



**Efeito da incubação do tecido ovariano de gata doméstica em eritropoietina  
após criopreservação e xenotransplante**

**Isabella Monteiro Gomes da Silva**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Paulini**

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

**Dissertação de Mestrado**

**Brasília-DF 2022**

Dedico esta dissertação à minha família, que nunca deixou de me apoiar e segurar a minha mão, e aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim e estiveram presentes nos momentos mais desafiadores.

## **AGRADECIMENTO**

Gostaria de agradecer à toda a equipe do laboratório, o empenho e compromisso de cada um foi essencial tornou possível a execução deste trabalho. Gostaria de agradecer em especial à minha orientadora Fernanda Paulini pela imensa oportunidade de fazer parte deste projeto e por todo o auxílio e aprendizado que me foram concedidos por ela ao longo do processo.

Agradeço também à minha mãe, Irisvan Mota Monteiro Silva, ao meu pai, José Silva Gomes, aos meus irmãos, Flávio Monteiro Gomes da Silva e Cristiana Monteiro Gomes da Silva, aos meus sobrinhos, Miguel, Helena e Allan, à minha tia Claudia Mota Monteiro e à minha avó, Valdenora Mota Monteiro, por todo o amor e suporte não somente durante o mestrado, mas em todos os passos que dei em minha vida desde que me lembro.

À Beatriz Alves de Aguiar, Aline de Queiroz Rodrigues, Rayane Brandão e Marcus Rocha de Carvalho da Costa, pela amizade e por todo o auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À professora Sonia Nair Bão e à Ingrid Gracielle Martins da Silva, pelas instruções e apoio nas análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À professora Fernanda Cristina Alcantara dos Santos e ao doutorando Edvaldo Mendes pelo auxílio com as técnicas de imuno-histoquímica.

Gostaria de agradecer também ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

## Sumário

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução.....	10
2. Referencial Teórico.....	11
3. Justificativa.....	25
4. Objetivos.....	26
5. Metodologia.....	26
5.1. Animais.....	27
5.2. Delineamento experimental.....	27
5.3. Criopreservação e descongelamento do tecido ovariano.....	29
5.4. Xenotransplantes e eutanásias.....	31
5.5. Análises em microscópio de luz.....	32
5.5.1. Processamento histológico.....	32
5.5.2. Imunohistoquímica.....	33
5.5.3. Coloração com Tricômio de Mallory.....	34
5.6. Análise com Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	35
5.7. Análises estatísticas.....	35
6. Resultados e discussão.....	36
6.1. Análise histológica.....	36
6.2. Proliferação celular.....	45
6.3. Vascularização.....	49
6.4. Áreas de fibrose.....	55
6.5. MET.....	58
7. Conclusão.....	66
8. Referências.....	66

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo estral de felinos.....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema do delineamento experimental.....	28
<b>Figura 3.</b> Curva de congelamento lento utilizada no estudo.....	30
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica da estatística da porcentagem média de folículos primordiais morfolologicamente normais (MN) nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.....	39
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica da estatística da porcentagem média de folículos em crescimento morfolologicamente normais (MN) nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.....	42
<b>Figura 6.</b> Figuras histológicas de tecido ovariano de gatas domésticas criopreservados e xenotransplantados, corados com Hematoxilina e Eosina.....	44
<b>Figura 7.</b> Tecido ovariano marcado com o anticorpo KI-67 e corado com Hematoxilina.....	46
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica da análise estatística para a porcentagem média folículos positivos para KI-67 nos grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante.....	47
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica da análise estatística para a média percentual de folículos marcados com KI-67 nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.....	48
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica da análise estatística da área média dos vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos dias 0, 7, 14 e 21 pós-transplante.....	50
<b>Figura 11.</b> Tecido ovariano marcado com o anticorpo Von Willenbrand e corado com Hematoxilina.....	52
<b>Figura 12.</b> Representação gráfica das análises estatísticas do número de vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 0, 7, 14 e 21 dias pós-transplante.....	53
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica das análises estatísticas da área percentual de tecido ovariano ocupada por vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 0, 7, 14 e 21 dias pós-transplante.....	54

<b>Figura 14.</b> Representação gráfica da análise estatística da área percentual de fibrose observada a partir da coloração com Tricômio de Mallory e hematoxilina nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante. ....	55
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da estatística para a média de áreas percentuais de fibrose detectadas a partir da coloração com tricômio de Mallory e hematoxilina nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.....	56
<b>Figura 16.</b> Tecido ovariano de gatas domésticas corado com Tricômio de Mallory..	57
<b>Figura 17.</b> Microfotografia de folículos pré-antrais do grupo CRIO+EPO aos 28 dias pós-transplante.....	59
<b>Figura 18.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de folículos ovarianos do grupo CRIO aos 28 dias pós-transplante.....	61
<b>Figura 19.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de folículos do grupo EPO+CRIO aos 28 dias pós-transplante.....	63
<b>Figura 20.</b> Microscopia eletrônica de transmissão do controle fresco (fixado por 24 horas e não transplantado) .....	65

### **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Número total e média percentual de folículos primordiais considerados morfológicamente normais (MN) nos tratamentos EPO+CRIO, CRIO+EPO e CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante.....	37
<b>Tabela 2.</b> O total e a média percentual de folículos em crescimento considerados morfológicamente normais (MN) nos tratamentos EPO+CRIO, CRIO+EPO e CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias de transplante.....	40

### **Lista de abreviações**

CRIO- Criopreservação

DMSO- Dimetilsulfóxido

EPO- Eritropoietina

EpoR- Receptores de EPO

JAK- Janus quinases

MEM- Meio essencial mínimo

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MN- Morfologicamente normal(is)

OSH- Ovariohisterectomia

STAT- Signal transducers and activators of transcription

## Resumo

Grande parte das espécies felinas encontram-se ameaçadas de extinção. Assim, a criação de bancos de germoplasma se faz necessária e aponta para a importância de técnicas eficazes de criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano, para posterior produção de embriões *in vitro*. No entanto, a criopreservação e o período de isquemia/reperfusão após o transplante ainda são um desafio, pois desencadeiam uma massiva perda folicular. Assim, a eritropoietina (EPO), pode ser considerada uma possível alternativa para amenizar essas injúrias e preservar os folículos devido aos seus efeitos angiogênicos, anti-apoptóticos e antioxidantes. O presente estudo avaliou a eficácia da incubação de tecidos ovarianos de gatas domésticas em eritropoietina antes e depois da criopreservação. Para isso, os ovários recebidos de uma clínica veterinária foram seccionados e divididos aleatoriamente entre os grupos denominados EPO+CRIO (incubados em EPO e criopreservados em seguida) e CRIO+EPO (criopreservados, descongelados e incubados em EPO), nos quais a incubação foi realizada em MEM e 100 UI de EPO por duas horas à 37°C (antes ou depois da criopreservação), e no grupo denominado CRIO, em que os fragmentos foram somente criopreservados igualmente por congelamento lento. Os fragmentos descongelados dos três grupos foram xenotransplantados para a região subcutânea dorsal de camundongas nude Swiss (*nu/nu*) e recuperados aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante. Foram realizadas análises histológicas e histoquímicas para a contagem e classificação de folículos e mensuração de áreas de fibrose, e testes imunohistoquímicos para averiguar a presença de vasos sanguíneos e avaliar os folículos proliferativos. A EPO se mostrou eficaz na sobrevivência folicular quando utilizada após a criopreservação, e apresentou o aumento de vasos sanguíneos no grupo EPO+CRIO aos 21 dias pós-transplante. Assim, é possível inferir que a EPO mostrou efeitos benéficos, mas estudos futuros são necessários para maior comprovação da eficácia dos protocolos apresentados.

