desenvolvimento folicular após transplante de tecido ovariano fresco de gatas (Leonel *et al.*, 2018a). No entanto, quando tecido ovariano previamente criopreservado foi submetido ao mesmo procedimento de transplante o desenvolvimento folicular foi muito limitado, sendo observada uma grande perda da população folicular já aos sete dias pós-transplante (Vilela *et al.*, 2019).

Diante dos dados a hipótese levantada é de que as lesões isquêmicas no tecido transplantando são um motivo importante para o sucesso limitado dos transplantes de tecido ovariano previamente congelados. No entanto, é preciso conhecer o tempo necessário para que ocorra a revascularização dos transplantes de tecido ovariano em gatas.

Além disso, é proposto pela comunidade científica a utilização de fármacos que auxiliam na reperfusão e neoangiogênese do tecido transplantado, promovendo assim a revascularização mais rápida do tecido e maior sobrevivência folicular. Esta estratégia já provou favorecer transplantes de tecido ovariano em camundongos (Lee *et al.*, 2015a), mas em gatas não há estudos. Assim sendo, testar a sinvastatina pode ser uma estratégia válida e muito promissora para os estudos nesta linha de pesquisa.

O presente estudo foi provado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), por meio do documento de número 66718/2016.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é avaliar o tempo necessário para que ocorra a revascularização após o implante autólogo de tecido ovariano no tecido subcutâneo de gatas, bem como analisar a ação da sinvastatina no transplante de tecido ovariano de gatas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o tempo de revascularização do tecido ovariano de gatas fresco e criopreservados autotransplantado para o tecido subcutâneo;
- Analisar o desenvolvimento folicular em tecido ovariano de gatas fresco e criopreservados durante os seis primeiros dias pós-transplante;
- Avaliar a ação da sinvastatina no tecido ovariano de gatas criopreservado e transplantado;
- Avaliar a ação da sinvastatina no desenvolvimento folicular após autotransplante do tecido ovariano criopreservados para o tecido subcutâneo.

REFERÊNCIAS

- Acker JP, Elliott JAW and McGann LE (2001) Intercellular Ice Propagation: Experimental Evidence for Ice Growth through Membrane Pores. *Biophys J*, 81(3): 1389-97. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75794-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75794-3)
- Ackermann CL, Asa CS, Krisher R, Bauman K, Casey S and Lopes MD (2016) Evaluation of follicular growth and tissue viability in vitrified/ warmed domestic dog ovaries after in vitro culture. *Reprod Domest Anim*, 51 (3): 1–5. <https://doi.org/10.1111/rda.12823>
- Aerts JMJ and Bols PEJ (2010) Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim*, 45(1):171–79. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>
- Amorim CA, David A, Dolmans MM, Camboni A, Donnez J and Van Langendonck A (2011) Impact of freezing and thawing of human ovarian tissue on follicular growth after long-term xenotransplantation. *J Assist Reprod Genet*, 28:1157–65. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9672-z>
- Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A, Donnez J and Langendonck AV (2012) Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 98(5): 1291-98. <https://doi.org/10.1093/humrep/det103>
- Amorim C A, Jacobs S, Devireddy RV, Langendonck AV, Vanacker J, Jaeger J, Luyckx V, Donnez J and Dolmans MM (2013) Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Hum Reprod*, 28(8): 2146–56. <https://doi.org/10.1093/humrep/det103>
- Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB and Ward PA (2002) Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surgical Research*, 105:248–58. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6385>
- Anderson RA and Albertini DF (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biology*, 71:680-86. <https://doi.org/10.1083/jcb.71.2.680>
- Anderson RA, Wallace WHB and Baird DT (2008) Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. *Reproduction Review*, 136: 681–89.
- Anderson RA, Wallace WHB and Telfer EE (2017) Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum. Reprod. Open*, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1093/hropen/hox001>
- Asada M, Horii M, Mogoe T, Fukui Y, Ishikawa H and Ohsumi S (2000) In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved Minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) follicular oocytes. *Biology of Reproduction* 62: 253–59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.253>
- Aubard Y, Piver P, Cognié Y, Fermeaux V, Poulin N and Driancourt MA (1999) Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Hum Reprod*, 14(8): 2149-54. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.8.2149>

- Bainbridge DRJ, Catt SL, Evans G and Jabbour HN (1999) Successful in vitro fertilization of in vivo matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elanhus*). *Theriogenology*, 51:891-98. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00036-9)
- Barnes SA, Teare JA, Staaden S, Metrione L and Penfold LM (2015) Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*). *Gen Comp Endocrinol*, Pp. 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.09.012>
- Beisiegel BM, Morato RG, Paula RC and Morato RLG (2013) Avaliação do estado de conservação dos carnívoros. *Biodiversidade Brasileira*, 3(1): 54-55.
- Betteridge KJ (1989) The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Oocyte Fertilization and Embryo Micromanipulation*, 92-100. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04690.x>
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Winingger JD, Massey JB, Lamb SV and Bracketta BG (2004) Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, 61: 581-94. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00244-9)
- Boyle EM, Jr MD, Pohlman TH, Cornejo CJ and Verrier ED (1997) Ischemia-Reperfusion Injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 64: 24-30. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(97\)00958-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(97)00958-2)
- Bristol-Gould S and Woodruff TK (2006) Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66: 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.019>
- Brito DCC, Domingues SFS, Rodrigues APR, Maside C, Lunardi FO, Wu X, Figueiredo JR, Pieczarka JC and Santos RR (2018) Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. *Theriogenology* 111: 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.015>
- Brown JL (2006) Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology* 66: 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.011>
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Wimalasena J, Ayala ME and Dominguez R (2005) Oogenesis in adult mammals, including humans. *Endocrine*, 26(3): 301-16. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:301>
- Carrijo Jr OA, Marinho APS, Campos AA, Amorim CA, Bão SN and Lucci CM (2010) Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in Queens. *Cells Tissues Organs*, 191:152-160. <https://doi.org/10.1159/000225935>
- Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Bão SN, Rodrigues APR, Silva JRV and Figueiredo JR (2008) Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, 108: 309-318. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.016>
- Celestino JJH, Santos RR, Melo MAP, Rodrigues APR and Figueiredo JR (2010) Vitrification of bovine ovarian tissue by the solid-surface by vitrification Method. *Biopreserv Biobank*, 8(4): 219-21. <https://doi.org/10.1089/bio.2010.0019>
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E and Hsueh AJW (1996) Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle-Stimulating Hormone

- as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4): 1447-56. <https://doi.org/10.1210/endo.137.4.8625923>
- Clavijo and Ramírez (2009) Taxonomy, distribution and conservation state of South American felines: monographic revision. *In Bol Cient Mus Hist Nat*, 13(2): 43 – 60.
- Cleary M, Snow M, Paris M, Shaw J, Cox SL and Jenkin G (2001) Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an ischemic environment. *Cryobiology*, 42: 121–133. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2315>
- Cleary M, Paris MCJ, Shaw J, Jenkin G and Trounson (2003) Effect of ovariectomy and graft position on cryopreserved common wombat (*Vombatus ursinus*) ovarian tissue following xenografting to nude mice. *Reprod Fertil Dev*, 15: 333-42. <https://doi.org/10.1071/RD03063>
- Cohen Y, Dafni H, Avni R, Fellus L, Bochner F, Rotkopf R, Raz T, Benjamin LE, Walsh K and Neeman M (2016) Genetic and pharmacological modulation of Akt1 for Improving ovarian graft revascularization in a mouse model. *Biology of reproduction*, 94(1):14, 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131987>
- Crestana FM (2006) Autotransplantação de ovário no subcutâneo e consumo folicular em gatas domésticas (*felis catus*) (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.
- Crichton E, Bedows E, Miller-Lindholm AK, Baldwin DM, Armstrong DL, Graham LH, Ford JJ, Gjørret JO, Hyttel P, Pope CEG and Loskutoff NM (2003) Efficacy of porcine gonadotropins for repeated stimulation of ovarian activity for oocyte retrieval and *in vitro* embryo production and cryopreservation in Siberian Tigers (*Panthera tigris altaica*). *Biology of reproduction*, 68: 105-13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002204>
- Curi R and Procopio J. Sistema Reprodutor Feminino. Guanabara KOOGAN S.A. Fisiologia Básica. Edição 1. Rio de Janeiro, 2009. P 806-827.
- Czarny NA and Rodger JC (2010) Cryobiology Vitrification as a method for genome resource banking oocytes from the endangered Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Cryobiology* 60:322-25. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.007>
- David A, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J and Amorim CA (2011) Immunohistochemical localization of growth factors after cryopreservation and 3 weeks xenotransplantation of human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 95(4):1241-46 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.007>
- David A, Van Langendonck A, Gilliaux S, Dolmans MM, Donnez J and Amorim CA (2012) Effect of cryopreservation and transplantation on the expression of kit ligand and anti-Mullerian hormone in human ovarian tissue. *Human Reproduction*, 27(4): 1088–95. <https://doi.org/10.1093/humrep/des013>
- Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME and Ojeda SR (1994) Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, 134(3): 1146-54. <https://doi.org/10.1210/en.134.3.1146>

- Dittrich R, Mueller A, Hoffmann I, Beckmann MW and Maltaris T (2007) Cryopreservation of complex systems: slow freezing has not had its day yet. *Rejuv Res*, 10(1):101–102. <https://doi.org/10.1089/rej.2006.9095>
- Dobrinsky JR (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45:17-26. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00351-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00351-8)
- Dolmans MM, Jadoul P, Gilliaux S, Amorim CA, Luyckx V, Squifflet J, Donnez J and Van Langendonckt A (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *J Assist Reprod Genet*. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9952-x>
- Dolmans MM, Jadoul P, Gilliaux S, Amorim CA, Luyckx V, Squifflet J, Donnez J and Van Langendonckt A (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. *J Assist Reprod Genet*. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9952-x>
- Donnez J, Squifflet J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Jadoul P and Van Langendonckt A (2005) Orthotopic transplantation of fresh ovarian cortex: a report of two cases. *Fertil Steril*, 84(4): 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.06.011>
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A, Demylle D and Dolmans MM (2006) Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Up*, 12(5): 519-35. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml032>
- Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirow D, Pellicer A and Dolmans MM (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Annals of Medicine*, 43: 437–50. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.546807>
- Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Serrano MS, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V and Andersen CY (2013) Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*, 99(6): 1503-13. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.030>
- Donnez J and Dolmans MM (2014) Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 28(8): 1188-97. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.09.003>
- Donnez J and Dolmans MM (2015) Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0544-9>
- Driancourt MA (1991) Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35(1): 55-79. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90148-7)
- Drummond AE and Findlay JK (1999) The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 151: 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00038-6)
- Elmoazzen HY, Elliott JAW and McGann LE (2005) Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology*, 51: 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.05.003>
- Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS and Andersen CY (2010) The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction*, 25(5): 1280–81. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq033>
- Evans ACO (2003) Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim*, 38:240–246. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00439.x>

- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C (2000) Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 169: 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00349-X)
- Faustino LR, Silva CMG, Rossetto R, Rodrigues GQ, Figueiredo JR and Rodrigues APR (2010) Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Anim Reprod Sci*, 122: 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.001>
- Fossum TW. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. ELSEVIER (Ed.). Cirurgia de Pequenos Animais. Edição 3. São Paulo, 2007. p.729-745.
- Fujihira T, Kobayashi M, Hochi S, Hirabayashi M, Ishikawa H, Ohsumi S and Fukui Y (2006) Developmental capacity of Antarctic minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) vitrified oocytes following in vitro maturation, and parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 14: 89-95. <https://doi.org/10.1017/S0967199406003601>
- Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TAL, Pharm D and Ragni G (2006) Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*, 85: 1150-6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.062>
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM and Wildt DE (1988) Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 39: 355-372. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.2.355>
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K and Webb R (1994) Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil*, 101(3): 619-23. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010619>
- Gosden RG (2000) Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol* 163: 125–129. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00248-8)
- Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, McGann LE, Critser JK (1998) Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, 53: 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(98\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00132-8)
- Hafez B, Hafez ESE. Hormônios, Fatores de Crescimento e Reprodução. Reprodução Animal. Edição 7: Manole, 2004.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosterom ATV and Bruijn EA (2004) Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56:549–80. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3>
- Hovatta O (2005) Methods for cryopreservation of human ovarian Tissue. *Reprod Biomed Online* 10(6): 729–34. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61116-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61116-9)
- IUCN. The Red List of IUCN 2018. 2018. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/>
- Ishijima T, Kobayashi Y, Lee DS, Ueta YY, Matsui M, Lee JY, Suwa Y, Miyahara K and Suzuki H (2006) Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *The Journal of reproduction and development* 52(2): 293-99. <https://doi.org/10.1262/jrd.17080>

- Israely T, Dafni H, Granot D, Nevo N, Tsafiriri A and Neeman M (2003) 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*, 68: 2055–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011734>
- Jafarabadi M, Abdollahi M and Salehnia M (2015) Assessment of vitrification outcome by xenotransplantation of ovarian cortex pieces in γ -irradiated mice: morphological and molecular analyses of apoptosis. *J Assist Reprod Genet*. 32(2): 195-205 <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0382-1>
- Jain JK and Paulson RJ (2006) Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*, 86(3): 1037-46. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1478>
- Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P and Andersen CY (2017) 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet*, 34:325–36. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0843-9>
- Jewgenow K and Paris M C J (2006) Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*, 66: 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.010>
- Jewgenow K, Wiedemann C, Bertelsen MF and Ringleb J (2011) Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. *International Zoo Yearbook*, 45(1): 124-132. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2010.00124.x>
- Junqueira LC and Carneiro J (2012) Aparelho Reprodutor Feminino. In: COOGAN, G. (Ed.). *Histologia Básica*. Edição 10. Rio de Janeiro. p.433-440.
- Kagawa N, Silber S and Kuwayama M (2009) Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 18(4): 568-77. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60136-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60136-8)
- Kaipia A and Hsueh JW (1997) Regulation of ovarian Follicle atresia. *Annu. Rev. Physiol*. 59:349–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>
- Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M and Akita T (2003) Maturation and Fertilization of Porcine Oocytes from Primordial Follicles by a Combination of Xenografting and In Vitro Culture. *Biology of Reproduction*, 69: 1488–93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017038>
- Kang B, Wang Y, Zhang L, Xiao Z, Li SW (2015) bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. *J Assist Reprod Genet*, 33(2): 281-89. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0628-6>
- Kim SS, Battaglia DE and Soules MR (2001) The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril*, 75(6): 1049-56. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01790-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01790-3)
- Kim SS (2003) Ovarian tissue banking for cancer patients. To do or not to do? *Human Reproduction* 18(9): 1759-61. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg381>
- Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS and Gosden RG (2004) Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or

- without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril*, 82(3): 679-85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.05.022>
- Lakhoo K, Davies J, Chakraborty S, Berg S, Tennyson R, Fowler D, Manek S, Verrill C and Lane S (2019) Development of a new reproductive tissue cryopreservation clinical service for children: the Oxford programme. *Pediatr Surg Int*, 35:1271–78. <https://doi.org/10.1007/s00383-019-04503-3>
- Lee J, Lee JR, Youm HW, Suh CS, Kim SH (2015a) Effect of preoperative simvastatin treatment on transplantation of cryopreserved-warmed mouse ovarian tissue quality. *Theriogenology* 83: 285–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.027>
- Lee J, Kim EJ, Kong HS, Youm HW, Lee JR, Suh CS and Kim SH (2015b) A combination of simvastatin and methylprednisolone improves the quality of vitrified-warmed ovarian tissue after auto-transplantation. *Human Reproduction* 30(11): 2627–38. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dev222>
- Leonel ECR, Vilela JMV, Carrilho DJ and Lucci CM (2018a) Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 83: 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.003>
- Leonel ECR, Vilela JMV, Paiva REG, Jivago J LPR, Amaral RS and Lucci CM (2018b) Restoration of fresh cat ovarian tissue function by autografting to subcutaneous tissue: A pilot study. *Theriogenology* 105: 97-106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.016>
- Lermen D, Blömeke B, Browne R, Clarke A, Dyce PW, Fixemer T, Fuhr GR, Holt WV, Jewgenow K, Lloyd RE, Lötters S, Paulus M, Reid GM, Rapoport DH, Rawson D, Ringleb J, Ryder OA, Spörl G, Schmitt T, Veith M and Müller P (2009) Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology*, 18(6): 1030-33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x>
- Lima AKF, Silva AR, Santos RR, Sales DM, Evangelista AF, Figueiredo JR and Silva LDM (2006) Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology*, 66: 1664–66. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.014>
- Lin T, Yen J, Kuo T, Gong K, Hsu K and Hsu T (2008) Comparison of the developmental potential of 2-week-old preantral follicles derived from vitrified ovarian tissue slices, vitrified whole ovaries and vitrified/transplanted newborn mouse ovaries using the metal surface method. *BMC Biotechnology*, 8:38-50. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-38>
- Liu J, Elst JV, Broecke RV and Dhont M (2002) Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reproduction*, 17(3): 605-11. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.605>
- Lopes CAP, Alves AMCV, Jewgenow K, Báo SN and Figueiredo JR (2016) Cryopreservation of canine ovarian cortex using DMSO or 1,3-propanediol. *Theriogenology* 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.006>
- Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Báo SN, Silva JRV, Gonçalves PBD (1999) Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation

- from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci* 56: 223–36. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00045-7)
- Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LHR, Rumpf R, Bão SN (2004) Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, 61: 1101–14. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.004>
- Luciano AM, Chigioni S, Lodde V, Franciosi F, Luvoni GC and Modina SC (2009) Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*, 59: 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.002>
- Luvoni GC (2006) Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*, 66: 101–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.012>
- Luvoni GC, Tessaro I, Apparício M, Ruggeri E, Luciano AM, Modina SC (2012) Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. *Reprod Domest Anim* 47: 385–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01885.x>
- Macêdo LB, Pimentel MML, Santos FA, Bezerra MB, Ladd FVL, Moura CEB (2018) Equine chorionic gonadotrophin improved vascularization of feline ovarian tissue xenografted into immunosuppressed mice *Theriogenology*, 121:78-81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.006>
- Mazur P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247(3): 125-42. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- McGee Jr HA and Martin WJ (1962) Cryochemistry. *Cryogenics* 2(5): 257-67. [https://doi.org/10.1016/0011-2275\(62\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0011-2275(62)90001-2)
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E and Dor J (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 318-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMc055237>
- Meirow D, Roness H, Kristensen SG and Andersen CY (2015) Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Human Reproduction*, 30(11):2453–56. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev210>
- Melo LF, Silva DS, Vieira FC, Mello WC (2016) Histórico e perspectiva da conservação dos felinos silvestres ocorrentes no brasil com estudos realizados entre os anos de 1945 a 2014. (Dissertação) Departamento de Ciências da Natureza, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- Mescher AL (2016) The Female Reproductive System. In: Mc Graw Hill Education. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. Edição 14. p. 460-489.
- Milenkovic M, Diaz-Garcia C, Wallin A and Brannstrom M (2012) Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. *Reproductive Biology*, 97(5): 1176-82. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.123>

- Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P and Donnez J (2000) Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril*, 74(1):122-129. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00548-3)
- Nugent D, Newton H, Gallivan L and Gosden RG (1998) Protective effect of vitamin E on ischemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Infertil* 114(2): 341-6. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140341>
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O and Gosden RG (1998) Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril*, 69(1): 1-7. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00207-0)
- Primack, Richard B and Rodrigues E (2001) Biologia da conservação. Ed. *Planta, Londrina*.
- Rall WF and Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 313: 573-75. <https://doi.org/10.1038/313573a0>
- Rodrigues GQ, Silva CMG, Faustino LR, Bruno JB, Pinto LC, Lopes CAP, Campello CC, Figueiredo JR (2010) Efeito de diferentes concentrações de Hormônio Folículo-Estimulante recombinante sobre o Desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. *Acta Veterinaria Brasilica*, 4(3):144-52. <https://doi.org/10.21708/avb.2010.4.3.1703>
- Rojo JL, Linari M, Musse MP and Peluffo MC (2015) *Felis catus* ovary as a model to study follicle biology in vitro. *J Assist Reprod Genet* 32:1105–11. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0511-5>
- Russo L, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Marrone G, García-Pagán JC, García-Cardena G and Bosch J (2012) Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology* 55(3): 921-30. <https://doi.org/10.1002/hep.24755>
- Sagsoz N, Kisa U and Apan A (2002) Ischemia–reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Human Reproduction* 17(11): 2972–76. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2972>
- Salle B, Lornage J, Franck M, Isoard L, Rudigoz RC and Guerin JF (1998) Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Fertil Steril*, 70(1): 124-28. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00095-8)
- Santos RR, Van den Hurk R, Rodrigues APR, Costa SHF, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR (2007) Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Anim Reprod Sci*, 99: 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.05.013>
- Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van den Hurk R (2007) Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, 327:167–76. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0240-2>
- Santos RR, Knijn HM, Vos PLAM, Oei CHY, Loon T, Colenbrander B, Gadella BM, Van den Hurk R and Roelen BAJ (2009) Complete follicular development and recovery

- of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertil Steril*, 91(4): 1455-58. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.018>
- Sarma UC, Findlay JK and Hutt KJ (2019) Oocytes from stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 55: 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.07.006>
- Scalercio SRRA, Brito AB, Domingues SFS, Santos RR and Amorim CA (2015) Immunolocalization of Growth, Inhibitory, and Proliferative Factors Involved in Initial Ovarian Folliculogenesis From Adult Common Squirrel Monkey (*Saimiri collinsi*). *Anim Reprod Sci*, 22(1): 68-74. <https://doi.org/10.1177/1933719114532842>
- Schmidt KLT, Andersen CY, Loft A, Byskov AG, Ernst E and Andersen AN (2005) Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod*, 20(12): 3539–46. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei250>
- Schnorr J, Oehninger S, Toner J, Hsiu J, Lanzendorf S, Williams R and Hodgen G (2002) Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. *Hum Reprod*, 17(3): 612-19. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.612>
- Shaw JM, Oranratnachai A and Trounson AO (2000) Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-X)
- Sherwood L. (2011) Fisiologia reprodutiva feminina. Fisiologia Humana das células aos sistemas. Edição 7: Cengage.
- Silva-Santos KC, Marinho LSR, Santos GMG, Machado FZ, Gonzalez SM, Lisboa LA, Seneda MM (2013) Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. *Anim. Reprod.*, 10(3): 180-6.
- Silverthorn DU (2017) Reprodução e desenvolvimento. Artmed (Ed.). Fisiologia Humana. 7ª Edição. Porto Alegre -RS, p: 816-823.
- Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G and Jobling T (2013) First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Hum Reprod*, 28(11): 2996–99. <https://doi.org/10.1093/humrep/det360>
- Sugimoto M, Maeda S, Manabe N and Miyamoto H (2000) Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology*, 53:1093-1103. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00255-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00255-7)
- Tanpradit N and Chatdarong K (2011) Cat ovarian tissue cryopreservation using a passive cooling device. *The Journal of Veterinary Medicine*, 41:115-116.
- Tanpradit N, Comizzoli P, Srisuwatanasagul S and Chatdarong K (2015) Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology*, 83: 1553–61. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.035>
- Tao T and Valle AD (2008) Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *J Assist Reprod Genet*, 25:287–96. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9236-z>

- Terazono T, Kaedei Y, Tanihara F, Namula Z, Viet VL, Takagi M, Inoue M, Sato Y, Taniguchi M and Otoi T (2012) Follicle formation in the canine ovary after autografting to a peripheral site. *Reprod Dom Anim* 47: 16–21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01880.x>
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2014) Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion.” *Fertil Steril*, 101(5): 1237-42. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.052>
- Torrents E, Boiso I, Barri PN and Veiga A (2003) Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine *Hum Reprod*, 9(5): 471-481. <http://hdl.handle.net/10822/998052>
- Tuuminen R, Syrjala S, Krebs R, Arnaudova R, Rouvinen E, Neuvonen PJ, Tikkanen JM, Nykanen AI, Lemstrom KB (2013a) Combined donor Simvastatin and Methylprednisolone treatment prevents ischemia-reperfusion injury in rat cardiac allografts through vasculoprotection and immunomodulation. *Transplantation* 95(9): 1084-91. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182881b61>
- Tuuminen R, Nykanen AI, Saharinen P, Gautam P, Keranen MAI, Arnaudova R, Rouvinen E, Helin H, Tammi R, Rilla K, Krebs R and Lemstrom KB (2013b) Donor Simvastatin treatment prevents ischemia-reperfusion and acute kidney injury by preserving microvascular barrier function. *Am J Transplant* 13: 2019–34. <https://doi.org/10.1111/ajt.12315>
- Van der Hurk R and Zhao J (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63(6): 1717-51. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>
- Van der Ven R, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krussel J, Frambach T, Kupka M, Hohl MK, Winkler-Crepaz K, Seitz S, Dogan A, Griesinger G, Haberlin F, Henes M, Schwab R, Sutterlin M, vonWolff M and Dittrich R (2016) Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: Tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 31(9): 2031-41. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew165>
- Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J and Dolmans MM (2010) Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model *Fertil Steril*, 93 (5): 1676-85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>
- Vilela JMV, Leonel ECR, Gonçalves LP, Paiva REG, Amaral RS, Amorim CA and Lucci CM (2019) Function of cryopreserved cat ovarian tissue after autotransplantation. *Animals* 9 (1065): 1-13. <http://dx.doi.org/10.3390/ani9121065>
- Wang Y, Chang Q, Sun J, Dang L, Ma W, Hei C, Shen X, Zhao C, Cai Y, Pei X, Zhang X, Wang Y, Jiang X (2012) Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 24: 646–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.025>
- Wang T, Yan J, Lu C, Xia X, Yin T, Zhi X, Zhu X, Ding T, Hu W, Guo H, Li R, Yan L and Qiao J (2016) Human single follicle growth in vitro from cryopreserved ovarian

- tissue after slow freezing or vitrification. *Hum Reprod*, 0:1–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew005>
- Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM and Casper RF (1999) Preliminary Experience with Subcutaneous Human Ovarian Cortex Transplantation in the NOD-SCID Mouse. *Biol. Reprod*, 60: 1462–67. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1462>
- Wiedemann C, Zahmel J and Jewgenow K (2013) Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Veterinary Research*, 9(37): 1 – 11. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-37>
- Wildt DE, Chan SYW, Seager SWJ and Chakraborty PK (1981) Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod*, 25:15-28. <https://doi.org/10.1095/biolreprod25.1.15>
- Wninger JD and Kort HI (2002) Cryopreservation of immature and mature human oocytes. *Semin reprod med*, 20: 45-49. <https://doi.org/10.1055/s-2002-23519>
- Xu M, Kreeger PK, Shea LD and Woodruff TK (2006) Tissue-Engineered Follicles Produce Live, Fertile Offspring. *Tissue Engineering* 12(10): 2739-46. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2739>
- Yeoman RR, Wolf DP and Lee DM (2005) Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*, 83(1): 1248-54. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2739>
- Zimmerman BJ and Granger DN (1994) Reperfusion Injury. *Surg Clin North Am* 72(1): 65-83. <https://doi.org/10.1097/00000441-199404000-00009>

CAPÍTULO I

Investigação do tempo de revascularização e dano inicial após transplante de tecido ovariano fresco e criopreservado de gatas domésticas

RESUMO

O transplante de tecido ovariano tem sido uma estratégia eficaz para preservar a fertilidade em humanos, mostrando-se promissor para a conservação de felinos selvagens. Estudos anteriores do nosso grupo confirmaram o sucesso do transplante heterotópico de tecido ovariano fresco em gatos domésticos, com desenvolvimento de folículos antrais a partir de 28 dias após o transplante (Leonel *et al.*, 2018b). Porém, outro estudo com tecido ovariano criopreservado demonstrou uma redução acentuada no número de folículos logo no dia 7 após o transplante (Vilela *et al.*, 2019). O presente estudo teve como objetivo investigar o tempo de revascularização e os danos iniciais da isquemia durante os seis primeiros dias de autotransplante de tecido ovariano fresco e criopreservado de gatas domésticas. Dos ovários das cinco gatas foram retirados oito fragmentos (~5x3x3mm), dos quais um foi fixado (D0 fresco) e três transplantados (grupo fresco) para o tecido subcutâneo do dorso das gatas. Os outros quatro fragmentos foram criopreservados (congelamento lento com 1,5 M de DMSO). Após 48 horas o material foi descongelado e um fragmento fixado para controle da criopreservação (D0 crio) e os três restantes transplantados (grupo crio) para a mesma região. Os fragmentos de tecido ovariano fresco e criopreservado foram recuperados nos dias 2 (D2), 4 (D4) e 6 (D6) após o transplante e processados para histologia (Figura 1.1). As amostras foram cortadas em série (5µm de espessura) e a cada 5 cortes, um foi retirado para a montagem da lâmina e os cortes corados com hematoxilina e eosina. Todos os folículos pré-antrais com os núcleos dos

ovócitos visíveis foram contados e classificados como morfológicamente normais (MN) ou degenerados. O anticorpo de actina do músculo liso foi utilizado para identificar a vascularização nas amostras de tecido ovariano, e para análise foi calculada a porcentagem de área de tecido ovariano ocupada por vasos. A porcentagem de folículos MN foi analisada pelo teste do qui-quadrado e a área de vascularização por ANOVA e Tukey, tendo sido considerados significantes apenas quando $p < 0,05$. O número total de folículos, a porcentagem de folículos, o número de folículos MN, bem como suas porcentagens médias no tecido ovariano fresco e criopreservado antes do transplante (D0) e no pós-transplante D2, D4 e D6 nos grupos de folículos primordiais e em crescimento estão descritas na Tabela 1. Resumidamente, houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na porcentagem de folículos primordiais e crescentes MN após o transplante em comparação com o tecido não transplantado (D0), no tecido fresco e criopreservado. De acordo com a análise de ultrassom, houve também melhora na vascularização com o passar dos dias de transplante. No entanto, a perda folicular nos primeiros dias pós-transplante se mostrou mais intensa no material congelado. Em relação a vascularização (Figura 1.2), não houve diferença significativa entre os transplantes fresco e criopreservados, porém a área de vasos foi significativamente maior ($P < 0,05$) em D4 e D6 em comparação com D0, sem diferença em D2 em relação a qualquer outro dia. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a vascularização de tecido ovariano fresco e criopreservado após autotransplante subcutâneo em gatas doméstica ocorre em quatro dias. Porém, a perda folicular já nos primeiros dias se mostrou mais intensa no material criopreservado do que no fresco. Estudos adicionais devem ser propostos para tentar reduzir o tempo de revascularização para talvez permitir uma melhor sobrevida folicular após o transplante de tecido ovariano criopreservado.

***Investigation of revascularization time and initial damage
after transplantation of fresh and cryopreserved ovarian
tissue in domestic cats***

**M. M. Costa¹, L. P. Gonçalves¹, M. S. Lemos² A. R. M. Marangon¹ and
C. M. Lucci¹**

¹Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of
Brasilia, Brasilia-DF; ²Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia,
Brasilia-DF, Brazil.

ABSTRACT

The present study evaluated revascularization time of fresh and cryopreserved cat ovarian tissue after transplantation to subcutaneous tissue. Ovaries of five cats were used and eight pieces of ovarian tissue were taken from each pair of ovaries. Immediately after removal, three pieces were transplanted and one fixed for fresh control. The remaining four pieces were cryopreserved and, after thawing, one was fixed for cryopreservation control and three were transplanted. Grafts were recovered on days 2 (D2), 4 (D4) and 6 (D6) post-transplantation. Blood vessels were identified by immunohistochemistry and doppler ultrasound. Immunohistochemistry showed that the percentages of total tissue area occupied by blood vessels were similar ($P>0.05$) in fresh and cryopreserved tissues. In both cases, blood vessel area was significantly higher ($P<0.05$) on D4 and D6 compared to D0. Ultrasound analysis showed vascularization improvement on the periphery of grafts from D2 to D4 and from D4 to D6, both in fresh and cryopreserved tissue samples. Nonetheless, there was a significant decrease ($P<0.05$) in the percentage of morphologically normal follicles (MNF) after transplantation compared to non-transplanted tissue (D0), both for fresh and cryopreserved samples. Moreover, the number

of follicles found in samples was considerably smaller after grafting. In conclusion, revascularization of ovarian tissue autotransplanted to subcutaneous tissue in domestic cats occurs within four days after transplantation, both for fresh and cryopreserved tissue. However, large follicular loss has been observed in the first days post-transplantation, especially in cryopreserved tissues.

Keywords Transplant, Feline, Ischemia, Preantral follicle, Slow freezing

INTRODUCTION

Ovarian tissue cryopreservation and transplantation has been successful in humans since the early 1980s (Leporrier *et al.*, 1987) and has been mainly used for preserving the fertility of women undergoing chemotherapy and/or radiotherapy cancer treatment (reviewed by Donnez and Dolmans 2017). Although ovarian tissue preservation can be done both by slow freezing and vitrification (Zhou *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018), slow freezing is still the most widely used method for humans (reviewed by Leonel *et al.*, 2019). Another possible use for ovarian tissue transplantation is to minimize or prevent the effects of menopause, as a natural source of hormones reposition (Andersen and Kristensen, 2015; Wolff and Stute 2015).

The success of ovarian tissue transplantation in humans encourages the investigation of transplantation techniques in animals, especially for preservation of germplasm of endangered species, but also of genetically superior domestic animals (Comizzoli and Holt 2014; Morrell and Mayer 2017). Most species from the Felidae family are endangered (IUCN, 2019), and the domestic cat is an adequate experimental model for studies aimed at wild felids due to its phylogenetic similarity (Leon-Quinto *et al.*, 2009). The domestic cat may also be the recipient of wild felids xenografts due to their physiological similarities. In the case of endangered animals, autotransplantation is out

of question and xenotransplant is the only possibility (Wiedemann *et al.*, 2012). Autotransplantation, however, and avoids rejection of the transplanted tissue and, consequently, the use of immunosuppressed animals is not necessary, enabling studies using fewer animals and with less variables. To allow the reproduction of endangered animals using ovarian xenotransplantation, ovum pick up (OPU) and in vitro embryo production (IVEP) techniques will be required for later fertilization, therefore, heterotopic sites are usually preferred. For example, the kidney capsule (Bosch *et al.*, 2004; Hosoe *et al.*, 2008; Khalili *et al.*, 2014), the muscle tissue or fascia (Eimani *et al.*, 2009; Soleimani *et al.*, 2008, 2010; Dath *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010ab; Terazano *et al.*, 2012), and the subcutaneous tissue (Weissman *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Schuber *et al.*, 2008; Wiedemann *et al.*, 2012; Leonel *et al.*, 2018b; Vilela *et al.*, 2019) are reported to be good options for ovarian tissue transplantation in different species. However, when blood vessel anastomosis is not performed, the time necessary for reperfusion of the grafted tissue will probably vary from one grafting place to another (Oktay *et al.*, 2004; Dath *et al.*, 2010; Youm *et al.*, 2015), as will the period of ischemia to which the tissue is subjected.