**Palavras-chave:** EPO, congelamento lento, sobrevivência folicular, revascularização ovariana.

## **Abstract**

The majority of felines are threatened with extinction. Thus, the creation of cryobanks is necessary, which highlights the importance of efficient cryopreservation and xenotransplantation protocols for *in vitro* embryo production. However, both cryopreservation and the ischemia/reperfusion period are still a challenge, because they trigger a massive follicular loss. Erythropoietin (EPO) can be used to reduce those injuries and preserve follicles due to its angiogenic, anti-apoptotic, and antioxidant effects. The present study evaluated the effectiveness of cat ovarian tissue incubation in EPO before or after cryopreservation. Ovaries received from a veterinary clinic were segmented and randomly divided into groups: EPO+CRYO (incubated in EPO and cryopreserved immediately after), CRYO+EPO (cryopreserved, thawed, then incubated in EPO), in which incubation was performed in MEM and 100 IU of EPO for 2 hours at 37°C (either before or after cryopreservation), and group CRIO, in which fragments were only cryopreserved. Thawed tissue from the three groups were xenotransplanted into subcutaneous dorsal tissue of nude Swiss (*nu/nu*) mice and retrieved 7, 14, 21 and 28 after surgery. Histological and histochemistry analyses were performed for follicle counting, classification, and the measurement of fibrotic areas, and immunohistochemistry assays were performed to investigate the presence of new vessels and proliferative follicles. EPO proved to be effective for follicle survival when used after cryopreservation and showed an increase in the number of blood vessels in the EPO+CRIO group 21 days after transplantation. Therefore, EPO showed beneficial effects, but future studies are necessary to further examine the effectiveness and optimize the protocols presented.

**Keywords:** EPO, slow freezing, follicle survival, ovary revascularization.

## 1. Introdução

Atualmente, grande parte dos felinos encontra-se na lista vermelha de espécies ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN), e isso inclui todas as espécies selvagens brasileiras (IUCN 2020). Essa alarmante situação se dá devido a diversos fatores relacionados à atividade humana, como a fragmentação e destruição de habitats e a caça (SANDOM et al., 2017; RIPPLE et al., 2014), o que aponta para a urgência da implantação de medidas que possam reverter ou amenizar este cenário.

Métodos de conservação *ex situ*, como os programas de reprodução em cativeiro, têm sido amplamente utilizados para o restabelecimento de indivíduos de espécies ameaçadas (CONDE et al., 2011; MCGOWAN; TRAYLOR-HOLZER; LEUS, 2017). No entanto, para que essas estratégias funcionem, é necessário que se obtenham ferramentas que possam incrementá-las. Assim, a criação de bancos de germoplasma apresenta-se como uma proposta potencial no âmbito da proteção de espécies ameaçadas (CAMPOS et al., 2019). Para que isso seja possível, protocolos de criopreservação eficientes para a conservação de gametas, embriões e tecido gonadal se tornam imprescindíveis e o congelamento lento tem mostrado resultados encorajadores na literatura.

Porém, quando se trata de tecido ovariano, é necessário que também haja uma forma eficaz de recuperar as funções exócrinas do órgão após a criopreservação. Deste modo, o xenotransplante de córtex ovariano tem auxiliado diversas pesquisas no que se diz respeito à recuperação de folículos ovarianos (TAFTI et al., 2018). Porém, o maior obstáculo tanto para o processo de criopreservação, quanto para o xenotransplante, são as injúrias e a grande perda folicular sofridas pelo tecido. Estes prejuízos ocorrem, principalmente, devido à hipóxia e aos danos isquêmicos que acontecem no período de reperfusão sanguínea, ocasionados pela formação de espécies reativas de oxigênio (KARACA et al., 2009).

Assim, diversas substâncias com potencial antioxidativo e angiogênico têm sido estudadas, com o intuito de diminuir as injúrias citadas. Uma delas é a eritropoietina (EPO), um hormônio glicoproteico que além do seu potencial angiogênico, ainda possui ação anti-inflamatória e antioxidante (BRIDGE et al., 1990; ÖZTÜRK et al.,

2008); (ALURAL et al., 2014). Assim, ela poderia ser capaz de auxiliar no sucesso da preservação de folículos ovarianos em tecidos criopreservados e transplantados.

A EPO tem sido demonstrada como um potencial agente na sobrevivência e/ou preservação da morfologia folicular após a criopreservação e transplante (SUZUKI et al., 2008; COMMIN et al., 2012; KOLUSARI et al., 2018). Sua ação demonstrou efeitos antioxidativos em um estudo realizado com tecido ovariano de camundongas (KARACA et al., 2009). Outras pesquisas também observaram funções adicionais da EPO, como o desencadeamento de cascatas de sinalização de sobrevivência folicular (LI et al., 2015), a regulação da expressão de proteínas anti-apoptóticas (WEN et al., 2002), além dos seus efeitos angiogênicos que já foram demonstrados em estudos com diversos tipos de tecidos (ZHANG et al., 2014).

Entretanto, ainda não existe um consenso sobre qual a dose ideal de EPO a ser utilizada para transplantes de tecido ovariano, ou ainda qual é o melhor método para sua utilização. A via intraperitoneal (MAHMOODI et al., 2014) é um dos métodos mais comuns para o seu uso, embora outros meios, como a aplicação local com a utilização de esponja (SUZUKI et al., 2008) ou a injeção no local do transplante (KOLUSARI et al., 2018) já tenham sido utilizados e apresentado bons resultados quanto à sobrevivência ou preservação da morfologia folicular. Assim, diante da necessidade de aprimorar os métodos de utilização do hormônio, o presente estudo objetivou testar a incubação direta dos fragmentos em EPO, observando os efeitos nos fragmentos de córtex ovariano de gatas domésticas antes e depois da criopreservação, com posterior xenotransplante para camundongas nude Swiss (*nu/nu*).

## **1. Referencial Teórico**

### **2.1 Conservação e particularidades das características reprodutivas de felinos**

#### **2.1.1 Conservação de felinos**

A família *Felidae* é composta por 38 espécies, das quais a maior parte encontra-se ameaçada de extinção (ANDREWS et al., 2019). A aplicação de técnicas de reprodução assistida e o sucesso dos programas de reprodução *ex situ* tem sido ferramentas aplicadas a fim de reverter este cenário, mas o sucesso depende de uma série de fatores. Um deles é o entendimento acerca da biologia reprodutiva das

espécies. Em relação aos felinos, ainda existe uma grande lacuna de conhecimento sobre seus padrões reprodutivos, tanto em machos quanto em fêmeas (ANDREWS et al., 2019). Assim, o desenvolvimento de pesquisas que elucidem estes traços se faz necessário, tendo em vista a forte interferência humana no habitat e na biodiversidade de espécies selvagens, levando várias delas ao cenário de ameaça de extinção (CAMPOS et al., 2019).

A perda da variabilidade genética é um dos grandes desafios enfrentados por muitas espécies selvagens e cativas. Alguns eventos, como a presença de espermatozoides pleiomórficos e problemas de fertilidade, já foram observados em populações onde a variabilidade genética era baixa, como em um estudo realizado com indivíduos cativos de uma espécie de onça que habita a Flórida (HOWARD; WILDT, 2009). Uma das estratégias para a manutenção da variabilidade é a conservação de habitat, o que tem sido insuficiente devido ao atual cenário de perda e degradação de biomas. Assim, os programas *ex situ* desempenham papel fundamental na conservação de linhagens em relação ao aumento da variabilidade genética destas populações (CAMPOS et al., 2019).

No entanto, o estresse em cativeiro possui diversas causas e pode afetar a performance reprodutiva. Aspectos como atividade expositória, contato com humanos e ambiente empobrecido, com dimensões inadequadas e privado de características que possam aproximar o felino da vida selvagem, diminuem a atividade folicular e o número de cópulas, afetando negativamente os aspectos reprodutivos daqueles animais (ANDREWS et al., 2019). Diversos estudos realizados com mamíferos apontam para a relação entre a elevação dos níveis de cortisol (marcador de estresse) em amostras de sangue, urina e fezes de diversas espécies e o ambiente cativo (BAYAZIT, 2009). Assim, cativeiros enriquecidos e bem ambientados são ideais para a manutenção da performance reprodutiva e a obtenção de novos indivíduos para as espécies em questão.

### **2.1.2 Características reprodutivas de fêmeas felinas**

Os felinos são animais com hábitos sexuais sazonais, dependentes do fotoperíodo e da flutuação na disponibilidade de alimento (ANDREWS et al., 2019). A

definição das estações do ano em que o felino se encontra é crucial para a nitidez da sazonalidade, que é mais facilmente observada em animais que vivem em clima temperado do que naqueles que se encontram em regiões tropicais (MOREIRA, 2007). Desse modo, a vida em cativeiro pode influenciar as características reprodutivas dos felinos, tendo em vista a falta de exposição à luminosidade e alimentação naturais. Estudos que avaliaram os níveis de estradiol e progesterona em diversas fases do ciclo estral apontam que nenhuma sazonalidade pôde ser observada em algumas espécies cativas, como leões e leopardos (SCHMIDT et al., 1979; SCHMIDT et al., 1985; ANDREWS et al., 2019).