Vascularization time also differs among species. In rats, revascularization occurred within 48 hours when fresh ovarian tissue was autotransplanted into the neck muscle (Dissen *et al.*, 1994). In sheep, vascularization of cryopreserved ovarian tissue autotransplanted to the ovarian pedicle was completely established only 7 days after grafting (Gosden *et al.*, 1994). A study in which cryopreserved human ovarian tissue was xenografted to mice, showed that murine angiogenesis initiates reperfusion 5 days post-transplantation, but the center of the tissue was perfused only after 10 days (Van Eyck *et al.*, 2010). Although interest in cryopreservation and transplantation of ovarian tissue of

cats is growing (Wiedemann *et al.*, 2012; Demirel *et al.*, 2018; Leonel *et al.*, 2018ab; Vilela *et al.*, 2019), no study has yet described the time needed for revascularization of transplanted ovarian tissue on these animals. The aims of the present study were to investigate the revascularization time for fresh and cryopreserved ovarian tissue transplanted to the subcutaneous tissue in domestic cats, as well as to evaluate follicle survival in transplanted tissue.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The study was conducted in Brasilia, Brazil (15° 46' South, 47° 55' West) tropical region with no significant change in day length throughout the year making cats continuously polyestrous (Michel, 1993). Five healthy young adult female cats (*Felis catus*), ages 1 to 4 years, mixed breeds, were used in the experiment. The animals were dewormed and tested negative for feline immunodeficiency syndrome (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) using a rapid test kit (Anigen Rapid FIV/FeLV Test Bioeasy, Alere) and observed clinically for one month before the experiment. Animals were housed in a large sheltered room with natural light and ventilation with water and standard commercial cat food *ad libitum*. During the days of the experiment, they were individually confined in cages (80x60x45 cm). All procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Institute of Biological Sciences, University of Brasilia (protocol n° 66718/2016). After the experiment all animals were adopted.

Surgical procedures and experimental design

The queens were in interestrus and were fasted for 12 h prior to ovariohysterectomy (OSH). Pre-anesthesia and analgesia were performed using Xylazine Chloride (0.5 mg/kg I.M. - Xilazin® 2%, Syntec, SP, Brazil), Ketamine Chloride (5 mg/kg I.M. - Cetamin®

10%, Syntec, SP, Brazil) and Morphine (0.2 mg/kg I.M. - Dimorf®, Cristália, SP, Brazil). Anesthesia was induced with intravenous injections of Propofol (Provine® 1%, Meizler, SP, Brazil) in a dose/effect manner and maintained by ventilation with isoflurane (BioChimico®, RJ, Brazil) in pure oxygen. Each animal also received a prophylactic dose of antibiotic (25 mg/kg I.V. - Ceftriaxone, Vitalis, Bogotá, Colombia) and anti-inflammatory (0.1 mg/kg I.V. - Meloxicam – Maxican® 2% Ourofino, SP, Brazil). OSH were performed according to the method described by Fossum (2007).

Ovaries were freed from adipose tissue and ligaments and washed with 0.9% saline solution. Eight fragments (~5x3x3 mm) were taken from the ovaries of each cat using a scalpel and graph paper as a template. One fragment was immediately fixed in 4% paraformaldehyde (fresh D0) and three others transplanted. The remaining four fragments were cryopreserved and kept in liquid nitrogen for 48 hours. After thawing, one fragment was fixed as a control for the cryopreservation procedure (cryo D0) and the remaining three fragments were transplanted. Eventually, each cat had six ovarian tissue fragments autografted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck - three fresh grafts and three cryopreserved grafts (Figure 1A).

Before making the implants and removing the implanted fragments, pre-anesthesia was performed with Ketamine Chloride (2 mg/kg I.M.) and Diazepam (0.2 mg/kg I.M. - Cristália, Brazil). Anesthetic induction was performed with Propofol (dose/effect I.V. administration) and maintained by ventilation with isoflurane in pure oxygen. For removal of implants, local anesthesia was performed with subcutaneous infiltration of Lidocaine Chloride (1mg/kg - Lidovet®, Bravet, RJ, Brazil).

For grafting, small pouches (approximately 1 cm²) were created through skin incisions and the ovarian tissue fragments were fixed directly into the subcutaneous tissue of the

animals' dorsal neck. Before transplantation, fragments were washed with 1% iodine and sterile saline, placed within a pouch and fixed with a stitch to the subjacent muscle. Skin incisions were sutured, and each queen received a dose of vitamin E (5 mg/kg I.M. - Monovin E, Bravet, Rio de Janeiro, Brazil) to reduce ischemia-reperfusion damage in the grafts (Nugent *et al.*, 1998).

Fresh and cryopreserved grafts were recovered on days 2 (D2), 4 (D4) and 6 (D6) after transplantation, fixed and processed for classical histology (Figure 1B).

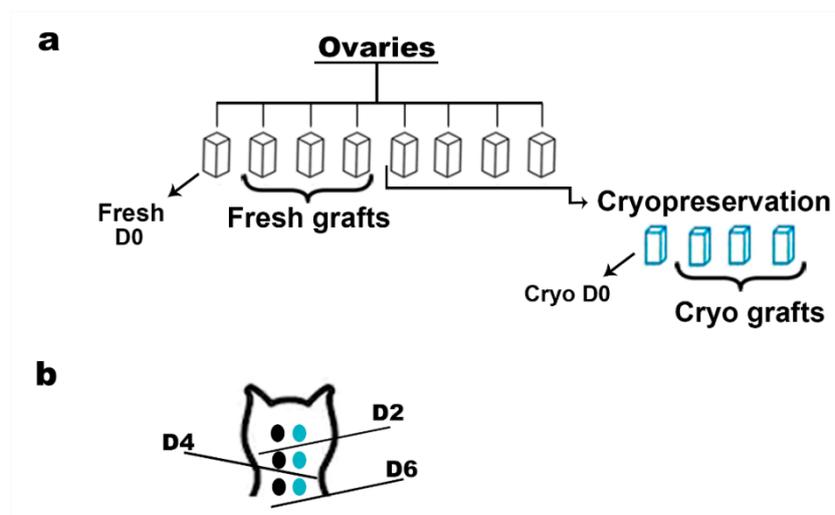


Figure 1.1 Experimental design. A) Eight pieces were taken from each pair of ovaries, from which one was immediately fixed (fresh D0) and three were immediately grafted. Four fragments were cryopreserved and after thawing, one fragment was fixed (cryo D0) and three were grafted. B) Each cat had six ovarian tissue fragments grafted to the subcutaneous tissue of the dorsal neck - three fresh grafts and three cryopreserved grafts. The grafts were recovered on days 2 (D2), 4 (D4) and 6 (D6) after transplantation, one fresh and one cryopreserved at each time point.

Cryopreservation protocol

Cryopreservation was performed following the protocol described by Leonel *et al.*, (2018a). Briefly, fragments were placed in cryovials containing 1 ml cryoprotectant solution (DMEM, 10% SFB, 0.4% sucrose and 1.5 M DMSO) and kept at 10 °C for 10 minutes. After the equilibrium period the material was frozen using a programmable

freezer (Dominium K, Biocom, Brazil), at -2 °C/min to -7 °C, kept at this temperature for 15 minutes for the seeding procedure, and then at -0.3 °C/min until -35 °C. Then, the samples were immersed in liquid nitrogen (-196 °C).

After 48 hours, the material was thawed in a water-bath at 38 °C and the cryoprotectants were gradually removed by means of three washes (five minutes each) in solutions containing DMEM and 10% SFB and decreasing concentrations of sucrose (0.4%, 0.2% and 0%) and DMSO (0.75M, 0.37M and 0M).

Ultrasound analysis

On D2, D4 and D6 post-transplantation, each graft was evaluated by ultrasound (Z5 Mindray, China) and blood vessels were visualized by a Doppler system (10 Mz linear probe), which allowed for the observation of venous and arterial vessels in the periphery of grafts.

Light microscopy analysis

Samples were serially sectioned (5µm thick) and one in every 5 sections was mounted, stained with hematoxylin and eosin and evaluated under light microscopy. The follicles with a visible oocyte nucleus were counted and classified according to developmental stage (primordial or growing follicle) and morphology (morphologically normal or degenerated) (Carrijo Jr *et al.*, 2009; Leonel *et al.*, 2018b). Follicles were considered morphologically normal (MN) when they had a round oocyte surrounded by one or more well organized layers of granulosa cells. Follicles presenting one or more of the following features were classified as degenerated: oocyte detached from granulosa cells, shrunken oocyte, oocyte with vacuoles in the cytoplasm, pyknotic nucleus on the oocyte or granulosa cells, and follicle detached from the ovarian stroma.

Random sections of each sample were submitted to immunohistochemical analysis for anti-alpha actin antibody (monoclonal mouse, 1A4, 1:500 dilution, sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) to localize blood vessels within the ovarian tissue. Antigenic recovery was performed by immersing the sections in Trilogy (Cell Marque, USA) at 97 °C twice for 30 minutes each. Then the Polymer Detection System kit (Novolink™, Leica Biosystems, UK) was used. Briefly, endogenous blockade of peroxidase was performed with block peroxidase for 5 minutes. Blocking of non-specific protein reactions was done with Protein Block for 5 minutes. The sections were incubated with primary antibody and amplified with Post Primary Block for 30 minutes at 37 °C. Then the sections were incubated with Polymer for 30 min. at 37 °C. Sections were then incubated with diaminobenzidine solution (DAB - K3468, Dako) and counterstained with Harris hematoxylin.

Using Image J software (version 1.x) the total area of the tissue section and the area of all immunostained vessels were measured and the percentage of the ovarian tissue area occupied by blood vessels was calculated.

Statistical analysis

Data were compared among the days after transplantation and between fresh and cryopreserved samples. Data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test and log transformed. The percentage of total tissue area occupied by blood vessels was analyzed by ANOVA and Tukey test, using the program Proc. GLM (SAS, Analysis System, Inc, Cary, NC, USA). The percentage of morphologically normal and degenerate follicles were analyzed by Pearson's Chi-square test (Microsoft Excel for Windows, USA). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Analysis of vascularization

The percentage of total tissue area occupied by blood vessels in fresh and cryopreserved ovarian tissue on different post-transplantation days is shown in Figure 1.2. The percentage of total tissue area occupied by blood vessels in transplanted ovarian tissue was 0.58, 0.91 and 1.8 for fresh tissue on days 2, 4 and 6 post-transplantation respectively, and 0.73, 1.32 and 1.17 for cryopreserved tissue on the same days. There was no significant difference ($P>0.05$) between cryopreserved and fresh tissue grafts. However, in both cases the area occupied by vessels was significantly higher ($P<0.05$) on D4 and D6 compared to D0, with no difference on D2 in relation to any other day.

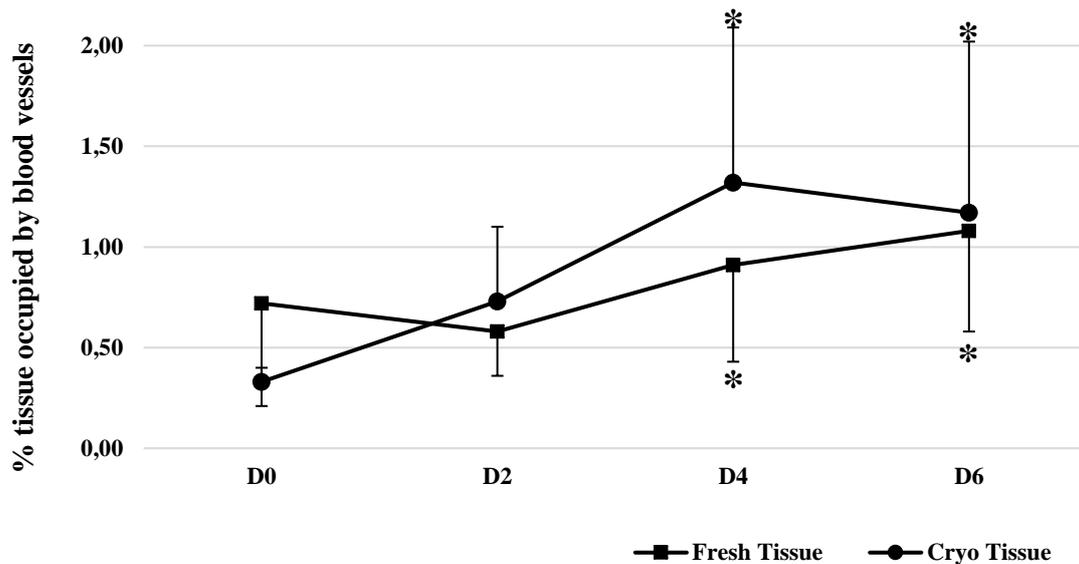


Figure 1.2 Mean percentage of total tissue area occupied by blood vessels in fresh and cryopreserved ovarian tissue before transplantation (D0) and 2, 4 and 6 days after grafting.

* Indicates significant difference compared to D0 ($P<0.05$).

Ultrasound analysis showed visual improvement in vascularization on the periphery of grafts from D2 to D4 and from D4 to D6, both in fresh and cryopreserved tissue

samples (Figure 1.3). In addition, some of the grafts (15%) presented a fibrous capsule. These capsules were seen only on D6 for fresh (13%) and cryopreserved (40%) tissue grafts and on D4 only for cryopreserved tissue grafts (10%).

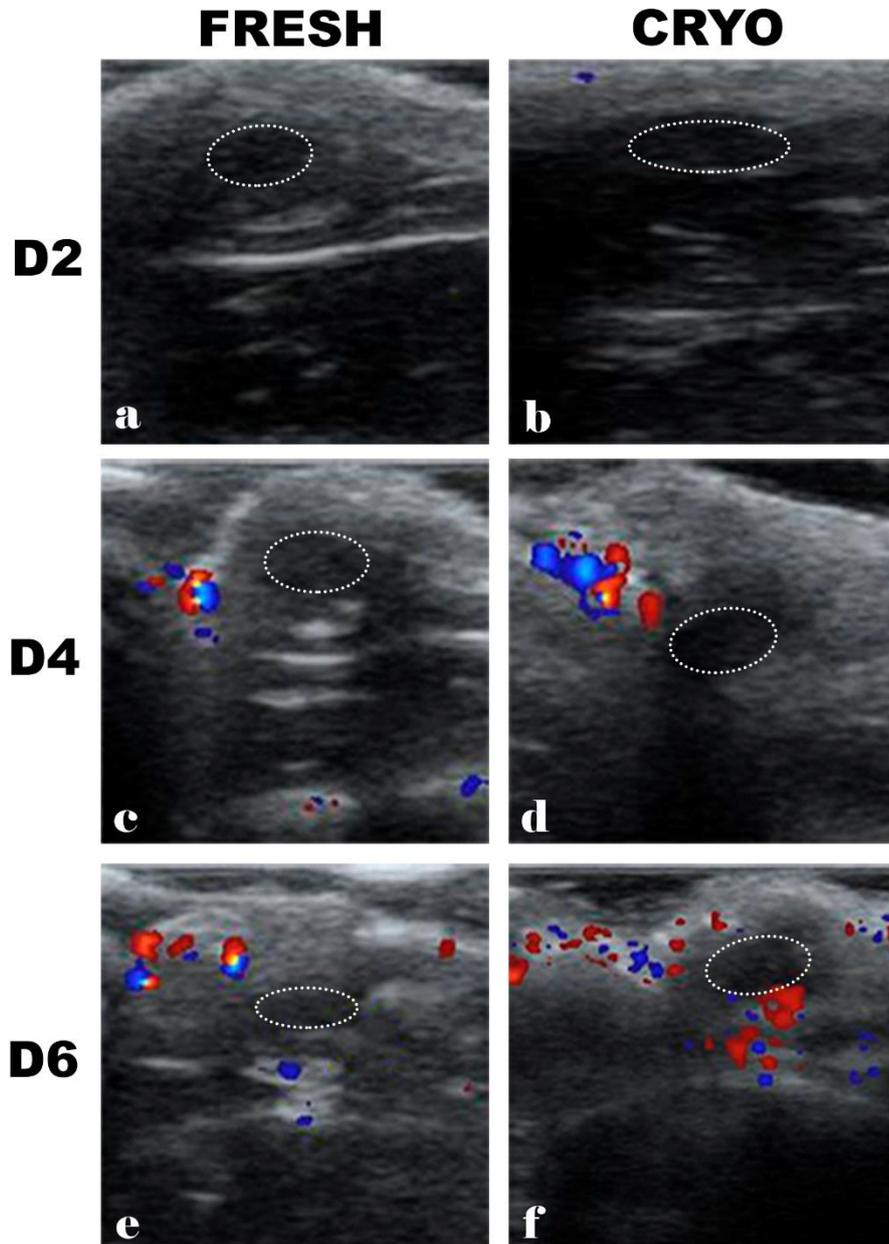


Figure 1.3 Representative images of Doppler ultrasound analysis of fresh (a, c and e) and cryopreserved (b, d and f) ovarian tissue on days 2, 4 and 6 after transplantation. Arterial (red) and venous (blue) blood flow evidenced adjacent to the ovarian tissue grafts (delimited by dashed lines).

Follicular analysis

A total of 4,186 follicles from ovarian tissue fragments of the five cats were analyzed. Of these follicles, 3,873 (92.5%) were primordial and 313 (7.5%) were growing follicles. The total number of follicles counted, the number and proportion of primordial and growing follicles, and the number and percentages of MN follicles in each day and in both fresh and cryopreserved tissue samples are presented in Table 1.1.