A cópula é realizada em estações luminosas, tais como a primavera e o verão. A puberdade pode variar entre as espécies, mas ocorre geralmente entre o 4º e 12º mês de vida. O peso corporal e o fotoperíodo também são fatores que podem alterar o início da puberdade. Os felinos são animais multiovulatórios (possuem mais de uma ovulação por ciclo) e de ovulação induzida, isto é, a ovulação é desencadeada a partir da presença de cópula (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Os movimentos de fricção do pênis contra as paredes da vagina ativam mecanorreceptores que sinalizam o hipotálamo para liberar o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este, por sua vez, estimula o pico subsequente do hormônio luteinizante (LH). Quanto mais cópulas ocorrerem, maior a chance da fêmea ovular. No entanto, os estímulos visuais ou induzidos por feromônios também podem desencadear a ovulação de forma independente à cópula (BAKKER; BAUM, 2000).

As fêmeas são poliétricas sazonais, o que significa que apresentam mais de um ciclo reprodutivo por ano e nos períodos de dias mais longos. Assim, animais que habitam em regiões tropicais em que os dias permanecem praticamente com a mesma duração ao longo do ano, não apresentam sazonalidade e ciclaram o ano todo (BAKKER; BAUM, 2000).

O ciclo estral dos felinos consiste em cinco fases, levando em conta os períodos de intervalo: interestro, proestro, estro, diestro e anestro (BROWN, 2011). O interestro caracteriza-se como o intervalo entre as ondas de desenvolvimento folicular, e está presente somente em felinos e canídeos.

O proestro marca o início do desenvolvimento folicular, em que há uma crescente concentração de estradiol no plasma sanguíneo, além do desenvolvimento

de folículos primários e secundários. Essa etapa tem duração, em média, 24 horas, e compõe a chamada “fase folicular”, juntamente com o estro (BROWN, 2011; GRIFFIN, 2001).

O estro é a fase na qual o comportamento sexual costuma surgir, de forma mais atenuada ou bastante visível, dependendo da espécie. Atos como rolamento, marcação de território por meio de odores, aumento da atividade locomotora, lordose, desvio da cauda para melhor visualização da vagina pelo macho e vocalização marcam as características estrais em felinos (ANDREWS et al., 2019). É nessa fase em que também ocorre o pico das concentrações plasmáticas de estradiol e o desenvolvimento folicular de forma avançada (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006; MICHAEL; SCOTT, 1964).

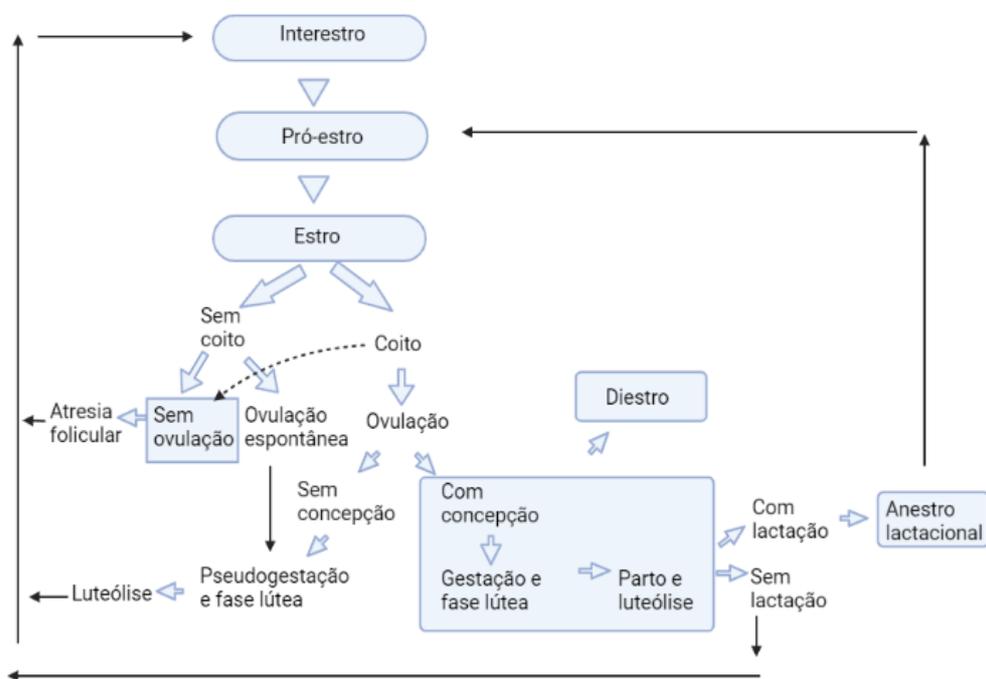
As fases seguintes são direcionadas de acordo com algumas variáveis, como a presença ou ausência da cópula. No primeiro caso, a ovulação será possibilitada devido à indução sexual por fricção da cérvix uterina, estimulando a liberação de gonadotropinas (BAKKER; BAUM, 2000). Deste modo, o animal entrará, mais tarde, na fase de diestro, caracterizada pela presença do corpo lúteo e altos níveis de progesterona no plasma sanguíneo (RICHARDS et al., 2002).

É importante ressaltar que a fecundação do óvulo pode ocorrer ou não, o que conduz o animal a outras duas possibilidades: à gestação e fase lútea ou à pseudogestação e fase lútea. No caso de gestação, o corpo lúteo se mantém até o parto, pois é ele quem faz a manutenção dos elevados níveis de progesterona durante boa parte da gestação, havendo a luteólise logo após. Posteriormente, o felino pode ou não apresentar lactação. No caso de haver lactação, a fêmea entra em anestro lactacional, período marcado pela aciclicidade reprodutiva. Ao fim dele, ela entra em interestro. No entanto, caso a lactação não ocorra, a fêmea entra em interestro diretamente. O anestro está geralmente associado a estações não reprodutivas (FELDMAN; NELSON, 2004).

No caso de diestro com ausência de fecundação, o animal passará por uma pseudogestação, devido à presença do corpo lúteo que mantém os altos níveis de progesterona no organismo. No entanto, logo após haverá a luteólise e a fêmea entrará em interestro (ANDREWS et al., 2019).

Retornando à fase estral, existe ainda um segundo caminho: o da ausência de cópula. Na maior parte dos casos, sem a cópula, a fêmea não será capaz de ovular, desencadeando a atresia folicular e o início de outro interestro. Porém, muitos estudos apontam para a presença da ovulação espontânea em felinos, isto é, independente do coito. Quando isso ocorre, a fêmea passa por uma pseudogestação acompanhada de fase lútea, com posterior luteólise e entrada em interestro (ANDREWS et al., 2019; BROWN, 2011). O ciclo estral está ilustrado na figura 1.

**Figura 1.** Ciclo estral de felinos.



As fases do interestro, pró-estro, estro, diestro e anestro funcionam de forma dinâmica e codependente. Figura adaptada de Andrews et al. 2019.

A duração da gestação em felinos é variável. Em gatas domésticas, ela dura aproximadamente 65 dias, em contraste com os 101 dias de gestação em onças e 92 dias em pumas. (ANDREWS et al., 2019).

## 2.2 Ovogênese e foliculogênese em mamíferos

A foliculogênese e ovogênese são processos que ocorrem de maneira semelhante entre os mamíferos (FORTUNE, 1994). Os processos de formação destas

estruturas ocorrem ainda durante a fase fetal, ao contrário das células germinativas de machos, que são produzidas ao longo de toda a vida reprodutiva. As fêmeas de mamíferos já nascem com uma quantidade definida de células germinativas, embora já tenha sido demonstrado que pode haver a produção de algumas delas após o nascimento (HANNA; HENNEBOLD, 2014). Estas células encontram-se estacionadas em meiose I, e só terminam o seu desenvolvimento completamente após a fecundação, quando há a finalização da meiose II. Os folículos também são formados ainda durante o estágio fetal, e se caracterizam, nesta fase, por possuírem somente uma camada de células somáticas ao seu redor. No entanto, antes que a puberdade seja atingida, ocorre um massivo processo de atresia dessas estruturas, diminuindo a reserva ovariana. Em felinos, a formação dos ovócitos primários ocorre por volta de 50 dias de desenvolvimento fetal (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006)

Os fatores associados à ativação inicial dos folículos ainda permanecem pouco compreendidos. Sabe-se que alguns fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador ( $TGF\beta$ ), a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de diferenciação e crescimento 9 (GDF9) estão associados a este processo, bem como a todas as outras etapas da foliculogênese, providenciando um ambiente propício para o crescimento folicular, atresia, e até mesmo os processos de fecundação (PAULINI; MELO, 2011).

Dentro do ovário, a cada ciclo estral, ocorre o recrutamento de um grupo de folículos primordiais. Este processo é engatilhado pelo hormônio de crescimento (GH) e o antimulleriano (AMH). Estes folículos se desenvolvem até o estágio antral inicial sem a influência de hormônios hipofisários (folículo estimulante- FSH e luteinizante-LH), sendo somente os folículos antrais responsivos a eles (FORTUNE, 1994).

No início da foliculogênese, o (FSH) é secretado em grandes quantidades, enquanto o LH encontra-se em níveis basais. O FSH, por sua vez, estimula o desenvolvimento de pequenos folículos antrais e, conseqüentemente, a secreção de estrógeno e inibina pelas células da granulosa (FORTUNE, 1994). Essa secreção funcionará como um *feedback* negativo para a produção de FSH pela hipófise, agindo como um mecanismo de seleção dos folículos que irão continuar crescendo, enquanto outros entrarão em atresia. Isto ocorre devido à insuficiência de FSH para atender ao crescimento de todos os folículos ali recrutados, possibilitando a dominância de um

deles ou alguns deles, como é o caso das gatas (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006), enquanto os demais entram em atresia (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Quando os folículos selecionados atingirem um estágio de crescimento antral, a secreção de estrógeno estará em seu máximo (os níveis de inibina também aumentam), modificando a secreção de GnRH pelo hipotálamo e estimulando a secreção de LH até o seu pico pré-ovulatório, o que caracteriza, neste ponto, a secreção de estrógeno em um mecanismo de *feedback* positivo para o LH. O ovócito presente no folículo dominante será ovulado e os níveis de estrógeno cairão drasticamente (FORTUNE, 1994).

O requisito para que se ocorra a ovulação é o pico pré-ovulatório de LH, que ocorre aproximadamente 24 horas antes da ovulação. Estes níveis de LH elevados promovem o bloqueio da síntese do fator inibidor da meiose (MIF) pelas células da granulosa, retomando a ovogênese e possibilitando o óvulo a atingir a metáfase II. O LH também é responsável pela luteinização das células da granulosa e da teca, tornando-as capazes de converter estrógeno em progesterona. Esta, por sua vez, é uma forte inibidora da hipófise, o que evita o início de um novo ciclo em caso de gestação, uma vez que os níveis de progesterona se manterão altos (RICHARDS et al., 1998).

O rompimento folicular para liberação do ovócito acontece devido à secreção de diversas substâncias intrafoliculares. Dentre elas, pode-se citar as prostaglandinas intrafoliculares, responsáveis pelo aumento do antro, o que por si só já é capaz de realizar uma pressão mecânica que auxilia no processo de ovulação. Há também a produção de enzimas proteolíticas e relaxina, que dissolvem a membrana basal do folículo e possuem a função de desorganizar o tecido conjuntivo da parede folicular, respectivamente (MORIOKA et al., 1989).

Posteriormente, haverá a formação do corpo lúteo, estrutura que surge a partir da hipertrofia do folículo que sofreu ovulação (RICHARDS et al., 2002). Após o rompimento das paredes foliculares, há o extravasamento do líquido presente em seu interior, e a entrada de sangue para a cavidade agora formada, ocasionada pelo rompimento de alguns vasos sanguíneos presentes nas proximidades. Assim, são formados coágulos de sangue dentro do folículo. Além disso, haverá a formação de vasos na região das células da granulosa, o que caracteriza o corpo lúteo como uma

estrutura altamente vascularizada (RICHARDS et al., 1998). No caso das gatas domésticas, são ovulados de 2 a 8 folículos por ciclo estral.

### **2.3 A criopreservação para preservação da fertilidade**

No cenário das espécies ameaçadas, a criopreservação tem desempenhado um papel crucial para conservação de tecido testicular, gametas, embriões e tecido ovariano (MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020). Em casos de morte inesperada de fêmeas, em que não há a possibilidade de se recuperar ovócitos, a criopreservação de córtex ovariano é uma promissora alternativa para a estocagem e posterior aplicação de técnicas de reprodução assistida (SANTOS et al., 2010; CAMPOS et al., 2019). Além disso, a criopreservação de tecido ovariano pode ser realizada em animais de qualquer idade e em qualquer fase do ciclo, o que anula a dependência da fêmea estar em estágio ou condições reprodutivas ideais (CLEARY et al., 2001).

O córtex ovariano, por sua vez, possui muitos folículos primordiais que continuam viáveis mesmo depois da morte do animal (DONFACK et al., 2017), o que é uma grande vantagem para o posterior desenvolvimento desses folículos e obtenção de ovócitos com capacidade de fertilização. Além disso, os folículos primordiais tendem a ser mais resistentes às crioinjúrias, devido ao seu baixo metabolismo e a menor quantidade de lipídios em suas camadas celulares (HOVATTA, 2005).

No entanto, embora a criopreservação de tecido ovariano já tenha demonstrado uma série de resultados positivos em diversas espécies, como em ovelhas (GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, 1994), camundongos (GUNASENA et al., 1997) e humanos (VON WOLFF et al., 2009), este procedimento ainda apresenta desafios, devido à variabilidade de tipos celulares presentes e à dificuldade no posterior desenvolvimento folicular. Assim, a crioinjúria ainda é um fator preocupante, o que requer o entendimento e o desenvolvimento de protocolos de criopreservação eficazes, que podem variar entre as espécies (CAMPOS et al., 2019).

### 2.3.1 Criopreservação de tecido ovariano

As técnicas de criopreservação disponíveis atualmente são o congelamento lento e a vitrificação. Embora a vitrificação já tenha possibilitado ótimos resultados na preservação de tecido ovariano (DOLMANS; DONNEZ, 2021) muitos institutos ainda utilizam o congelamento lento, que também apresenta dados encorajadores para a mesma finalidade. Dentre os resultados obtidos pelo congelamento lento, pode-se citar a sobrevivência folicular em tecido ovariano de gatas, ovelhas e cabras (JEWGENOW et al., 1998; AMORIM et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005); ovócitos maduros e nascimentos vivos em ovelhas (SALLE et al., 2002; SALLE et al., 2003), a recuperação das funções ovarianas em coelhos (CHEN et al., 2006) e mais de 200 nascimentos vivos em humanos (DOLMANS; FALCONE; PATRIZIO, 2020).

Embora esta técnica ainda seja amplamente utilizada, o congelamento lento pode desencadear estresse físico e a formação de cristais de gelo nas células (MAZUR, 1963). Dentre os problemas estruturais que podem vir a ocorrer, pode-se citar a despolimerização dos microtúbulos, o que pode acarretar problemas futuros com a retomada da meiose (TATONE et al., 2010) e danos à membrana do ovócito (NOTTOLA et al., 2008). Estas injúrias podem ser atenuadas a partir da escolha do crioprotetor a ser utilizado. Os crioprotetores intracelulares, como o etilenoglicol e o propanodiol, são responsáveis por aumentar a sobrevivência celular diminuindo a formação de cristais de gelo no interior da célula (SANTOS et al., 2010). Já a desidratação e os danos sofridos pela membrana plasmática podem ser evitados com o uso dos crioprotetores intracelulares, como a trealose e a sacarose (BRITO et al., 2018; STOREY; NOILES; THOMPSON, 1998). Uma das grandes vantagens do congelamento lento é o fato de ser realizado por meio de uma máquina programável, o que permite a criopreservação de várias amostras ao mesmo tempo sem a necessidade da replicação manual do procedimento (SANTOS et al., 2010). Os crioprotetores também podem exercer efeitos citotóxicos, como o aumento das concentrações intracelulares de cálcio e o endurecimento da zona pelúcida (TATONE et al., 2010). Assim, o tempo de exposição aos crioprotetores também é crucial para a integridade do tecido ao longo do processo de congelamento (ARAV; PATRIZIO, 2019).