Table 1.1 Total number of follicles counted, number and mean percentage (\pm SD) of primordial and growing follicles, and number and mean percentage (\pm SD) of morphologically normal (MN) follicles in fresh and cryopreserved ovarian tissue fragments non-transplanted (D0) and on D2, D4 and D6 post-transplantation

		Total follicles	Primordial follicles				Growing follicles			
			n	%	MN	% MN	n	%	MN	% MN
Fresh	D0	1681	1550	92.7 \pm 1.6	1466	92.6 \pm 6.9 ^{Aa}	131	7.3 \pm 1.6	124	92.4 \pm 12.4 ^{Aa}
	D2	392	354	97.3 \pm 14.6	137	36.4 \pm 6.8 ^{Ab}	38	2.7 \pm 4.3	12	34.7 \pm 11.0 ^{Ab}
	D4	529	490	92.6 \pm 7.5	190	38.4 \pm 31.2 ^{Ab}	39	7.4 \pm 7.5	10	24.2 \pm 38.2 ^{Ab}
	D6	177	160	88.2 \pm 7.6	90	58.3 \pm 12.7 ^{Ac}	17	11.8 \pm 7.6	5	19.1 \pm 22.3 ^{Ab}
Cryo	D0	1061	997	93.2 \pm 2.6	684	69.7 \pm 15.0 ^{Ba}	64	6.8 \pm 2.6	34	48.8 \pm 18.1 ^{Ba}
	D2	91	82	88.6 \pm 6.2	23	45.9 \pm 41.2 ^{Ab}	9	11.4 \pm 6.2	3	36.7 \pm 4.7 ^{Aa}
	D4	194	180	92.1 \pm 9.5	34	19.6 \pm 17.2 ^{Bc}	14	7.9 \pm 9.5	1	3.1 \pm 6.3 ^{Bb}
	D6	61	60	98.1 \pm 3.2	16	28.8 \pm 27.6 ^{Bc}	1	1.9 \pm 3.2	0	0.0 \pm 0.0 ^{Bb}

A-B: Different letters in the same column indicate significant difference between fresh and cryopreserved groups in the same days of analysis

a-c: Different letters in the same column indicate significant difference between days of analysis within each group (Fresh or Cryopreserved)

At every time-point analyzed, the percentage of primordial follicles (88.2-98.1%) was higher than that of growing follicles (1.9-11.8%). The percentage of MN follicles, both primordial and growing, was significantly lower ($P < 0.05$) in cryopreserved tissue than in fresh tissue for non-transplanted samples (D0). Similarly, on D4 and D6 post-transplantation a significant lower ($P < 0.05$) percentage of MN primordial and growing follicles was observed in cryopreserved samples compared to fresh samples. In general, there was a significant decrease ($P < 0.05$) in the percentage of MN primordial and growing

follicles after transplantation compared to non-transplanted tissue (D0), both for fresh and cryopreserved samples. However, it is important to emphasize that the number of follicles found in the samples was considerably smaller after grafting, both in fresh and cryopreserved tissue.

The most common types of degeneration found in all groups were: totally degenerated follicle (42.6%), oocyte detached from granulosa cells (19.9%), oocyte with pyknotic nucleus (18.6%), shrunken oocyte (10.4%), vacuoles in the ooplasm (5.9 %) and follicle detached from the stroma (2.6%). Examples of MN and degenerate follicles are presented in Figure 1.4.

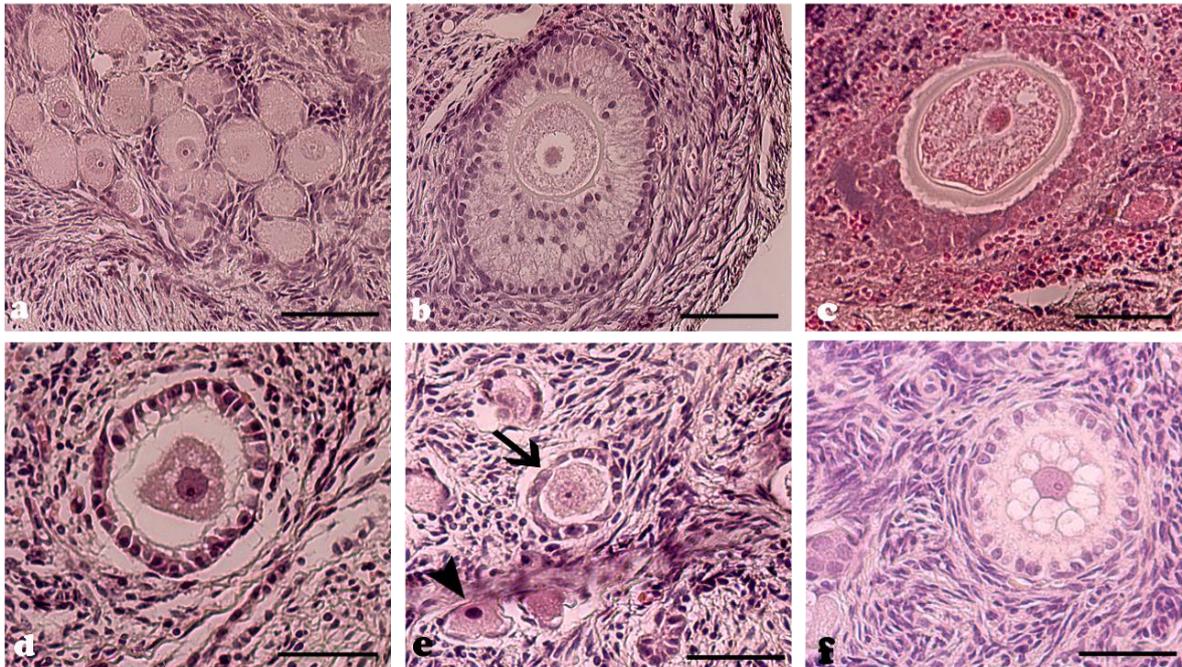


Figure 1.4 Representative micrographs of morphologically normal (MN) and degenerated follicles. a) MN primordial follicles; b) MN growing follicle; c) totally degenerated growing follicle; d) growing follicle with shrunken oocyte, e) a growing follicle with oocyte detached from granulosa cells (arrow) and a primordial follicle with pyknotic of oocyte nucleus (arrowhead), and f) growing follicle with vacuoles in the ooplasm. Bars = 50 μ m.

DISCUSSION

The results of this study showed that the reperfusion of ovarian tissue from domestic cats autotransplanted to subcutaneous tissue occurs within four days after grafting, with no difference between fresh and cryopreserved tissues. Previous works have already proved that revascularization times of ovarian tissue grafts differ among species. In rats, fresh ovarian tissue autografted under the muscular fascia was profusely revascularized within 48 hours (Dissen *et al.*, 1994). In sheep, complete revascularization of cryopreserved ovarian cortex autografted to the ovarian pedicle took approximately 7 days (Gosden *et al.*, 1994). In human cryopreserved ovarian cortex xenotransplanted to the peritoneum of nude mice, revascularization begun approximately 5 days after transplantation, but the foreign tissue was completely revascularized only after 10 days post-transplantation (Van Eyck *et al.*, 2010). The percentage of total tissue area occupied by blood vessels in transplanted cat ovarian tissue, both fresh and cryopreserved, was comparable with that observed in human ovarian tissue xenotransplanted to mice, in which 1.27% and 2.02% of ovarian tissue area was occupied by blood vessels on days 3 and 5 post-transplantation (Van Eyck *et al.*, 2010).

The increase in vascularization observed in the histological sections on D4 post-transplantation was corroborated by ultrasound findings. However, while immunostaining showed an increase in vascularization until D4, doppler ultrasound analysis showed a continuous improvement of vascularization adjacent to the fragments until D6 post-transplantation. This difference is probably due to differences in accuracy between the two techniques. Color doppler ultrasound is the most appropriate noninvasive imaging exam for investigating vascularization of transplants (Crossin *et al.*, 2003). For most organ transplants, doppler ultrasound is an excellent technique for graft follow-up,

as it allows for monitoring blood flow and for identifying any problems relating to it, such as thrombosis, embolism or ischemia (Delgado-Moraleda *et al.*, 2019). Especially in the case of ovarian tissue transplants, this technique has been used for monitoring the success of blood vessels anastomosis performed in ovarian tissue transplantation to the subcutaneous tissue in humans (Hilders *et al.*, 2004). In the present study, doppler analysis allowed for the observation of neovascularization adjacent to the ovarian tissue fragment transplanted to subcutaneous tissue.

Regarding the percentage of MN follicles observed in the transplanted ovarian tissue, the results of the present study are similar to those described by others with both fresh (Leonel *et al.*, 2018b) and cryopreserved (Vilela *et al.*, 2019) ovarian tissue autograft in domestic cats. For instance, the percentage of MN follicles in this study on D6 after transplantation (~58%) was similar to that of Leonel *et al.*, (2018b) on D7 after transplantation (68.7%) of fresh ovarian tissue. Considering previously cryopreserved ovarian tissue, this study presented a percentage of MN follicles on D6 after transplantation (~29%) similar to that of Vilela *et al.*, (2019) on D7 after transplantation (31%). However, even more important than the percentage of MN follicles, there was a great reduction in the number of follicles found in grafts. Follicular depletion was also observed when cat ovarian tissue was vitrified and xenotransplanted (Demeriel *et al.*, 2018), both immediately after vitrification, and after transplantation of fresh and vitrified tissue (even greater in this last case). This loss is commonly observed in ovarian tissue transplants (Li *et al.*, 2010a; Praxedes *et al.*, 2018), especially after cryopreservation (Nisolle *et al.*, 2000; Bosh *et al.*, 2004; Israely *et al.*, 2006; Nottola *et al.*, 2008; Dath *et al.*, 2010; Silber *et al.*, 2010; Wiedemann *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). This follicular depletion is also associated with a drastic reduction in graft size and

significant fibrosis that occurs in most transplants (Kim *et al.*, 2002) and is probably caused by ischemia. In fact, numerous authors observed that ischemia-reperfusion injuries occurring in ovarian tissue transplantation induce the depletion of 60 to 95% of the follicular reserve, including the loss of virtually the entire population of growing follicles (Aubard *et al.*, 1999; Baird *et al.*, 1999; Aubard 2003; Liu *et al.*, 2008).

Ischemia promotes energy depletion and reperfusion oxidative stress, which cause damages to lipids, DNA, enzymes and structural proteins, leading to cell death. Gene expression of some inflammatory factors is initiated in response to the hypoxia period promoting tissue destruction and fibrosis (reviewed by Donfack *et al.*, 2017). Moreover, reperfusion, while restoring the oxygen and nutrients essential for cellular metabolism and the removal of byproducts detrimental to cellular metabolism, can exacerbate tissue damage (Kalogeris *et al.*, 2012). Ischemic damage occurred within the first 24-48 hours after transplantation of ovarian tissue (Israely *et al.*, 2004). Another study, analyzing xenografted human ovarian tissue by electronic paramagnetic resonance oximetry (EPR), demonstrated that hypoxia lasts for 3-5 days and that partial oxygen pressure stabilizes only 10 days after transplantation (Van Eyck *et al.*, 2009). In an *in vitro* study with fresh and cryopreserved bovine ovarian tissue, Kim *et al.*, (2004) showed that both primordial follicles and ovarian stroma cells can tolerate three hours of ischemia with minimal damage, and that the percentage of apoptosis in both stroma cells and primordial follicles increases progressively until 48 hours. The percentage of apoptotic primordial follicles reaches ~25% in fresh tissue and ~60% in cryopreserved tissue after 48 hours of incubation (Kim *et al.*, 2004). Furthermore, stroma integrity is also essential for the neovascularization process and follicular survival after grafting (Demeestere *et al.*, 2009). Thus, transplant success depends on mechanisms capable of improving vascularization

and minimizing ischemic damage in ovarian grafts (Weissman *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002, 2004). In short, the time required for adequate reperfusion is critical for follicular survival and functional longevity of the transplanted tissue.

In conclusion, the present study shows that revascularization of autotransplanted ovarian tissue to the subcutaneous tissue in domestic cats occurs within four days after transplantation, regardless of whether the tissue is fresh or cryopreserved. However, a large follicular loss has been observed in the first days after transplantation, especially in cryopreserved tissue. Further studies may be proposed to try to reduce revascularization time, perhaps allowing for better follicle survival after transplantation of cryopreserved ovarian tissue.

REFERENCES

- Andersen CY, Kristensen SG (2015) Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. *Reprod Biomed Online* 31:128–131. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.05.002>
- Aubard Y, Piver P, Cognié Y, Fermeaux V, Poulin N, Driancourt MA (1999) Orthotopic and heterotopic autografts of frozen–thawed ovarian cortex in sheep. *Human Reproduction* 14(8):2149–54.
- Aubard Y (2003) Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 108:14–18. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(02\)00424-4](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(02)00424-4)
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG (1999) Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology* 140(1): 462-71. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6453>
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV, Bracketta BG (2004) Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 61: 581–94. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00244-9)
- Carrijo Jr, Marinho APS, Campos AA, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM (2010) Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cells Tissues Organs* 191:152–60. <https://doi.org/10.1159/000225935>
- Comizzoli P, Holt WV (2014) Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. In Holt, WV., Brown, JL., Comizzoli, P (ed) *Reproductive sciences in animal conservation*. Springer, New York, pp. 331-356

- Crossin JD, Muradali D, Wilson SR (2003) US of liver transplants: Normal and abnormal. *Radiographics* 23:1093–14. <https://doi.org/10.1148/rg.235035031>
- Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J, Van Langendonck A (2010) Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum Reprod* 25(7):1734–1743. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq131>
- Delgado-Moraleda JJ, Ballester-Vallés C, Marti-Bonmati L (2019) Role of imaging in the evaluation of vascular complications after liver transplantation. *Insights Imaging* 10(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0759-x>
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y (2009) Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod update*, 15(6): 649-665. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp021>
- Demirel MA, Acar DB, Ekim B, Çelikkan FT, Alkan KK, Salar S, Erdemli EA, Ozkavukcu S, Yar SS, Kanca H, Baştan A (2018) The evaluation of xenotransplantation of feline ovarian tissue vitrified by needle immersed vitrification technique into male immunodeficient mice. *Cell Tissue Bank* 19(1): 133-147. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9663-0>
- Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR (1994) Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 134(3): 1146-1154. <https://doi.org/10.1210/en.134.3.1146>
- Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Cordova A, Figueiredo JR, Smitz J, Rodrigues APR (2017). Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote* 25(4), 391-403. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000338>
- Donnez J, Dolmans MM (2017) Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med*. 377: 1657-65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676>
- Eimani H, Siadat SF, Eftekhari-Yazdi P, Parivar K, Valojerdi MR, Shahverdi A (2009) Comparative study between intact and non-intact intramuscular auto-grafted mouse ovaries. *Reprod Biomed online* 18(1): 53-60. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60424-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60424-5)
- Fossum TW (2007) Reproductive and Genital systems surgery. In: Fossum TW (ed.) *Small animal surgery textbook*, 3rd edn. Elsevier. St. Louis, Missouri, pp 729-745.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R (1994) Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 °C. *Hum Reprod* 9(4): 597-603. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138556>
- Hilders CG, Baranski AG, Peters L, Ramkhelawan A, Trimbos JB (2004) Successful human ovarian autotransplantation to the upper arm. *Cancer* 101(12): 2771-2778. <https://doi.org/10.1002/encr.20715>
- Hosoe, M., Furusawa, T., Noguchi, J., Tokunaga, T. (2008) Growth of follicles of various animals following ovarian grafting under the kidney capsules of immunodeficient mice. *Reprod Med Biol* 7(1): 45-54. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2007.00200.x>

- Israely T, Dafni H, Nevo N, Tsafiriri A, Neeman M (2004) Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med* 52(4): 741-750. <https://doi.org/10.1002/mrm.20203>
- Israely T, Nevo N, Harmelin A, Neeman M, Tsafiriri A (2006) Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissues. *Hum Reprod* 21(6): 1368–1379. <https://doi.org/10.1093/humrep/del010>
- IUCN. The IUCN red list of threatened species. 2019.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cel Mol Bio* 298: 229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Khalili MA, Dehghan M, Nazari S, Agha-Rahimi A (2014) Assessment of ovarian tissues autografted to various body sites followed by IVM in mouse. *Iran J Reprod Med* 12(3): 199. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4009574/>
- Kim SS, Soules MR, Battaglia DE (2002) Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fert Steril* 78(1): 77-82. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03144-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03144-8)
- Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG (2004) Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fert Steril* 82(3): 679-85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.05.022>
- Kim S, Kang HG, Kim NH, Lee HC, Lee HH (2005) Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. *Hum Reprod* 20(9): 2502-2508. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei099>
- Lee J, Kong HS, Kim EJ, Youm HW, Lee JR, Suh CS, Kim SH (2016) Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: a comparative study between cryoinjury and ischemic injury. *Hum Reprod* 31(8): 1827–1837. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew144>
- Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, Jones J, Francisco J, Martinez-Hernandez FJ, Moreno JM, Vargas A, Martinez F and Soria B. (2009) Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal Reproduction Science* 112: 347–361 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.070>
- Leonel ECR, Vilela JMV, Carrilho DJ, Lucci CM (2018a) Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 83: 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.003>
- Leonel ECR, Vilela JMV, Paiva REG, Jivago JLPR, Amaral RS, Lucci CM (2018b) Restoration of fresh cat ovarian tissue function by autografting to subcutaneous tissue: A pilot study. *Theriogenology* 105: 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.016>
- Leonel ECR, Lucci CM, Amorim CA (2019) Cryopreservation of human ovarian tissue: A review. *Transfus Med Hemother* 46:173–181. <https://doi.org/10.1159/000499054>

- Leporrier M, Von Theobald P, Roffe JL, Muller G (1987) A new technique to protect ovarian function before pelvic irradiation: Heterotopic ovarian autotransplantation. *Cancer* 60(9): 2201-2204. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19871101\)60:9<2201::aid-cnrcr2820600915>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19871101)60:9<2201::aid-cnrcr2820600915>3.0.co;2-z)
- Li F, Tao Y, Zhang Y, Li Y, Fang F, Liu Y, Cao H, Zhang X, Zhou S (2010a) Follicle growth and oocyte development after ovary transplantation into back muscle of immune-intact adult castrated male mice. *Reproduction* 140(3): 465-476. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0076>
- Li F, Tao Y, Li Y, Cao H, Liu Y (2010b) Development of mouse ovaries in the back muscle of castrated male mice. *Journal of Nanjing Agricultural University* 33 83–90. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-NJNY201002017.htm
- Li Q, Szatmary P, Liu Y, Ding Z, Zhou J, Sun Y, Luo F, Wang Y, Zhu J (2015) Orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries and gonadotrophin releasing hormone analogues in the restoration of function following chemotherapy-induced ovarian damage. *PLoS One* 10(3): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120736>
- Li H, Cao H, Guo X, Wang H (2018) Cryovial monolayer vitrification for ovarian tissues cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 19:149–154. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9661-2>
- Liu L, Wood GA, Morikawa L, Ayearst R, Fleming C, McKerlie C (2008) Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. *Hum Reprod* 23(1): 122-128. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem348>
- Michel C (1993) Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. *Lab. Anim.* 27: 278–80. <https://doi.org/10.1258/002367793780745381>
- Morrell JM, Mayer I (2017). Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote* 25(5): 545-557. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000442>
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J (2000) Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fert Steril* 74(1):122-12. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00548-3)
- Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans M-M, Martinez-Madrid B, Correr S, Donnez J (2008) Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fert Steril* 90: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.069>
- Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z (2004) Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet* 363(9412): 837-840. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15728-0)
- Praxedes ECG, Lima GL, Bezerra LGP, Santos FA, Bezerra MB, Guerreiro DD, Rodrigues APR, Domingues SFS, Silva AR (2018) Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomised severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Reprod Fert Develop* 30: 459–468. <https://doi.org/10.1071/RD17051>

- Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G (2008) Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fert Steril* 89(6): 1787-1794. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.101>
- Silber S, Kagawa N, Kuwayama M and Gosden R (2010) Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fert Steril* 94(6): 2191-2196. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.073>
- Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, Cuvelier C, De Sutter, P. (2008) Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. *Hum Reprod* 23(3): 619-626. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem405>
- Soleimani R, Heytens E, Van den Broecke R, Rottiers I, Dhont M, Cuvelier CA, De Sutter P (2010) Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle. *Hum Reprod* 25(6): 1458-1470. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq055>
- Terazono T, Kaedei Y, Tanihara F, Namula Z, Viet VL, Takagi M, Inoue M, Sato Y, Taniguchi M, Otoi, T (2012) Follicle formation in the canine ovary after autografting to a peripheral site. *Reprod Domest Anim* 47(2):16-21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01880.x>
- Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J (2009). Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fert Steril* 92(1): 374-81. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.012>
- Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J, Dolmans M-M (2010) Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. *Fert Steril* 93(5): 1676-1685. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>
- Vilela J.M.V., Leonel E.C.R., Gonçalves L.P., Paiva R.E.G., Amaral R.S., Amorim C.A. and Lucci C.M. 2019. "Function of Cryopreserved Cat Ovarian Tissue after Autotransplantation" *Animals*,1065: 1-13. <https://doi.org/10.3390/ani9121065>
- Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF (1999) Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod* 60(6): 1462-1467. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1462>
- Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmusen K, Andersen CY, Kristensen SG, Jewgenow K (2012) Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reprod Domest Anim* 47(6): 300-304. <https://doi.org/10.1111/rda.12081>
- Wolff M, Stute P (2015) Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue exclusively to postpone menopause: technically possible but endocrinologically doubtful. *Reprod Biomed Online* 31(6): 718-721. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.010>

Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS, Kim SH (2015) Transplantation of mouse ovarian tissue: comparison of the transplantation sites. *Theriogenology* 83(5): 854-861. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.026>

Zhou X-H, Zhang D, Shi J, Wu Y-J (2016) Comparison of vitrification and conventional slow freezing for cryopreservation of ovarian tissues with respect to the number of intact primordial follicles: A meta-analysis. *Medicine* 95(39): 1-7. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000004095>

CAPÍTULO II
***ANÁLISE DOS EFEITOS DA SIVASTATINA NO
AUTOTRANSPLANTE HETEROTÓPICO DE TECIDO OVARIANO
CRIOPRESERVADO DE GATAS***

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da sinvastatina no desenvolvimento folicular e na revascularização do tecido ovariano de gatas criopreservado e autotransplantado. Os animais foram divididos em grupo controle (sem administração de sinvastatina (n=4)) e grupo sinvastatina (5 mg/kg V.O.(n=4)). Dos ovários de cada gata foram retirados oito fragmentos (~5x3x3 mm), dos quais um foi imediatamente fixado (D0 fresco) e os demais criopreservados (congelamento lento com DMSO 1,5 M). Após o descongelamento, um foi fixado como controle da criopreservação (D0 crio) e os seis restantes transplantados para o subcutâneo do dorso das gatas. Os fragmentos transplantados foram recuperados nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 pós-transplante, processados para histologia e avaliados quando ao número e aspecto dos folículos, proliferação celular e vascularização. No geral, em ambos os grupos houve uma diminuição intensa do número de folículos encontrados, tanto total quanto os morfológicamente normais (MN). Foram encontrados dois folículos antrais no D28 do grupo Controle e quatro folículos em crescimento nos D14, D21 e D63 no grupo Sinvastatina, todos com células da granulosa proliferativas. Estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem a presença de ovócito (CGJ), foram comumente encontradas no material transplantado. Não foi observado aumento na porcentagem da área de vasos após o transplante entre os grupos Controle e Sinvastatina. Em conclusão, a sinvastatina não promoveu a melhora no desenvolvimento folicular após transplante de tecido ovariano de gatas criopreservado.

INTRODUÇÃO

A criobiologia é a forma mais eficaz de preservar o germoplasma de animais. Por este motivo, essa biotecnologia é tão importante no que tange a problemática de vulnerabilidade e/ou risco de extinção que algumas espécies enfrentam, em especial as selvagens. Mais especificamente em felinos, dentre todas as espécies que a família *Felidae* engloba, o gato doméstico é uma das poucas espécies que está fora de vulnerabilidade (Red List – (IUCN)) e, não somente por este motivo, mas também pela semelhança filogenética com os felinos selvagens, estes animais se tornam um excelente modelo experimental.

Para agir propriamente na ameaça de extinção destes animais é necessário não somente a preservação do germoplasma, mas também uma maneira eficiente de promover o desenvolvimento folicular. Para tanto, o transplante do tecido ovariano previamente congelado é uma ferramenta promissora, uma vez que a técnica possibilita o desenvolvimento folicular *in vivo*. Esta metodologia já se encontra muito bem estabelecida em humanos no quais o autotransplante de tecido ovariano criopreservado já é utilizado com sucesso, inclusive com vários nascimentos relatados na literatura (Anderson *et al.*, 2017).

Porém, em felinos, há muitos poucos estudos nesta vertente. O autotransplante de tecido ovariano fresco para o tecido subcutâneo apresentou resultados relevantes, uma vez que a porcentagem de folículos primordiais MN foi superior a 80%, exceto no dia sete pós-transplante. Assim como foram encontrados um folículo antral, um folículo luteinizado e dois folículos pré-antrais, atestando o sucesso no desenvolvimento folicular com o autotransplante (Leonel *et al.*, 2018). No entanto, como na prática dos trabalhos em animais com risco de extinção é necessário o congelamento do material, era iminente

entender como o desenvolvimento do tecido ovariano previamente criopreservado ocorreria quando transplantado. Diante desta necessidade, um estudo com autotransplante de tecido ovariano criopreservado (congelamento lento com DMSO a 1,5M) demonstrou uma perda folicular massiva, principalmente no dia sete pós-transplante, apesar de terem sido encontrados dois folículos antrais após 28 dias de transplante. Além disto, a vascularização no transplante só foi observada 7 dias após o enxerto, e vasos sanguíneos mais calibrosos foram visíveis somente após o dia 49 (Vilela *et al.*, 2019).

Assim como o demonstrado por Vilela e colaboradores (2019) em felinos, vários outros estudos demonstram que em outras espécies também há uma enorme perda folicular, de aproximadamente 80% da reserva de folículos primordiais inicial, imediatamente após o transplante (Dath *et al.*, 2010, Gavish *et al.*, 2017). Uma das principais causas da morte folicular é o período de isquemia ao qual o tecido transplantado é exposto antes da reperfusão no enxerto (Van Eyck *et al.*, 2010). A extensão dos danos e da morte celular é proporcional ao período em que o tecido ou órgão é exposto a isquemia. Desta forma o reestabelecimento do fluxo sanguíneo no local o mais rápido possível é fundamental para uma maior sobrevivência celular do transplante (Kalogeris *et al.*, 2014). Estes processos isquêmicos acabam promovendo a produção de mediadores inflamatórios, além de espécies reativas de oxigênio no local de transplante e no tecido transplantado, causando danos irreversíveis ao tecido (revisado por Demeestere *et al.*, 2009).

Dessa forma, a redução do tempo de isquemia pode ser uma alternativa para evitar os danos ao tecido transplantado. Para tanto, inúmeras substâncias têm sido testadas na tentativa de acelerar o tempo de revascularização dos transplantes (revisado por Roness & Meiorow, 2019). Agentes antioxidantes (vitamina E - Nugent *et al.*, 1998, vitamina C -

Tavasoli *et al.*, 2018, N-acetilcisteína - Mahmoodi *et al.*, 2015), fatores de crescimento (bFGF - Gao *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2015; Tanaka *et al.*, 2018, VEGF - Shikanov *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013), hormônios (HMG - Wang *et al.*, 2012) e fármacos (eritropoietina - Mahmoodi *et al.*, 2014, Sinvastatina – Lee *et al.*, 2015ab) são alguns exemplos. Especificamente em felinos, Macêdo e colaboradores (2018) relataram que o uso de ECG, em xenotransplante de tecido ovariano de gatas domésticas para camundongos, promoveu a melhora da revascularização após 45 dias de transplante.

A sinvastatina, se destaca como fármaco utilizado em transplantes para indução rápida da revascularização, já sendo empregada em transplantes de pulmão (Naidu *et al.*, 2003), coração (Tuuminen *et al.*, 2011, 2013a; Nykanena *et al.*, 2013; Lukac *et al.*, 2018), fígado (Gracia-Sancho *et al.*, 2013) e rim (Teshiman *et al.*, 2012; Tuuminen *et al.*, 2013b Holmström *et al.*, 2018). Apesar de serem mais comumente utilizadas para o controle dos níveis de colesterol sérico, as estatinas possuem ação angiogênica, anti-inflamatória e de inibição de apoptose e redução do estresse oxidativo celular (Weis *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2012). A administração oral de sinvastatina horas antes da OSH promoveu melhora na vascularização do tecido enxertado e uma maior preservação dos folículos primordiais normais em camundongos, tanto sozinha (Lee *et al.*, 2015a) como associada à metilprednisolona (Lee *et al.*, 2015b).

Diante dos resultados da primeira etapa deste estudo que demonstrou que a revascularização de autotransplante de tecido ovariano de felinos ocorre até o quarto dia pós-transplante e uma intensa depleção folicular, especialmente nos seis primeiros dias de transplante, o presente capítulo pretende testar a hipótese de que a sinvastatina promova melhora na revascularização e conseqüentemente no desenvolvimento folicular

acarretando uma maior sobrevivência folicular em transplantes de tecido ovariano de gatas domésticas criopreservado.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas oito gatas adultas jovens (um a quatro anos), cíclicas, sem raça definida, provenientes de Centro de Controle de Zoonoses (DIVAL), negativas para FIV e FELV e mantidas conforme descrito anteriormente.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (protocolo nº 66718/2016). Após os experimentos todos os animais foram adotados.

Delineamento experimental

Os oito animais foram divididos em dois grupos distintos:

- **Grupo sinvastatina** (n=4) – cada animal recebeu 5 mg/kg de sinvastatina (Medley ®), via oral, quatro horas antes do procedimento de ovariectomia (adaptado de Lee *et al.*, 2015a).
- **Grupo Controle** (n=4) – não recebeu sinvastatina.

Do par de ovários de cada gata foram retirados oito fragmentos de mesmo tamanho (~5x3x3 mm), dos quais um foi imediatamente fixado (D0 Fresco) e os outros sete foram criopreservados. Sete dias após a criopreservação, os fragmentos foram descongelados e um deles fixado (D0 Crio). Os outros seis fragmentos foram autotransplantados para o tecido subcutâneo da região dorsal do pescoço das gatas.

Os fragmentos transplantados foram retirados nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 pós-transplante, fixados e processados para histologia, para quantificação e classificação dos

folículos ovarianos, avaliação de fibrose (histoquímica de Tricrômico de Gomori), análise de proliferação celular (imunohistoquímica para Ki67) e análise da vascularização (histoquímica para Von Willebrand).

Um desenho esquemático do delineamento experimental é apresentado na Figura 2.1.

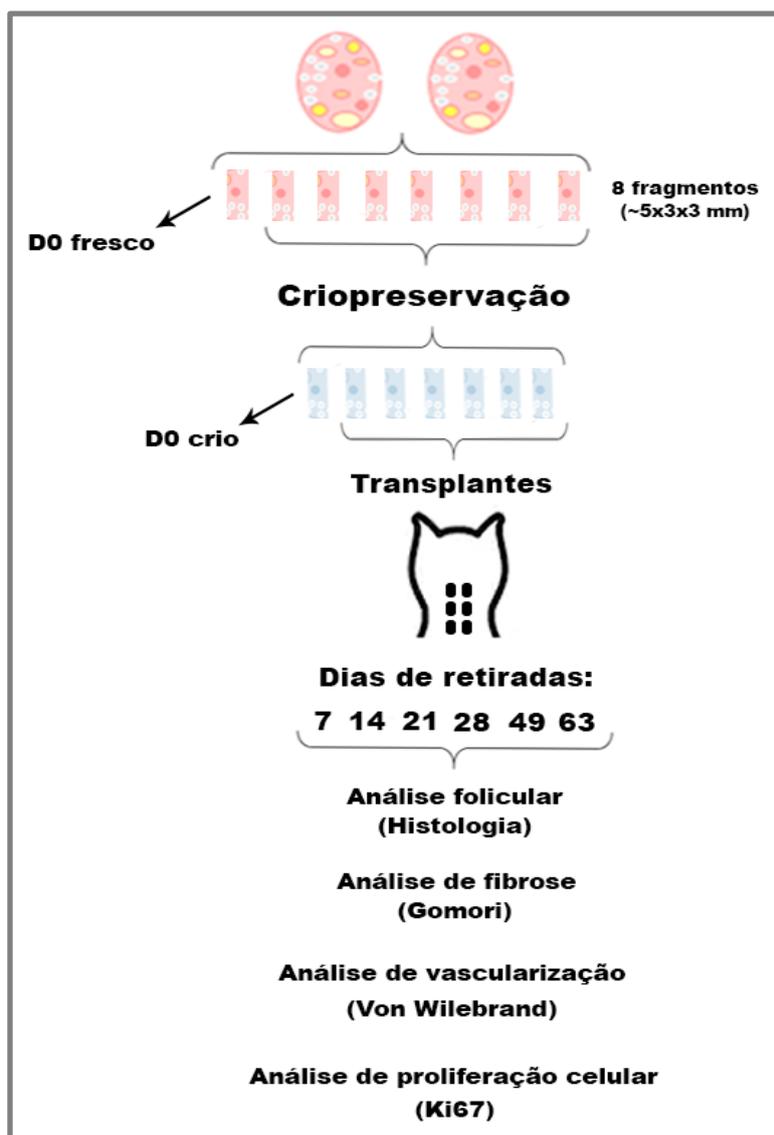


Figura 2.1. Delineamento Experimental. Desenho esquemático do delineamento experimental começando com a fragmentação dos ovários de cada animal em oito fragmentos (~5x3x3 mm), a criopreservação das amostras, o transplante para o tecido subcutâneo do dorso dos animais, as retiradas dos fragmentos nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 e as análises de histologia, fibrose, vascularização e proliferação celular realizada no tecido ovariano.

Protocolo de criopreservação

O protocolo de criopreservação foi baseado no descrito por Leonel *et al.*, (2018a). Os fragmentos destinados a criopreservação foram colocados em criotubos contendo 1 ml de solução de crioprotetores que continha DMEM contendo 0,4% sacarose, 10% SFB e 1,5M DMSO.

Após o material ser mantido em equilíbrio, à temperatura de 10 °C por 10 minutos, os criotubos foram inseridos na máquina de congelamento programável (*Dominium K - Biocom*) e foi iniciada a primeira curva de congelamento, na qual houve a diminuição de 2 °C por minutos até que chegasse à temperatura de -7 °C. Neste momento foi induzida a cristalização (*seeding*). Em seguida, foi feita a segunda curva com o decaimento de 0,3 °C por minuto. Após atingida a temperatura final de -35 °C, os criotubos foram armazenados imediatamente no botijão de nitrogênio líquido.

Após sete dias, o material foi retirado do nitrogênio líquido e os criotubos ficaram por um minuto à temperatura ambiente e depois foram colocados em banho-maria, a 38 °C. Após verificado o descongelamento total do material foi iniciada a retirada dos crioprotetores através de três lavagens de cada amostra, por cinco minutos cada, em soluções contendo meio DMEM com 10% SFB e concentrações decrescentes de sacarose (0,4%, 0,2% e 0) e DMSO (0,75M, 0,37M e 0) em banho-maria a 38 °C. Finalizada a etapa de retirada dos crioprotetores, um fragmento foi fixado como controle da criopreservação (D0 crio) e os demais fragmentos foram lavados em soro fisiológico iodado 1% e imediatamente transplantados para o tecido subcutâneo do dorso das gatas.

Procedimento cirúrgico e anestésico

No dia da cirurgia de ovariectomia (OSH) foi realizada uma pré-anestesia, utilizando Xilazina (0,5 mg/kg), Ketamina (5 mg/kg) e Morfina (0,2 mg/kg), via

intramuscular. A indução anestésica foi realizada com a administração de Propofol (dose/efeito) e a manutenção realizada com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100%. Cada animal também recebeu uma dose profilática de antibiótico (Ceftriaxona - 25 mg/kg) e anti-inflamatório (Meloxicam - 0,1 mg/kg). Após a realização da OSH, dos ovários das gatas foram retirados todo o tecido adiposo e ligamentos e lavados em solução salina. Oito fragmentos de aproximadamente 5x3x3 mm foram retirados de ambos ovários de cada gata com o auxílio de um papel milimetrado.