O tamanho do fragmento ovariano utilizado também importa para o sucesso da criopreservação. Em um estudo feito com tecido ovarino de gatas domésticas (GORRICO et al., 2018), foi realizada a vitrificação de fragmentos de diferentes tamanhos. Após análises histológicas e imunohistoquímicas, foi possível concluir que os fragmentos de 27mm<sup>3</sup> (3x3x3mm) indicaram o melhor índice de perfusão dos crioprotetores. Ferreira et al. 2010 testou os efeitos dos crioprotetores em fragmentos de tecido ovarianos cortados em tamanhos de 10x3x2mm<sup>3</sup> (denominado grupo 2mm) ou 10x3x4mm<sup>3</sup> (grupo 4mm). Os resultados mostraram que os índices de sobrevivência folicular foram estatisticamente menores no grupo 4mm, demonstrando que existe um alto risco de crioinjúria em tecidos cortados em fragmentos mais espessos do que 2mm.

As condições de descongelamento também são cruciais para a manutenção da integridade do tecido, pois durante esta etapa também pode haver injúrias, incluindo a formação de cristais de gelo (TATONE et al., 2010). De acordo com Perdrix et al. (2010), que realizou estudos com criopreservação de tecido ovariano em humanos, o descongelamento deve ser realizado de forma progressiva, com remoção gradativa dos crioprotetores a fim de evitar danos estruturais às células e realizar a remoção completa dos crioprotetores, evitando a ação dos seus efeitos citotóxicos.

Após a criopreservação, o tecido ovariano deve ser direcionado a outras técnicas que possibilitem o desenvolvimento dos folículos ali presentes. Dentre as opções disponíveis, o xenotransplante tem se mostrando eficaz na retomada das funções endócrinas do tecido e tem sido amplamente utilizado para o estudo de técnicas de reprodução assistida (PIMENTEL et al., 2015).

#### **2.4 O uso de xenotransplante para o desenvolvimento folicular**

O xenotransplante viabiliza a retomada das funções de tecidos ovarianos criopreservados providenciando condições como aporte sanguíneo, pH e temperatura ideais para o desenvolvimento dos transplantes. Assim, é também considerada uma das chaves para a posterior aplicação de técnicas de reprodução assistida como a produção de embriões *in vitro*, pois possibilita o desenvolvimento e maturação de folículos até o ponto em que possuam ovócitos maduros para a fertilização. O

xenotransplante possui a grande vantagem de poder conservar os gametas maternos de espécies ameaçadas de extinção (DEMIRCI et al., 2003). Esta técnica é associada à utilização de animais imunodeficientes, tendo em vista a sua receptibilidade a transplantes decorrente da deficiência de células imunes que pudessem rejeitar o tecido transplantado (PIMENTEL et al., 2015).

A escolha da região para onde o tecido será transplantado é de suma importância. A maior parte dos sítios heterotópicos, isto é, aqueles diferentes do sítio natural onde determinado órgão ou estrutura é situado, possui vantagens como o fácil acesso e o fato de serem pouco invasivos, embora não ofereçam o ambiente ideal para o desenvolvimento folicular, devido às diferenças na temperatura, aporte sanguíneo e fatores parácrinos em relação aos sítios ortotópicos (aqueles onde naturalmente o órgão se situa) (DONFACK et al., 2017). Porém, várias regiões já foram testadas com sucesso para o xenotransplante de tecido ovariano e sobrevivência folicular, como a região subcutânea dorsal (WIEDEMANN et al., 2012) e abdominal (KOLUSARI 2018), bursa ovariana (SUZUKI et al., 2008) e até mesmo a cápsula renal (FASSBENDER et al., 2007; BOSCH et al., 2004).

O xenotransplante de tecido ovariano já foi realizado em diversas espécies, como gatas domésticas (BOSCH et al., 2004), leoas (WIEDEMANN et al., 2012), elefantas (GUNASENA et al., 1998), fetos e bezerros bovinos (BOLS et al., 2010), e humanos (KIM, 2014). No entanto, ainda existem alguns desafios relacionados à perda folicular pós-transplante. Este fenômeno está principalmente associado ao tempo de isquemia/reperfusão que ocorre após o processo cirúrgico (WANG et al., 2012). A isquemia se trata da redução do aporte sanguíneo para o tecido, resultando na alta concentração de metabólitos tóxicos, depleção energética e estresse oxidativo (INGEC et al., 2011; DEMEESTERE et al., 2009). As espécies reativas de oxigênio formadas incluem o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que liberam neutrófilos ativos (KARACA et al., 2009) e são responsáveis por danos estruturais de lipídios, DNA, enzimas e proteínas, o que desencadeia a apoptose (KIM; QIAN; LEMASTERS, 2003). A redução da concentração de oxigênio no local também ocasiona os danos por hipóxia, como a expressão de genes relacionados aos fatores inflamatórios, estimulando o acúmulo de neutrófilos e macrófagos na região, evento responsável pela formação de áreas de fibrose e danos estruturais ao tecido (VOLLMAR et al.,

1995). No entanto, os folículos primordiais também tendem a ser resistentes a estas injúrias, devido ao seu baixo metabolismo (DONFACK et al., 2017).

Tendo em vista todos os danos isquêmicos mencionados, a angiogênese é um fator imprescindível para a sobrevivência folicular pós-transplante e considerável para o sucesso do transplante (DONFACK et al., 2017). O processo de angiogênese é definido pela formação de novos vasos sanguíneos na área avascular, que surgem a partir da extensão de vasos pré-existentes (PATAN, 2004). Para que isso ocorra é necessário que haja a degradação proteolítica da membrana basal, além da proliferação e migração de células endoteliais de forma alinhada. Isso está ligado à ação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e os fatores de crescimento de fibroblastos (FERRARA, 2005). Deste modo, diversas substâncias exógenas vêm sendo testadas a fim de acelerar e garantir um processo angiogênico eficaz após o transplante. O que se espera é que elas sejam capazes de estimular os fatores de crescimento e demais sinalizações necessárias para que a angiogênese ocorra (TAKAE; SUZUKI, 2019).

Dentre as substâncias exógenas já estudadas com a finalidade de incrementar a angiogênese pós-transplante, pode-se citar o VEGF (HENRY et al., 2015); a esfingosina-1-fosfato ou SP1, (ZELINSKI et al., 2011), ácido lipoico (DING et al., 2021), e a eritropoietina (COMMIN et al., 2012; SUZUKI et al., 2008).

## **2.5 A eritropoietina como um fator estimulante pós-transplante**

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico com ação hematopoiética. Possui a função primordial de produzir células vermelhas do sangue na medula óssea, estimulando a proliferação, sobrevivência e diferenciação de células eritroides. Elas possuem, em sua superfície, o receptor de EPO (EpoR), e a quantidade desses receptores é determinante para a resposta da célula ao hormônio (ZHANG et al., 2014).

A produção de EPO acontece majoritariamente nos rins, mas também ocorre no fígado (especialmente na fase fetal em humanos), cérebro e útero. No cérebro, rins e fígado, sua produção é desencadeada pela hipóxia e mediada por fatores de transcrição como o fator de indução de hipóxia (HIF) e a proteína de ligação GATA

(BUNN, 2013), sendo posteriormente secretada na corrente sanguínea. Já no útero, a EPO possui função no desenvolvimento cíclico do endométrio (YASUDA et al., 1998), e é produzida em resposta ao estrógeno, mas na ausência dele, a produção de EPO no útero passa a ser mediada pela hipóxia. Tecidos de vários órgãos já se mostraram responsivos à EPO, como demonstram estudos realizados com tecido cardíaco (RUSCHITZKA et al., 2000; TENG et al., 2011), cerebral (PRASS et al., 2003), e muscular (OGILVIE et al., 2000), nos quais tratamentos com EPO resultaram em redução de danos relacionados à hipóxia, neuroproteção associada à proliferação e diferenciação de células neuronais progenitoras e estímulo da proliferação de mioblastos, respectivamente.

Em relação às funções da EPO em tecidos não hematopoiéticos, muitos são os eventos que ela é capaz de mediar, como a prevenção de injúrias e o aumento da vascularização em diversos tecidos. Um dos efeitos da EPO é a promoção de cascatas de sinalização de sobrevivência celular. Yilmaz et al. (2004) demonstrou, a partir da administração de EPO em tecido de fígado de rato, a queda dos níveis de alanina amino transferase (ALT) e fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), importantes mediadores de injúrias causadas por isquemia/reperfusão, associados à morte celular. As análises também mostraram a diminuição da peroxidação de lipídios, evento ligado às injúrias estruturais do tecido, às anomalias nas trocas metabólicas e à apoptose.