Para realizar os transplantes dos fragmentos ovarianos foi feita uma pré-anestesia com uma dose de Ketamina (2 mg/kg) e Diazepam (0,2 mg/kg), via intramuscular. Posteriormente a indução anestésica foi realizada com a administração de Propofol (dose/efeito) e a manutenção realizada com Isoflurano vaporizado em oxigênio a 100%. Durante o processo anestésico os fragmentos foram descongelados, lavados em uma solução salina estéril de iodo 1% e após o animal sedado os fragmentos foram implantados em incisões de aproximadamente 1cm feitas diretamente na pele do animal na região dorsal do pescoço. Os fragmentos foram fixados diretamente no tecido subcutâneo com um ponto no músculo subjacente e logo em seguida as incisões de pele foram suturadas. Imediatamente após as suturas cada gata recebeu uma dose de vitamina E (5 mg / kg I.M. - Monovin E, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil).

Especificamente nos momentos de retirada dos implantes, além do mesmo protocolo anestésico usado para os transplantes, foi feita uma anestesia local com Bupvacaina (1mg/kg) diretamente na incisão antes da abertura para a retirada dos fragmentos, nos dias 7, 14, 21, 28, 49 e 63 após o transplante. As incisões de pele foram suturadas após a retirada dos fragmentos.

Processamento histológico

Todos os fragmentos foram destinados à histologia clássica, na qual foi realizada a fixação em paraformaldeído 4% tamponado por 48 horas.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em Xilol, e incluídas em Paraplast.

Foram feitos 250 cortes seriados de cada bloco, dos quais um a cada 5 foi montado em lâmina e corado com HE. Estes foram analisados em microscópio de luz e os folículos contados foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (primordiais ou em crescimento) e em morfológicamente normais ou degenerados. Os folículos analisados foram considerados normais quando a estrutura folicular estava preservada, ou seja, quando as células da granulosa estavam dispostas de forma ordenada ao redor de um ovócito que não possuísse grandes vacúolos e sem núcleo picnótico. As degenerações consideradas foram a presença de núcleos picnóticos nas células da granulosa ou no ovócito, ovócito retraído ou totalmente descolado das células da granulosa, ovócitos com vacúolos no citoplasma, folículos totalmente descolados do estroma ovariano.

Histoquímicas

Os cortes intermediários foram destinados à realização das análises de fibrose, vascularização e proliferação celular.

O grau de fibrose do tecido foi avaliado por coloração pelo Tricrômico de Gomori, que permite a visualização de tecido conjuntivo. Cortes dos fragmentos selecionados de forma aleatória foram desparafinizada, hidratadas e incubadas em solução de Bouin por 60 minutos em estufa a 56 °C. Em seguida foram corados os núcleos com Hematoxilina de Harris por 10 minutos, corados com a solução de Tricômico de Gomori por 15 minutos, lavados em água acética a 0,5% e feita a montagem das lâminas. A análise dos resultados

foi feita de forma subjetiva com o uso de cruces (+) para indicar a porcentagem de tecido conjuntivo no estroma ovariano. Cada uma das cruces é relativa a variação de 0 a 20%, ou seja, uma cruz (+) representou de 0 a 20% de tecido ovariano ocupado por conjuntivo, duas cruces (++) representou de 21 a 40% de tecido ovariano ocupado por conjuntivo e assim por diante até o máximo de quatro cruces (++++) representando 81 a 100% de tecido ovariano ocupado por conjuntivo.

Para a análise de vascularização, dois cortes representativos de cada fragmento foram submetidos a análise imunohistoquímica com o anticorpo de Von Willebrand (Polyclonal rabbit anti-human, 1:100, A0082, Dako Denmark A/S). A recuperação antigênica foi realizada imergindo as seções em tampão citrato e aquecer a 97 °C três vezes por 5 minutos cada. Em seguida, foi utilizado o kit Polymer Detection System (Novolink™, Leica Biosystems, Reino Unido). Resumidamente, o bloqueio endógeno da peroxidase foi realizado com peroxidase por 10 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio de reações proteicas inespecíficas com Protein Block por 5 minutos. As seções foram incubadas com anticorpo primário e amplificadas com a solução pós-primária por 60 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada a incubação com polímero por 60 minutos a temperatura de 37 °C. As seções foram então incubadas com solução de diaminobenzidina (DAB - K3468, Dako) e contrastadas com hematoxilina Harris.

Com o auxílio do software Image J (versão 1.x), mediu-se a área total de tecido ovariano e a área de todos os vasos imunomarcados e calculou-se a porcentagem da área de tecido ovariano ocupada por vasos sanguíneos.

A imunomarcção com anticorpo anti-Ki67 (Monoclonal mouse anti-human, 1:100, M7240, Dako Denmark A/S) foi realizada com o intuito de analisar a proliferação celular das células da granulosa nos folículos encontrados, assim como das células do estroma

ovariano. A metodologia desta imunohistoquímica foi idêntica ao protocolo para Von Willebrand anteriormente descrito. A análise dos resultados foi realizada com a contagem apenas dos folículos que possuíam a imunomarcção positiva das células da granulosa no material não transplantado (D0 fresco e D0 crio) e em todos os dias pós-transplante.

Análise estatística

O percentual da área de tecido ocupada por vasos em ambos os grupos controle e sinvastatina e entre os dias pós-transplante foi analisada por ANOVA e teste de Tukey, utilizando o programa Proc. GLM (SAS, Sistema de Análise, Inc, Cary, NC, EUA). A porcentagem de folículos morfológicamente normais e degenerados foi analisada entre os grupos controle e sinvastatina e entre os dias pós-transplante pelo teste Qui-quadrado de Pearson (Microsoft 187 Excel para Windows, EUA). As diferenças foram consideradas significativas apenas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Microscopia de luz

Foram analisados ao total 15.659 folículos nos fragmentos ovarianos das oito gatas de ambos os grupos controle e sinvastatina. Destes, 14.460 (92,3%) eram folículos primordiais e 1.199 (8,3%) folículos em crescimento. Imagens ilustrativas dos folículos primordiais e em crescimento encontrados estão representados na Figura 2.2.

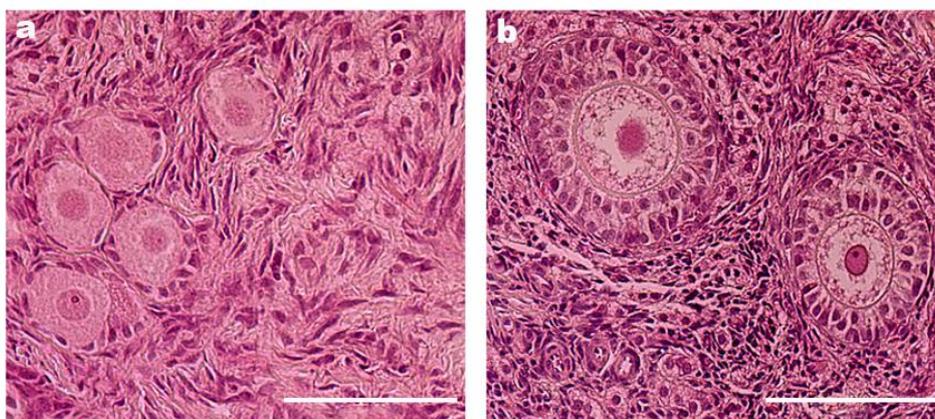


Figure 2.2. Imagens representativas dos folículos normais encontrados nos fragmentos de tecido ovariano. a) Folículos primordiais morfologicamente normais e b) Folículos em crescimento morfologicamente normais. Barras = 100 μ m.

O número total de folículos contado, os números e as porcentagem médias de folículos MN dentro das categorias de primordiais e em crescimento em todos os dias analisados são apresentados na Tabela 2 para o Grupo Controle, e na Tabela 3 para o Grupo Sinvastatina.

Tabela 2.1. Folículos totais, número de folículos MN e porcentagem dos folículos MN (\pm DP) dentro dos grupos de folículos primordiais e em crescimento nos dias D0 fresco, D0 crio e nos dias pós-transplante (D7, D14, D28, D49 e D63) do grupo Controle.

	<i>Total</i>	<i>Folículos Primordiais</i>			<i>Folículos Em crescimento</i>		
	<i>Folículos</i>	<i>n°</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	<i>n°</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>
<i>D0 Fresco</i>	1936	1874	1832	91,0 \pm 6,7 ^A	62	62	100,0 \pm 0,0 ^A
<i>D0 Crio</i>	1202	1122	826	74,2 \pm 8,4 ^{Ba}	80	57	88,5 \pm 23,0 ^{Ba}
<i>D7</i>	73	51	34	52,0 \pm 0,0 ^b	22	2	6,3 \pm 8,8 ^b
<i>D14</i>	55	2	2	100,0 \pm 0,0 ^c	53	0	0,0 \pm 0,0 ^c
<i>D21*</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>D28</i>	79	36	25	96,7 \pm 4,7 ^c	43	0	0,0 \pm 0,0 ^c
<i>D49</i>	0	0	0	0,0 \pm 0,0 ^d	0	0	0,0 \pm 0,0 ^c
<i>D63</i>	37	13	10	76,9 \pm 0,0 ^a	24	0	0,0 \pm 0,0 ^c

n°: número de folículos; *n° MN*: número de folículos morfolologicamente normais; *% MN*: porcentagem de folículos morfolologicamente normais.

* Fragmentos de D21 foram perdidos devido ao um problema técnico.

A-B: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos Controle (P <0,05).

a-d: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P <0,05).

Tabela 2.2. Folículos totais, número de folículos MN e porcentagem dos folículos MN (\pm DP) dentro dos grupos de folículos primordiais e em crescimento nos dias D0 fresco, D0 crio e nos dias pós-transplante (D7, D14, D21, D28, D49 e D63) do grupo Sinvastatina.

	<i>Total</i>	<i>Folículos Primordiais</i>			<i>Folículos Em crescimento</i>		
	<i>Folículos</i>	<i>n°</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>	<i>n°</i>	<i>n° MN</i>	<i>% MN</i>
<i>D0 Fresco</i>	7701	7347	7004	95,1 \pm 1,1 ^A	354	343	96,9 \pm 1,1 ^A
<i>D0 Crio</i>	4047	3804	2808	75,1 \pm 9,7 ^{Ba}	243	117	49,9 \pm 14,9 ^{Ba}
<i>D7</i>	113	91	36	56,4 \pm 51,2 ^b	22	1	2,4 \pm 4,1 ^b
<i>D14</i>	174	67	56	57,5 \pm 49,9 ^b	107	2	1,4 \pm 2,5 ^b
<i>D21</i>	81	17	15	95,6 \pm 7,7 ^c	64	2	1,9 \pm 3,2 ^b
<i>D28</i>	107	23	18	78,3 \pm 0,0 ^a	84	0	0,0 \pm 0,0 ^b
<i>D49</i>	54	13	8	30,8 \pm 43,5 ^d	41	1	2,7 \pm 3,7 ^b
<i>D63</i>	49	8	4	57,2 \pm 60,6 ^b	41	1	1,4 \pm 2,0 ^b

n°: número de folículos; *n° MN*: número de folículos morfolologicamente normais; *% MN*: porcentagem de folículos morfolologicamente normais.

A-B: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os grupos Controle (P <0,05).

a-d: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P <0,05).

No grupo Controle foi possível observar uma diminuição significativa na porcentagem de folículos MN ($p < 0,05$) imediatamente após a criopreservação (D0 crio) tanto em relação aos folículos primordiais quanto aos em crescimento. Dentre os folículos primordiais foi observada uma redução acentuada no número de folículos totais e MN em todos os dias pós-transplante. No D7 houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de folículos MN em comparação ao D0 crio. Já nos dias D14 e D28 a porcentagem de folículos MN foi superior ao D0 crio ($P < 0,05$), enquanto D63 foi semelhante ao D0 crio. No dia D49 não foram encontrados folículos. Porém, é importante ressaltar que apesar de em D14 e D28 a porcentagem de folículos MN ter sido superior ao D0 crio, esta porcentagem é relativa a um número pequeno de folículos encontrados. Nos folículos em crescimento a diminuição no número e na porcentagem de folículos MN ($p < 0,05$) nos dias pós-transplante foi drástica, chegando a zero no dia D14 e se mantendo assim até D63.

No grupo Sinvastatina também houve uma diminuição significativa na porcentagem de folículos MN ($p < 0,05$) imediatamente após a criopreservação (D0 crio), tanto nos folículos primordiais quanto nos folículos em crescimento. Importante ressaltar que em todos os dias pós-transplantes, com exceção do D7, o número total de folículos contados foi maior na categoria de folículos em crescimento do que entre os primordiais, diferente do que foi observado no grupo Controle. Em relação aos folículos primordiais, foi observada uma redução no número total de folículos e no número de folículos MN em todos os dias de transplante em comparação com o D0 crio. A porcentagem de folículos MN nos dias D7, D14, D49 e D63 pós-transplante foi significativamente menor ($P < 0,05$) do que no D0 crio. Já no D21 e D28, esta porcentagem foi similar ou superior ao D0 crio ($p < 0,05$), lembrando que o número de folículos observados foi pequeno. Na categoria dos

folículos em crescimento, tanto o número quanto a porcentagem de folículos MN diminuíram de forma acentuada já nos sete primeiros dias de transplante, se mantendo muito baixos até o último dia (D63).

Os tipos de degeneração mais comumente encontrados antes e após o transplante foi semelhante entre os grupos Controle e Sinvastatina. O tipo mais encontrado foi de estruturas foliculares com as células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito (CGJ), com 85,5% e 78,9%, respectivamente nos grupos Controle e Sinvastatina. Em seguida, foram encontrados 8,8% e 16,2% de degeneração total e 1,9% e 1,6% ovócito descolado das células da granulosa, para os grupos Controle e Sinvastatina respectivamente.

Nas amostras não transplantadas os tipos mais comuns de degeneração não foram os mesmos das amostras transplantadas. No D0 fresco, os tipos mais comuns foram ovócito retraído, com 38,1% e 33,9%, ovócito descolado das células da granulosa, com 24,7% e 24%) e ovócito com núcleo picnótico, 14,3% e 38,1%, respectivamente nos grupos Controle e Sinvastatina. Já em D0 crio, o principal tipo de degeneração encontrado foi ovócito descolado das células da granulosa, com 72,4% no grupo Controle e 83,5% no grupo Sinvastatina, seguido de ovócito retraído (18,1% e 8,6%) e ovócito com núcleo picnótico (3,3% e 5,5%).

A degeneração mais comum após o transplante, que chamamos de estruturas foliculares com as células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito (CGJ) (Figura 2.3), em geral possuíam células da granulosa proliferativas (conforme evidenciado pela imunomarcção para Ki67). Estas estruturas praticamente não foram encontradas em tecido não transplantado. As porcentagens destas estruturas foliculares em relação ao total de folículos degenerados encontrados no tecido ovariano não

transplantado (D0 fresco e D0 crio) e em todos os dias de transplantes nos grupos controle e sinvastatina estão representados na Tabela 2.3.

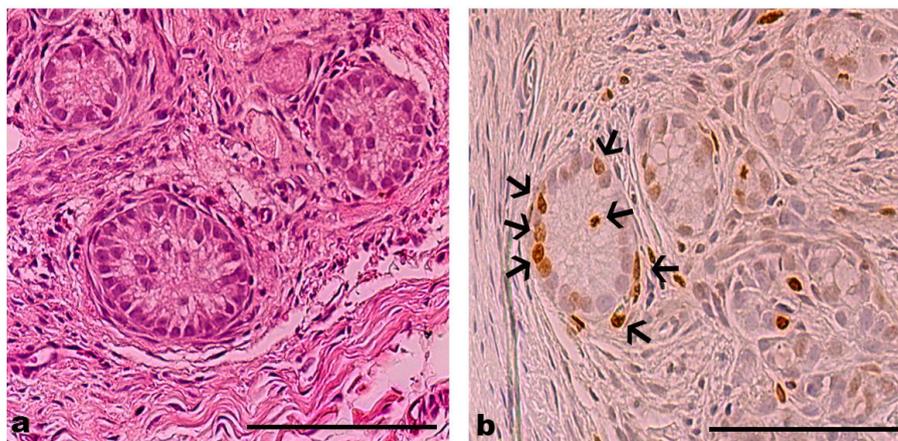


Figura 2.3. Imagens representativas das estruturas foliculares sem ovócito encontradas no tecido ovariano. a) estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem ovócito em coloração de hematoxilina e eosina. b) estruturas foliculares sem ovócito com células da granulosa justapostas imunomarcadas positivamente pela imunohistoquímica de Ki67 evidenciadas pelas setas pretas. Barras = 100µm.

Tabela 2.3. Porcentagem de estruturas foliculares com células da granulosa justapostas sem a presença do ovócito em relação aos folículos degenerados encontrados (% CGJ / Fols. Deg.) nos grupos controle e grupo sinvastatina

	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Sinvastatina</i>
	% (CGJ / Fol. Deg.)	% (CGJ / Fol. Deg.)
<i>D0 Fresco</i>	0% (0/72)	0,8% (3/354)
<i>D0 Crio</i>	2,2% (8/352)	0% (0/1122)
<i>D7</i>	56,8% (25/44)	31,3% (26/83)
<i>D14</i>	100% (62/62)	89,5% (103/115)
<i>D21</i>	*	97,2% (70/72)
<i>D28</i>	98,2% (57/58)	93,6% (89/95)
<i>D49</i>	100% (10/10)	83,6% (41/49)
<i>D63</i>	91,66% (33/36)	87,2% (41/47)

* Dados do dia D21, no grupo controle, foram perdidos.

Análise de proliferação celular

No grupo de animais controle que não receberam a administração de sinvastatina, foram encontrados dois folículos antrais no dia D28 pós-transplante em um dos animais.

Ambos possuíam células da granulosa proliferativas. Os folículos em crescimento encontrados nos animais do grupo sinvastatina também apresentavam células da granulosa proliferativas (Figura 2.4).