Adicionalmente, a EPO possui a função de regular a expressão de proteínas anti-apoptóticas. Já foi demonstrada a sua capacidade de ajustar a produção de Bcl-XI, proteína associada à supressão da apoptose em tecido cerebral de ratos. Neste estudo, foi realizada a cultura de neurônios expostos à hipóxia química e a EPO preveniu o dano neuronal induzindo a expressão de mRNA de Bcl-XI (WEN et al., 2002).

A modelação do mecanismo intracelular de cálcio é outro evento que pode ser mediado por EPO em tecidos não hematopoiéticos. Em um estudo realizado com células neuronais de rato, ela foi capaz de aumentar os níveis de captação e a concentração intracelular de cálcio e de óxido nítrico, demonstrando sua capacidade de ativar canais de cálcio (KOSHIMURA et al., 1999).

Em relação à modulação de inflamações, a EPO age inibindo a produção de citocinas pró inflamatórias, estimulando a resposta endotelial e reduzindo a resposta celular imune, como já foi demonstrado em estudos realizados com tecido neuronal de roedores, em que o cérebro havia sofrido injúrias e a EPO foi responsável pela queda nas taxas de morte neuronal e recrutamento de células imunes para o local (VILLA et al., 2003).

A EPO possui importante ação em tecidos endoteliais de várias fontes. A sua sinalização age na proliferação de células endoteliais, conduzida por meio da fosforilação da tirosina de proteínas como a STAT5, também presente em células eritroides (BITTORF et al., 2000). Estudos já demonstraram a expressão de receptores de EPO (EpoR) e resposta à EPO em células endoteliais de cordão umbilical proveniente de cesarianas em humanos e células endoteliais microvasculares de tecido cerebral de ratos (CHONG et al. 2002; HOU et al., 2011). As células endoteliais têm como uma de suas funções a produção de óxido nítrico, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo e tônus vascular. Foi demonstrado que células endoteliais submetidas a baixa taxa de oxigênio e ao tratamento com EPO *in vitro* apresentaram altas quantidades de mRNA de EpoR e produção de óxido nítrico (BELESLIN-COKIC et al., 2004; BELESLIN-COKIC et al., 2011).

Em tecido ovariano, a EPO também tem sido testada a fim de promover a sobrevivência folicular, viabilidade celular e revascularização. Commin et al. (2012) realizou a administração de EPO em camundongas imunodeficientes que receberam xenotransplante de tecido ovariano criopreservado de cadelas em sua região subcutânea dorsal. Apesar do estudo não ter demonstrado a queda da perda folicular, os resultados mostraram aumento estromal e de vasos sanguíneos nos tecidos, o que representa parte dos efeitos protetivos da EPO em relação à criopreservação e xenotransplante.

Karaca et al. (2009) realizaram o isolamento de ovários por meio de um clipe de ovários de ratas para induzir um processo isquêmico que durou três horas, com posteriores três horas de reperfusão, a fim de testar os efeitos antioxidativos da EPO. Neste estudo, ela foi administrada de forma sistêmica nos animais antes do período de isquemia, e este foi um dos primeiros estudos a apresentarem evidências dos seus efeitos antioxidantes. Aqui, a EPO não somente diminuiu a atividade da

mieloperoxidase (MPO), enzima associada à via de produção de espécies reativas de oxigênio, como aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima de defesa antioxidante.

KOLUSARI et al., 2018, por sua vez, observaram os efeitos da EPO em córtex ovariano humano vitrificado, no qual os tecidos foram xenotransplantados para a região do músculo dorsal do pescoço em camundongos. A EPO foi administrada de forma sistêmica, e houve sucesso na sobrevivência folicular, uma vez que foi observado um *pool* de folículos primordiais morfológicamente normais do grupo tratado com EPO, em contraste ao grupo que não foi tratado, em que nenhum folículo foi encontrado.

Desta maneira, a EPO parece incrementar a recuperação folicular, diminuindo o tempo de isquemia e incrementando a reperfusão do tecido ovariano transplantado. No entanto, apesar de todos os resultados já obtidos a partir da sua utilização, é observado que novas abordagens são necessárias, visto que não há um consenso sobre a melhor maneira ou tempo de administração da EPO.

### **3. Justificativa**

Os bancos de germoplasma tem se apresentado como uma importante alternativa de conservação animal para espécies ameaçadas de extinção, como os felídeos selvagens. Nessa abordagem, a criopreservação tem demonstrado ser uma técnica eficiente na preservação de ovócitos direcionados à criação destes bancos (FAUSTINO et al., 2011). O restabelecimento da função do tecido ovariano criopreservado pode ser realizada por meio de xenotransplante, uma ferramenta de grande relevância, e gatas domésticas (*Felinus catus*) têm sido utilizadas devido à sua proximidade filogenética com espécies selvagens e à abundância de indivíduos. No entanto, apesar de resultados positivos já apresentados na literatura, é necessário que as técnicas aplicadas para essa prática sejam aprimoradas, devido à alta taxa de perda folicular sofrida no tecido ovariano até a reperfusão.

Deste modo, a utilização de substâncias que auxiliem na prevenção de danos isquêmicos e na angiogênese do tecido transplantado pode ser de grande utilidade. Uma substância que vem sendo utilizada é a EPO, que em vários estudos foi testada

a fim de promover recuperação folicular, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e angiogênicos (MAHMOODI et al., 2014). Entretanto, ainda não há concordância de qual o procedimento é o melhor para sua utilização. Ademais, existem poucos estudos acerca do uso de EPO em ovários de gata xenotransplantados e a incubação direta do tecido ovariano em EPO ainda não foi testada, sendo esta a inovação apresentada pelo presente projeto.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da incubação do tecido ovariano de gata em eritropoietina antes e depois da criopreservação com posterior xenotransplante, sobre a isquemia/reperfusão tecidual e recuperação folicular.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar a taxa de recuperação folicular do tecido ovariano por meio da histologia clássica, avaliando sua morfologia e estágio de desenvolvimento (folículos primordiais e em crescimento);
- Analisar a vascularização do tecido transplantado com o anticorpo Von Willenbrand e a proliferação de células da granulosa com o anticorpo KI-67 a partir de testes imunohistoquímicos;
- Observar as áreas de fibrose com a utilização do Tricômio de Mallory em ensaio histoquímico;
- Avaliar a integridade de ultraestruturas, como organelas, membranas, citoplasma e aderência das estruturas foliculares, por análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

## **5. Metodologia**

### **5.1. Animais**

Os ovários utilizados na pesquisa foram obtidos a partir de oito gatas híidas, todas com aproximadamente 1 ano de idade, que passaram por ovariectomia (OSH) bilateral eletiva realizada na clínica veterinária Casa do Gato (Brasília, DF). Para a realização dos transplantes, foram utilizadas 15 camundongas nude (*Swiss nu/nu*) fêmea, com idades entre 8 a 12 semanas, recebidas do biotério da Universidade Católica de Brasília. Após sua chegada no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), foram mantidas em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, à 22°C, contendo no máximo 5 camundongas cada. Os animais dispuseram de ração purina para roedores e água, ambas autoclavadas e *ad libitum*. O local possui fluxo de ar contínuo em baixa velocidade, com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (Protocolo nº 11/2018).

### **5.2 Delineamento experimental**

Os ovários obtidos na clínica veterinária foram transportados ao laboratório de Endocrinofisiologia e Reprodução Animal em salina (0,9%) a 37 °C dentro de no máximo uma hora, lavados novamente em solução salina e destacados do tecido conjuntivo e gordura. Para a fragmentação dos ovários, foi utilizado um papel milimetrado para se obter cortes de 3mm<sup>3</sup> com um bisturi. Foram retirados oito fragmentos a partir de cada ovário (16 fragmentos por gata). Os fragmentos obtidos foram divididos aleatoriamente em três grupos, como descrito a seguir:

#### **Grupo EPO+CRIO**

Neste grupo, os fragmentos foram primeiramente incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C no dia em que foram recebidos no laboratório. Logo após as duas horas, foram submetidos à criopreservação e descongelados imediatamente antes da realização dos transplantes.

#### **Grupo CRIO+EPO**

Aqui, os fragmentos passaram pelo processo de criopreservação assim que seccionados. No dia da realização dos transplantes, foram descongelados e incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C, sendo transplantados em seguida.

### **Grupo CRIO**

Neste grupo, os fragmentos foram somente criopreservados. No dia das cirurgias, passaram pelo processo de descongelamento e transplante.

### **Recuperação dos fragmentos**

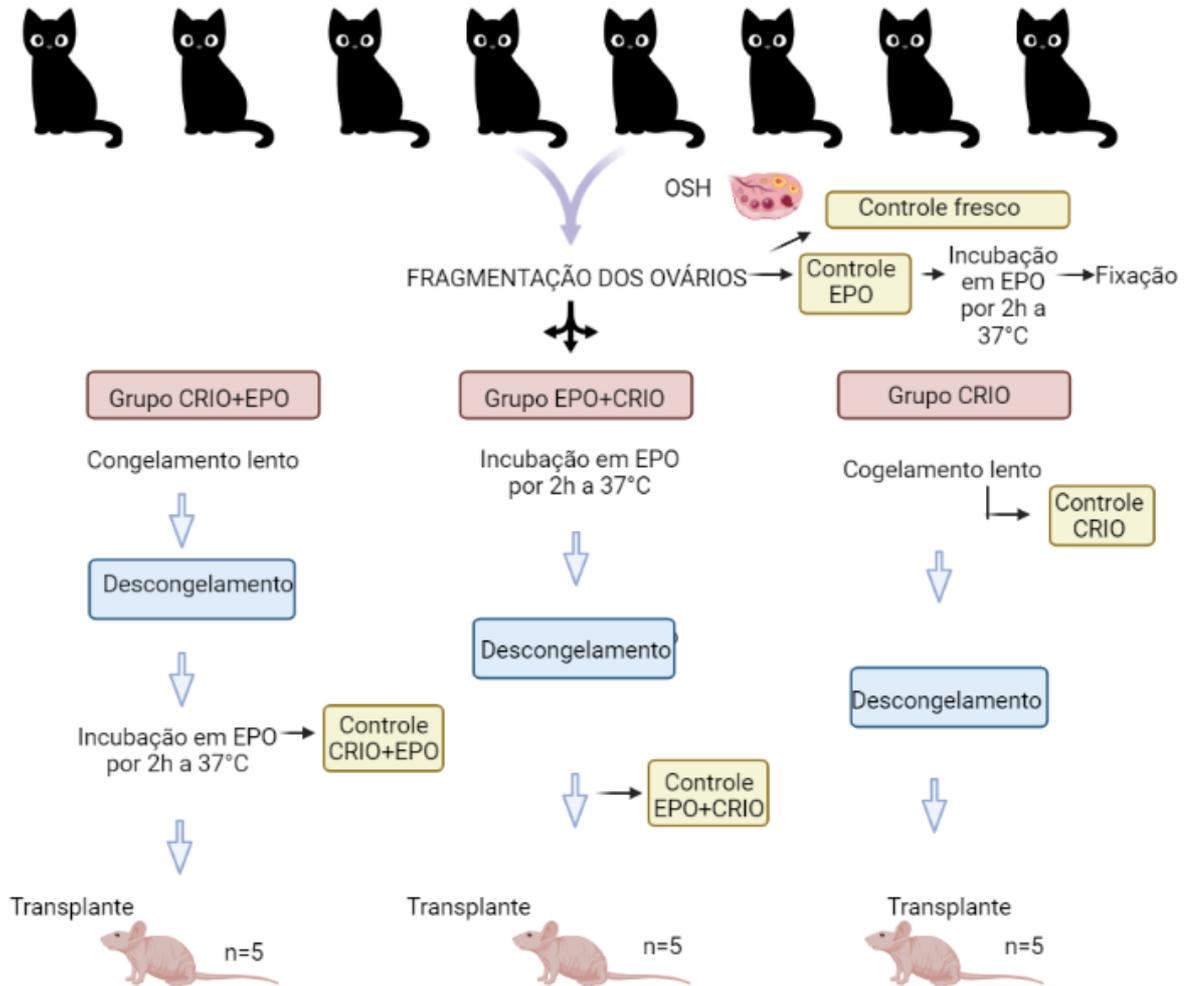
No momento dos transplantes todos os animais passaram por uma ovariectomia bilateral. O delineamento experimental está ilustrado na figura 2. Os fragmentos foram recuperados 7, 14, 21 e 28 dias após os transplantes. Os intervalos de 7 em 7 dias foram escolhidos a fim de abranger o ciclo estral das camundongas, que dura por volta de 5 dias.

### **Controles**

De cada grupo foram retirados três fragmentos para controle que não foram transplantados, a fim de averiguar se os protocolos escolhidos por si só exerceriam algum efeito tóxico sobre os fragmentos. Além destes, houve dois grupos de controle denominados controle fresco, no qual o tecido foi somente fragmentado e fixado, e o controle EPO, em que o tecido foi fragmentado, incubado em EPO da forma já descrita e fixado.

\* Todos os fragmentos ovarianos foram fixados em paraformaldeído 4% e de cada um deles (tanto tratamentos, quanto controles), foi retirada uma pequena amostra que foi fixada em Karnovsky para a MET.

**Figura 2.** Esquema do delineamento experimental.



Ovários de oito gatas híidas foram divididos em 128 fragmentos no total (8 fragmentos por ovário/16 fragmentos por gata) distribuídos nos três grupos de tratamento: grupo CRIO+EPO, no qual os fragmentos foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em EPO e xenotransplantados; grupo EPO+CRIO, em que os fragmentos foram incubados em EPO primeiro, criopreservados, descongelados e transplantados; e grupo CRIO, no qual os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e transplantados. No momento do transplante as camundongas sofreram ovariectomia bilateral. Após a criopreservação, todos os fragmentos foram mantidos por pelo menos 7 dias no nitrogênio líquido (-196°C). Cada grupo teve 33 fragmentos, de onde 1 foi retirado para os controles dentro de cada grupo (Controle CRIO, controle CRIO+EPO e controle EPO+CRIO). A figura também ilustra os fragmentos presentes nos controles frescos e EPO (2 fragmentos para o controle fresco e 2 para o controle EPO). OSH= ovariectomia; CRIO= criopreservação; EPO= eritropoietina.

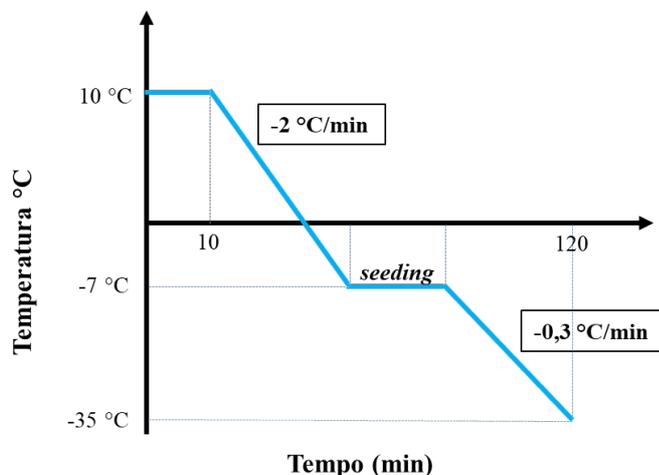
### 5.3 Criopreservação e descongelamento do tecido ovariano

Ao todo, foram obtidos 128 fragmentos ovarianos, dos quais 100 foram direcionados aos grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO, resultando em uma média de 33 fragmentos por grupo ( $n=100$  ou  $n=33/\text{grupo}$ ), sendo 3 deles destinados aos controles em cada tratamento. Os outros 28 fragmentos restantes foram divididos entre o controle fresco e o controle EPO (14 fragmentos em cada um).

A criopreservação foi realizada a partir de algumas alterações mencionadas no protocolo já descrito por Leonel (2018). A solução crioprotetora utilizada consistiu nos seguintes componentes: dimetilsulfóxido (DMSO) 1,5M, meio mínimo essencial (MEM), sacarose 4% e soro fetal bovino (SFB)10%.