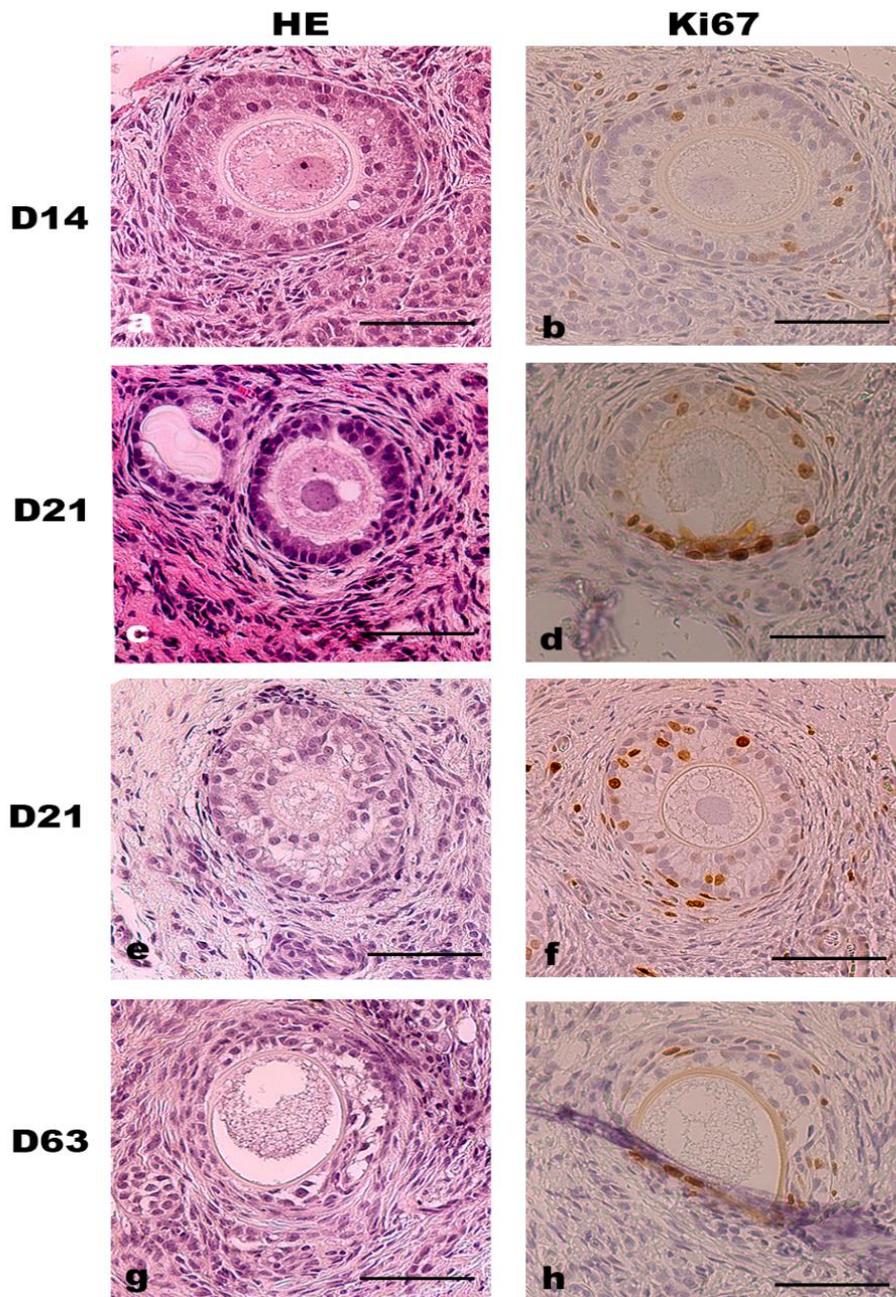


Figura 2.4. Imagens representativas dos folículos em crescimento encontrados nos dias 14, 21 e 63 pós-transplante, corados em hematoxilina e eosina (a, c, e, g) e os mesmos folículos com células da granulosa marcadas positivamente em marrom pela imuno-histoquímica para Ki67 (b, d, f, h). Barra = 100 μ m.

Dentre os folículos primordiais encontrados não houve células da granulosa imunomarcadas, portanto, não proliferativas, devido ao estado de quiescência em que elas se mantêm. Além disso, as células do estroma ovariano também se mostraram proliferativas (Figura 2.5).

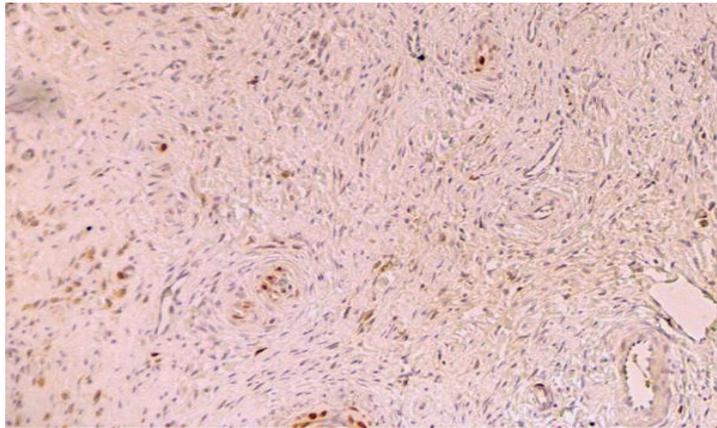


Figura 2.5. Figura representativa das células proliferativas do estroma ovariano em tecido transplantado.

Análise de fibrose

A análise de fibrose, feita através da coloração com Tricrômico de Gomori, demonstrou que em ambos os grupos Controle e Sinvastatina houve um aumento do tecido conjuntivo progressivo até o último dia pós-transplante, em especial no grupo Sinvastatina que no dia D63 possuía em média de 80 a 100% do estroma ocupado por tecido conjuntivo (Tabela 2.4, Figura 2.6).

Tabela 2.4. Classificação (em +) da área de tecido conjuntivo nos dias D0 fresco e criopreservado e nos dias pós-transplante (D7, D14, D21, D28, D49 e D63) para os grupos controle e sinvastatina.

	<i>D0 Fresco</i>	<i>D0 Crio</i>	<i>D7</i>	<i>D14</i>	<i>D21</i>	<i>D28</i>	<i>D49</i>	<i>D63</i>
Grupo Controle	+	+	++	++	*	+++	++++	+++
Grupo Sinvastatina	+	+	++	+++	+++	++++	+++	++++

+: 0-20% de tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
 ++: 20-40% de tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
 +++: 40-60% de tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
 ++++: 60-80% de tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
 +++++: 80-100% de tecido ovariano ocupado por tecido conjuntivo
 * Dados do dia D21, no grupo controle, foram perdidos.

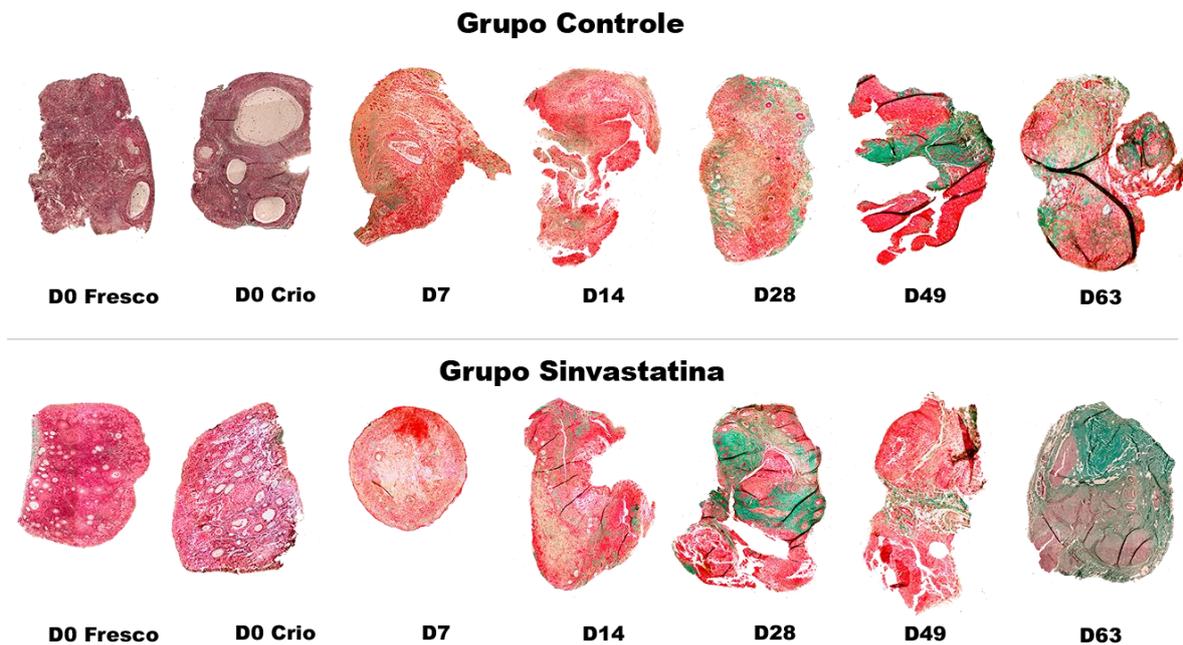


Figura 2.6. Imagem representativa do tecido ovariano corado pelo Tricrômico de Gomori nos dias D0 fresco e D0 crio e nos dias pós-transplante (7, 14, 28, 49 e 63). A marcação em verde representa o tecido conjuntivo, evidenciando a fibrose induzida no material transplantado.

Áreas de inflamação no estroma ovariano foram comumente observadas em todos os dias pós-transplante em ambos os grupos (controle e sinvastatina). Nestes processos inflamatórios encontrados foram observadas muitas hemácias e células brancas (macrófagos, neutrófilos etc.) infiltradas no estroma ovariano transplantado, além de inúmeras células gigante multinucleadas características de um processo inflamatório crônico (Figura 2.7).

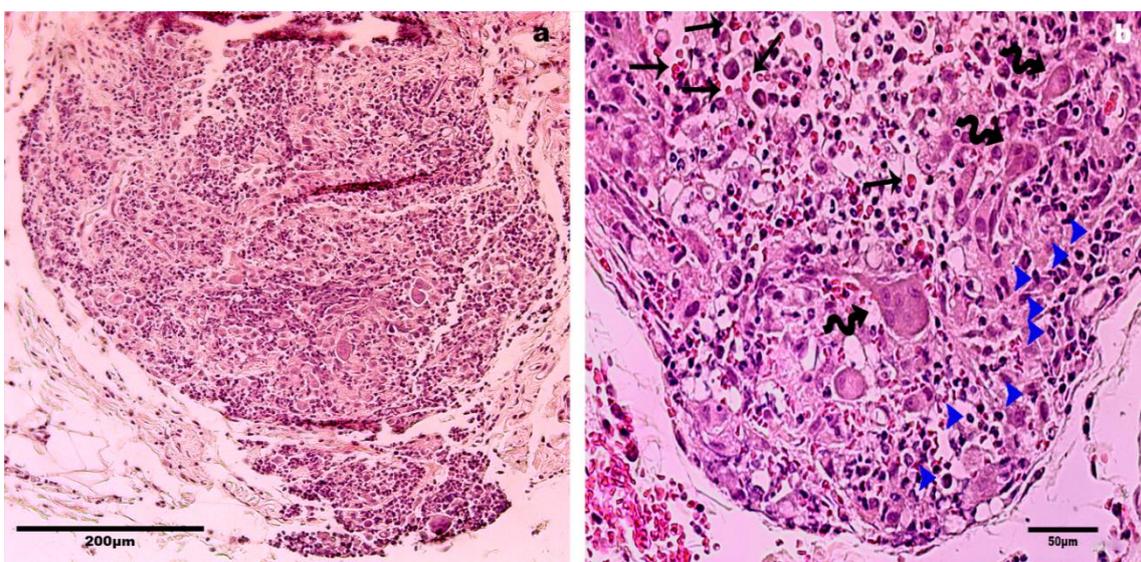


Figura 2.7. Áreas representativas de regiões de inflamação dos fragmentos transplantados. a) Região do estroma ovariano com uma grande área de processo inflamatório (barra = 200µm). b) Maior aumento de uma região de inflamação na qual é possível observar células imunológicas (cabeças de setas azuis), hemácias extravasadas no tecido inflamatório (setas pequenas pretas) e células gigantes multinucleadas características de inflamações crônicas (setas maiores onduladas) (barra = 50µm).

Análise de vascularização

A análise da área de vascularização não demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) em nenhum dos dias pós transplante e nem entre os grupos Controle e Sinvastatina (Figura 2.8 e 2.9).

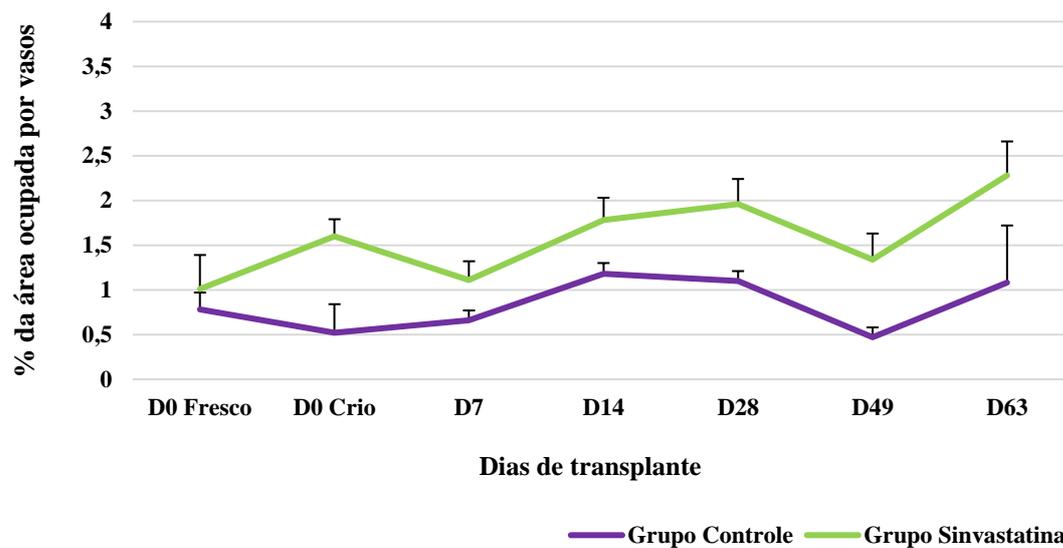


Figura 2.8. Percentual médio da área total de tecido ocupado por vasos sanguíneos nos fragmentos de tecido ovariano do grupo Controle e do grupo Simvastatina, antes do transplante (D0 fresco e D0 crio) e 7, 14, 28, 49 e 63 dias após o transplante.

* Indica diferença significativa entre os grupos controle e tratado no mesmo dia ($P < 0,05$).

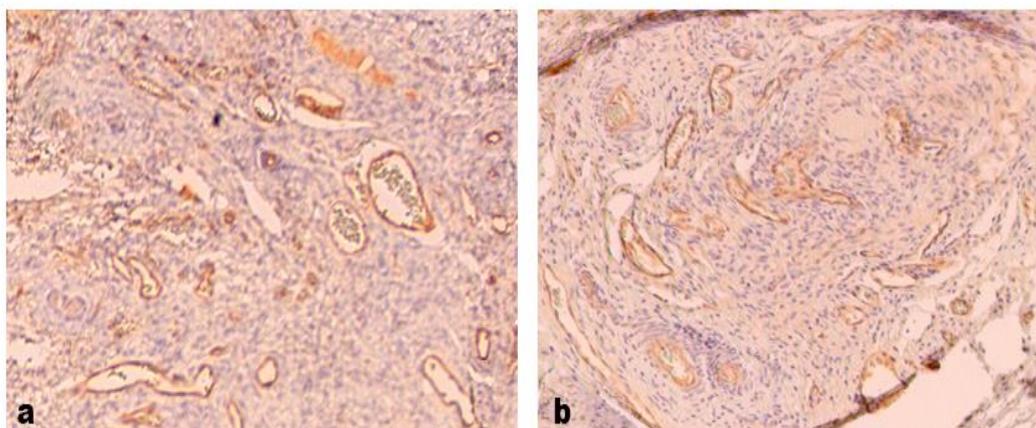


Figura 2.9. Imagens representativas dos vasos do estroma ovariano imunomarcadas por Von Willebrand. (a) tecido ovariano do grupo Controle e (b) tecido ovariano do grupo Simvastatina.

DISCUSSÃO

Diante da hipótese de que a grande perda folicular em transplante de tecido ovariano criopreservado de gatas doméstica seja decorrente do período de isquemia, o presente estudo teve como objetivo testar os efeitos da sinvastatina na revascularização e no desenvolvimento folicular pós-transplante.

Alguns estudos demonstraram que a sinvastatina possui um efeito direto na melhora da vascularização e na maior sobrevivência de folículos primordiais totais e MN após 21 de transplante em camundongos (Lee *et al.*, 2015ab). Diferentemente, os nossos resultados demonstraram que mesmo após a administração do fármaco, os grupos Controle e Sinvastatina possuíam vascularização semelhante em todos os dias pós transplante (D7, D14, D21, D49 e D63). Além disso, a perda folicular se manteve intensa após o transplante em ambos os grupos, em especial no D7 pós-transplante, assim como o encontrado por Vilela e colaboradores (2019). Esta depleção folicular é relatada também em xenotransplantes de tecido ovariano felino criopreservado (Bosh *et al.*, 2004; Wiedemann *et al.*, 2012; Demeriel *et al.*, 2018). Estes resultados não se limitam aos felinos, mas também ocorre em diferentes espécies (Praxedes *et al.*, 2018; revisado por Roness & Meiorow 2019), principalmente quando o material é previamente criopreservado (Israely *et al.*, 2006; Nottola *et al.*, 2008 ; Dath *et al.*, 2010; Silber *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016).

Há um consenso na literatura de que a perda de aproximadamente 85% da população folicular pós-transplante ocorre devido à isquemia inicial (revisado por Demeestere *et al.*, 2009; Gavish *et al.*, 2017). A isquemia é um fator crítico ao tecido ovariano criopreservado transplantado, até mais do que o próprio processo de congelamento. Vários estudos já demonstraram que o transplante em si é o principal

obstáculo para a sobrevivência folicular, tanto em tecido fresco como criopreservado, e tanto em xeno como em autotransplantes (Nisolle *et al.*, 2000; Jafarabadi *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016), inferindo que a morte folicular é consequência direta das lesões isquêmicas sofridas pelo tecido. A capacidade neoangiogênica da sinvastatina já é relatada na literatura como benéfica para a redução do tempo de revascularização em transplantes de diferentes órgãos (Naidu *et al.*, 2003; Wolfrum *et al.*, 2004; Tuuminen *et al.*, 2011; Teshiman *et al.*, 2012; Nykanena *et al.*, 2013; Gracia-Sancho *et al.*, 2013). Porém, em tecido ovariano, o uso deste fármaco é ainda limitado (Lee *et al.*, 2015ab), sendo este o primeiro trabalho em felinos.

O protocolo do presente estudo foi adaptado de Lee e colaboradores (2015ab), que administraram sinvastatina em camundongos 2 horas antes da remoção dos ovários para criopreservação e utilizaram a cápsula renal como local de transplante. O fato de termos mantido a mesma dose (5g/kg do animal) e optado por um local de transplante diferente, i.e. tecido subcutâneo, talvez tenha influenciado o potencial de ação da sinvastatina no tecido transplantado, fazendo com que não obtivéssemos os efeitos esperados. Além disso, o fato de que gatos possuem metabolismo mais lento do que camundongos (Reece C., 2007) pode também ter influenciado no resultado. Mesmo o presente trabalho tendo alterado o momento da administração da sinvastatina (de 2 para 4 h antes da OSH), considerando a diferença de metabolismo entre as espécies, o resultado não foi o esperado.

As demais ações anti-inflamatórias e anti-apoptóticas da sinvastatina citadas pelos estudos em transplantes de órgãos (Tuuminen *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2018; Nykanen *et al.*, 2019) parecem não ter ocorrido ou não terem sido suficientes para transplante de tecido ovariano em gatas com a metodologia aqui utilizada, uma vez que o processo

inflamatório e a fibrose demonstraram um aumento visível com o passar dos dias de transplante no presente trabalho, e semelhante em ambos os grupos (Controle e Sinvastatina). Da mesma forma que afeta os folículos ovarianos, o processo isquêmico promove danos irreversíveis também as células estromais. A substituição do estroma ovariano por tecido conjuntivo pode ter ocorrido como consequência do processo inflamatório exacerbado no transplante, que é promovido pelo estresse oxidativo crônico inerente a isquemia (Slegtenhorst *et al.*, 2014). O processo de fibrose crescente com o passar dos dias foi também relatado por outros grupos em enxertos de tecido ovariano criopreservado em comparação aos de tecido fresco (Nisolle *et al.*, 2000; Van Eyck *et al.*, 2009ab; Dath *et al.*, 2010).

Em conclusão, os efeitos da sinvastatina no autotransplante de tecido ovariano criopreservado de gatas domésticas não foram satisfatórios, pelo menos da forma com que foi utilizada no presente trabalho. Melhores resultados talvez possam ser alcançados com mudanças na dose e/ou no momento e/ou na forma da administração da sinvastatina. Ademais, uma possibilidade também é o teste de outros fármacos com potenciais neoangiogênicos.

REFERÊNCIAS

- Anderson RA, Wallace WHB and Telfer EE (2017) Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum Reprod*, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1093/hropen/hox001>
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV and Bracketta BG (2004) Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology* 61: 581–94. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00244-9)
- Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J and Van Langendonck A (2010) Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum Reprod*, 25(7):1734–1743. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq131>
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A and Englert Y (2009) Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod update* 15(6): 649–665. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp021>
- Demirel MA, Acar DB, Ekim B, Çelikkan FT, Alkan KK, Salar S, Erdemli EA, Ozkavukcu S, Yar SS, Kanca H and Baştan A (2018) The evaluation of xenotransplantation of feline ovarian tissue vitrified by needle immersed vitrification technique into male immunodeficient mice. *Cell Tissue Bank* 19(1): 133–147. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9663-0>
- Gao J, Yan J, Li R, Li M, Yan L, Wang T, Zhao H, Zhao Y, Yu Y and Qiao J (2013) Improvement in the quality of heterotopic allotransplanted mouse ovarian tissues with basic fibroblast growth factor and fibrin hydrogel *Hum Reprod*, 28(10): 2784–93. <https://doi.org/10.1093/humrep/det296>
- Gavish Z, Spector I, Peer G, Schlatt S, Wistuba J, Roness H and Meirow D (2017) Follicle activation is a significant and immediate cause of follicles loss after ovarian tissue transplantation *J Assist Reprod Genet*, 35(1): 61–69. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1079-z>
- Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Hide D, Marrone G, Guixé-Muntet S, Peralta C, García-Pagán JC, Abraldes JG and Bosch J (2013) Simvastatin maintains function and viability of steatotic rat livers procured for transplantation *J Hepatol*, 58: 1140–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.005>
- Holmström E, Helanterä I, Krebs R, Syrjälä S, Lempinen M, Nykänen A and Lemström K (2018) The impact of deceased donor simvastatin treatment on kidney transplant outcomes - results of a double-blinded, randomized controlled trial *Transplantation*, 102(7) 536. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000543383.36288.c9>
- Israely T, Nevo N, Harmelin A, Neeman M and Tsafirri A (2006) Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissues. *Hum Reprod*, 21(6): 1368–1379. <https://doi.org/10.1093/humrep/del010>
- Jafarabadi M, Abdollahi M and Salehnia M (2015) Assessment of vitrification outcome by xenotransplantation of ovarian cortex pieces in γ -irradiated mice: morphological and

- molecular analyses of apoptosis. *J Assist Reprod Genet*, 32(2): 195-205. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0382-1>
- Kalogeris T, Bao Y and Korthuis RJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia / reperfusion vs preconditioning *Redox Biology*, 2:702–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Kang B, Wang Y, Zhang L, Xiao Z, Li SW (2015) bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. *J Assist Reprod Genet*, 33(2): 281-89. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0628-6>
- Lee J, Lee JR, Youm HW, Suh CS, Kim SH (2015a) Effect of preoperative simvastatin treatment on transplantation of cryopreserved-warmed mouse ovarian tissue quality. *Theriogenology*, 83: 285–93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.027>
- Lee J, Kim EJ, Kong HS, Youm HW, Lee JR, Suh CS and Kim SH (2015b) A combination of simvastatin and methylprednisolone improves the quality of vitrified-warmed ovarian tissue after auto-transplantation. *Hum Reprod*, 30(11): 2627–38. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev222>
- Lee J, Kong HS, Kim EJ, Youm HW, Lee JR, Suh CS and Kim SH (2016) Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice: a comparative study between cryoinjury and ischemic injury. *Hum Reprod* 31(8): 1827–1837. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew144>
- Leonel ECR, Vilela JMV, Paiva REG, Jivago JLPR, Amaral RS and Lucci CM (2018) Restoration of fresh cat ovarian tissue function by autografting to subcutaneous tissue: A pilot study. *Theriogenology*, 105: 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.016>
- Li Q, Szatmary P, Liu Y, Ding Z, Zhou J, Sun Y, Luo F, Wang Y and Zhu J (2015) Orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries and gonadotrophin releasing hormone analogues in the restoration of function following chemotherapy-induced ovarian damage. *PLoS One*, 10(3): 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120736>
- Liu Z, Lai C, Zhanga X, Luo J, Huang X, Xiaoa Q, Wang W, Zhong Z, Xiaoli F, Li L, Xiong Y, Senninger N, Wang Y, Ye Q and Ye S (2018) Simvastatin ameliorates total liver ischemia/reperfusion injury via KLF2-mediated mechanism in rats. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 1166. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.08.014>
- Lukac J, Holmström E, Joenväärä S, Saraswat M and Krebs R (2018) Donor simvastatin treatment alters protein expression in the recipient after heart transplantation *J Heart Lung Transplant* 37(4S): 170. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.01.412>
- Mahmoodi M, Mehranjani MS, Shariatzadeh SMA, Eimani H and Shahverdi A (2014) Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts *Reproduction*, 147: 733–41. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0379>
- Mahmoodi M, Mehranjani MS, Shariatzadeh SMA, Eimani H and Shahverdi (2015) N-acetylcysteine improves function and follicular survival in mice ovarian grafts through inhibition of oxidative stress *Reprod Biomed Online*, 30: 101–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.013>

- Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga C and Mulligan MS (2003) Simvastatin ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126:482-89. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(03\)00699-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(03)00699-8)
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P and Donnez J (2000) Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice *Fert Steril* 74(1):122-12. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00548-3)
- Nottola SA, Camboni A, Van Langendonck A, Demylle D, Macchiarelli G, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Correr S and Donnez J (2008) Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study *Fert Steril* 90: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.069>
- Nykänen AI, Tuuminen R and Lemstrom KB (2013) Donor simvastatin treatment and cardiac allograft ischemia/reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*, 23: 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.09.005>
- Nykänen AI, Holmström EJ, Tuuminen R, Krebs R, Dhaygude K, Kankainen M, Jokinen JJ, Lommi J, Helanterä I, Räisänen-Sokolowski A, Syrjälä SO and Lemström KB (2019) Donor Simvastatin Treatment in Heart Transplantation. *Circulation*, 140. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039932>
- Praxedes ECG, Lima GL, Bezerra LGP, Santos FA, Bezerra MB, Guerreiro DD, Rodrigues APR, Domingues SFS. and Silva AR (2018) Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomised severe combined immunodeficiency (SCID) mice *Reprod Fert Develop*, 30: 459–468. <https://doi.org/10.1071/RD17051>
- Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV and Jackson RB (2015) Princípios Básicos da Forma e da Função dos Animais. In: *Biologia de Campbell*, 10th Edition, Artmed. Porto Alegre - RS. 867- 879.
- Roness H and Meirou D (2019) Follicle reserve loss in ovarian tissue transplantation *Reproduction*, 158: 35–44. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0097>
- Russo L, Gracia-Sancho J, García-Calderó H, Marrone G, García-Pagán JC, García-Cardenã G and Bosch J (2012) Addition of simvastatin to cold storage solution prevents endothelial dysfunction in explanted rat livers. *Hepatology* 55(3): 921-30. <https://doi.org/10.1002/hep.24755>
- Shikanov A, Zhang Z, Xu M, Smith RM, Rajan A, Woodruff TK and Shea LD (2011) Fibrin Encapsulation and Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Promotes Ovarian Graft Survival in Mice *Tissue Engineering*, 17: 3095-3104. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0204>
- Silber S, Kagawa N, Kuwayama M and Gosden R (2010) Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation *Fert Steril* 94(6): 2191-2196. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.12.073>
- Slegtenhorst BR, Dor FJMF, Rodriguez H, Voskuil FJ and Tullius SG (2014) Ischemia/Reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. *Curr Transpl Rep*, 1:147–154. <https://doi.org/10.1007/s40472-014-0017-6>

- Tanaka A, Nakamura H, Tabata Y, Fujimori Y, Kumasawa K and Kimura T (2018) Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model *J Obstet Gynaecol*, 44(10):1947-1955. <https://doi.org/10.1111/jog.13726>
- Tavasoli M, Azari O, Kheirandish R and Abbasi MF (2018) Evaluation of combination therapy with hydrocortisone, vitamin C and vitamin E in a rat model of intestine ischemia-reperfusion injury *Comp Clin Pathol*, 27:433–439. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2610-4>
- Teshima CAS, Watanabe M, Fonseca CD, Vattimo MFF (2012) Simvastatina e lesão renal aguda isquêmica em ratos. *Acta Paul Enferm*, 25(1):86-89. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002012000100015>
- Tuuminen R, Syrjala S, Krebs R, Keranen MAI, Koli K, Abo-Ramadan U, Neuvonen PJ, Tikkanen JM, Nykanen AI, Lemstrom KB (2011) Donor Simvastatin Treatment Abolishes Rat Cardiac Allograft Ischemia / Reperfusion Injury and Chronic. *Am Heart J*, 21: 1138-50. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005249>
- Tuuminen R, Syrjala S, Krebs R, Arnaudova R, Rouvinen E, Neuvonen PJ, Tikkanen JM, Nykanen AI, Lemstrom KB (2013a) Combined donor Simvastatin and Methylprednisolone treatment prevents ischemia-reperfusion injury in rat cardiac allografts through vasculoprotection and immunomodulation. *Transplantation*, 95(9): 1084-91. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182881b61>
- Tuuminen R, Nykanen AI, Saharinen P, Gautam P, Keranen MAI, Arnaudova R, Rouvinen E, Helin H, Tammi R, Rilla K, Krebs R and Lemstrom K B (2013b) Donor Simvastatin treatment prevents ischemia-reperfusion and acute kidney injury by preserving microvascular barrier function. *Am J Transplant* 13: 2019–34. <https://doi.org/10.1111/ajt.12315>
- Tuuminen R, Holmström E, Raissadati A, Saharinen P, Rouvinen E, Krebs R and Lemström KB (2016) Simvastatin pretreatment reduces caspase-9 and RIPK1 protein activity in rat cardiac allograft ischemia-reperfusion. *Transplant Immunology*, <https://doi.org/10.1016/j.trim.2016.05.001>
- Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J (2009) Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fert Steril*, 92(1): 374-81. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.012>
- Van Eyck AS, Bouzin C, Feron O, Romeu L, Van Langendonck A, Donnez J and Dolmans MM (2010) Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model *Fert Steril*, 93 (5): 1676-85. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.048>
- Vilela JMV, Leonel ECR, Gonçalves LP, Paiva REG, Amaral RS, Amorim CA and Lucci CM (2019) Function of Cryopreserved Cat Ovarian Tissue after Autotransplantation. *Animals*, 9 (1065): 1-13. <https://doi.org/10.3390/ani9121065>
- Wang Y, Chang Q, Sun J, Dang L, Ma W, Hei C, Shen X, Zhao C, Cai Y, Pei X, Zhang X, Wang Y, Jiang X (2012) Effects of HMG on revascularization and follicular survival

- in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, 24: 646–53. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.025>
- Wang Y, Ying Y, Ouyang Y, Wang J and Xu J (2013) VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J Assist Reprod Genet*, 30:1301–11. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0043-9>
- Weis M, Heeschen C, Glassford AJ and Cooke JP (2002) Statins Have Biphasic Effects on Angiogenesis. *Circulation*, 105: 739-45. <https://doi.org/10.1161/hc0602.103393>
- Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmusen K, Andersen CY, Kristensen SG and Jewgenow K (2012) Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse *Reprod Domest Anim*, 47(6): 300-304. <https://doi.org/10.1111/rda.12081>
- Wolfrum S, Dendorfer A, Schutt M, Weidtmann B, Heep A, Tempel K, Klein HH, Dominiak P and Richardt G (2004) Simvastatin Acutely Reduces Myocardial Reperfusion Injury In Vivo by Activating the Phosphatidylinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 44:348–355. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000137162.14735.30>

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que a vascularização de tecido ovariano de gatas domésticas ocorre até o quarto dia após ter sido autotransplantado, sendo este tempo semelhante tanto em tecido fresco quanto em criopreservado. Conhecer o tempo de revascularização é importante pois sabe-se que o período inicial em que o tecido transplantado fica sem oxigenação promove inúmeros danos isquêmicos, sendo estes muitas vezes irreversíveis, que provocam diretamente uma morte folicular intensa.

Devido a depleção folicular, já nos primeiros dias pós-transplante, amplamente reportada em trabalhos com transplante de tecido ovariano, especialmente em tecidos previamente criopreservados, diversos trabalhos têm se concentrado em promover formas de acelerar o tempo de revascularização com o intuito de minimizar as lesões isquêmicas e conseqüentemente diminuir a perda folicular. Para tanto, alguns fármacos já têm sido utilizados, incluindo a sinvastatina. Em tecido ovariano especificamente, apenas o grupo de Lee e colaboradores (2015ab) demonstrou os efeitos benéficos da sinvastatina em transplantes de tecido ovariano de camundongas. Sendo observados, após 21 dias de transplantes, não somente a melhora na vascularização adjacente ao transplante, como também o aumento da sobrevivência dos folículos primordiais.

Desta forma, a segunda etapa deste estudo avaliou o uso da sinvastatina como forma de acelerar o processo de revascularização em transplante com tecido ovariano de gatas domésticas e com isso melhorar a sobrevivência folicular. No entanto, diante do protocolo usado por nós, adaptado do usado por Lee e colaboradores (2015a), os resultados obtidos não foram os esperados, pois a perda folicular se manteve intensa com ou sem o uso da sinvastatina. Talvez, a mudança do local de transplante (para o tecido subcutâneo ao invés de para a cápsula renal) possa ter influenciado diretamente no potencial de ação da

sinvastatina no tecido transplantado, fazendo com que não obtivéssemos os efeitos desejados. Assim sendo, melhores resultados com a uso da sinvastatina em transplantes de tecido ovariano de felinos, talvez possam ser alcançados com alterações na dose administrada, no momento de administração ou até mesmo na forma de administração deste fármaco.

Por fim, conhecer o tempo de revascularização de tecido ovariano autotransplantado no subcutâneo de gatas domésticas e tentar melhorar o sucesso dos transplantes de tecido ovariano criopreservados para esta espécie é importante, pois as gatas domésticas podem vir a ser excelentes receptoras de xenotransplantes de tecido ovariano de felinos selvagens, considerando a proximidade filogenética e a similaridade fisiológica entre as espécies felinas. Relembrando que o sucesso de nascimentos a partir de tecido ovariano xenotransplantado só ocorreu quando as espécies, doadora e receptora do tecido, eram bem próximas não somente filogeneticamente, como também fisiologicamente.