Para a criopreservação, cada fragmento de tecido ovariano de gata foi inserido em um criotubo contendo 1ml da solução e, em seguida, mantido em gelo ( $10^{\circ}\text{C}$ ) por dez minutos para equilíbrio. Os criotubos foram levados à máquina de congelamento programável (Cryogen-Neovet, Uberaba- Brasil), que teve como fase inicial o resfriamento à velocidade de  $-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-7^{\circ}\text{C}$ . Logo após, foi realizado o *seeding*, que consistiu em encostar uma pinça com algodão embebida em nitrogênio líquido para a cristalização induzida da solução. Após, os criotubos foram resfriados até  $-35^{\circ}\text{C}$  ( $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), com posterior estocagem em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). A curva de congelamento está ilustrada na figura 3.

**Figura 3.** Curva de congelamento lento utilizada no estudo.



A curva de congelamento da máquina de criopreservação consiste na diminuição de -2°C por minuto até a temperatura de -7°C ser atingida. A máquina então é pausada e o *seeding*, que se trata da indução externa de congelamento do criotubo com o auxílio de um algodão embebido em nitrogênio líquido, é realizado. Logo após, a máquina é reiniciada e o congelamento lento continua até atingir a temperatura de 35°C.

Os criotubos foram mantidos no nitrogênio líquido por pelo menos uma semana e retirados para o descongelamento, quando foram conservados em temperatura ambiente por um minuto, em seguida alocados em banho-maria a 37°C até o descongelamento visível da solução. Para a remoção gradual dos crioprotetores, a fim de evitar choque osmótico nos fragmentos, houve a lavagem em três banhos de cinco minutos cada, em soluções de descongelamento com concentrações decrescentes de sacarose (0,4%; 0,2%; 0%), DMSO (0,75 M; 0,375 M; 0 M) e MEM, em banho-maria a 37°C. Em cada etapa da lavagem, todo o conteúdo presente no criotubo era descartado e substituído pelas soluções decrescentes, até que os crioprotetores fossem totalmente removidos.

#### **5.4 Xenotransplantes e eutanásias**

Os camundongos receberam anestesia intraperitoneal de cetamina 10% (80mg/kg Cetamin®) e xilazina 2% (10mg/kg Xilazin® 2%, Syntec, São Paulo, Brasil) e foram mantidos sob inalação de isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil) vaporizado em oxigênio puro durante os processos cirúrgicos.

Antes da realização dos transplantes, todos os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral, para que o eixo hipotálamo-hipofise-gônada das camundongas não influenciasse o tecido ovariano transplantado. Ainda sob efeito dos anestésicos, foram realizadas incisões na região subcutânea dorsal de cada camundonga onde foi inserido, em cada um, um fragmento de tecido ovariano com o auxílio de uma pinça. Ao todo, foram transplantados oito fragmentos em cada camundonga, que foram divididas entre os grupos EPO, EPO+CRIO e CRIO+EPO. Os cortes foram suturados e esterilizados com iodo, e meloxicam (5 mg/kg Maxican 2%, Ourofino, São Paulo, Brasil) e tramadol (12,5 mg/kg Tramal, Pfizer, São Paulo, Brasil) foram administrados após as cirurgias para analgesia via subcutânea. Os

animais foram mantidos no biotério nas mesmas condições já descritas e observados diariamente até o dia das eutanásias para recuperação dos tecidos transplantados.

As eutanásias foram realizadas por overdose de anestésico seguida por deslocamento da cervical, executada no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UnB. Os procedimentos ocorreram aos 7, 14, 21 e 28 dias após a realização dos transplantes dentro de cada grupo de tratamento. Após atestar a perda total dos sinais vitais, os animais foram levados para o laboratório, onde ocorreu a remoção dos fragmentos ovarianos presentes no tecido subcutâneo dorsal com o auxílio de tesoura e bisturi.

## **5.5 Análises com microscopia de luz**

### **5.5.1 Processamento histológico**

Para a análise histológica, os fragmentos ovarianos foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), durante 60 min cada, clarificados em três banhos de xilol durante 60 min cada, seguidos de 3 banhos em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e inclusão. Logo em seguida, os blocos foram cortados na espessura de 5 µm. Para a montagem das lâminas histológicas, foi utilizado 1 em cada 5 cortes. As lâminas foram coradas com hematoxilina (Newprov Ltda, PR, Brasil) e eosina (Dinâmica Ltda, SP, Brasil) e montadas com lamínulas e verniz geral.

Cada fragmento foi analisado e os folículos classificados e contados em microscópio de luz (Leica DM500, Wetzlar, Germany). Foram considerados morfológicamente normais (MN) aqueles folículos que apresentavam organização das células da granulosa e ovócito arredondado e bem aderido à granulosa. Já os degenerados (DG) foram considerados os folículos com núcleo picnótico, vacúolos citoplasmáticos no ovócito, retração do ovócito, folículos descolados do estroma ou ainda em folículos com mais de uma das degenerações citadas, que foram considerados com degeneração total. Eles também foram classificados em primordiais ou em crescimento, este último abrangendo folículos primários, secundários e antrais. Foram considerados folículos em crescimento todos aqueles que possuíam uma ou mais camadas de células da granulosa cuboides ao redor do ovócito. A média

percentual de folículos primordiais MN foi calculada a partir do número de folículos primordiais MN multiplicados por 100 e divididos pelo número total de folículos primordiais (MN e degenerados). O mesmo cálculo foi realizado para se obter a média percentual de folículos em crescimento MN.

### **5.5.2 Imunohistoquímica**

Os demais cortes foram direcionados às análises imunohistoquímicas, em que foram utilizados os anticorpos primários KI-67 (em cortes com folículos) e Von Willenbrand (em cortes aleatórios) para a observação de células proliferativas e vasos sanguíneos, respectivamente. O anticorpo KI-67 é responsável por marcar células proliferativas, pois a proteína KI-67 é expressa durante a divisão celular (SUN; KAUFMAN, 2019). Já o anticorpo Von Willenbrand marca células endoteliais de vasos sanguíneos (ZANETTA et al., 2000), e por isso é recomendado para análises de vascularização.

Os ensaios para ambos os anticorpos foram realizados de maneira semelhante. As lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos de xilol (20 minutos cada) e banhos de um minuto em soluções decrescentes de álcool (3 vezes 100%, 95%, 80%, 70%). Logo após, foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato aquecido por uma hora. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, seguido do bloqueio das ligações inespecíficas, ambos com a utilização de soluções do kit. O anticorpo primário (Monoclonal mouse anti-human, M7240, Dako Denmark A/S) foi utilizado na diluição de 1:100 (1µl de anticorpo em 100 µl de BSA), e a incubação ocorreu overnight.

No segundo dia, os cortes foram incubados no anticorpo secundário (Polyclonal rabbit anti-human, A0082, Dako Denmark A/S) por uma hora, e em seguida, ficaram sob a ação do polímero durante uma hora também. Para a revelação, foi utilizada a solução DAB diluída em água destilada e PBS (10 ml PBS), 10 ml de águas destilada e 0,005g de DAB que foi preparada com a luz apagada, devido à sua fotossensibilidade. Ao pipetar a solução sobre cada corte, era observada, no microscópio, a sua ação sobre o tecido. No momento em que foi percebida a marcação das células em questão (células da granulosa para KI-67 e células endoteliais de

vasos sanguíneos para Von Willenbrand), o DAB foi lavado com PBS, e a lâmina imediatamente inserida em hematoxilina por 5 segundos. É importante ressaltar que entre cada etapa da imunohistoquímica, o material foi lavado em PBS.

Por fim, ocorreu a montagem das lâminas com as lamínulas sobre os cortes com Entellan™ (Novo rapid mounting medium for microscopy, Darmstadt, Germany). As soluções de bloqueio, o anticorpo secundário e o DAB utilizados nas etapas descritas acima fazem parte do Kit Leica Novolink- Polimer Detection System (Newcastle upon Tyne, Reino Unido).

Para as análises vasculares, foram contados somente os vasos sanguíneos marcados para o anticorpo Von Willenbrand. As lâminas foram escaneadas utilizando o microscópio EVOS M500 Imaging System (Termofisher, Brazil). Três avaliações foram realizadas a partir das imagens escaneadas: o número de vasos em cada corte; a área dos vasos, e a área percentual de tecido ovariano ocupada por vasos. Para todas as avaliações, foi utilizado o software Image J Fiji (Estados Unidos). O cálculo da área dos vasos foi feito por meio de uma ferramenta de contorno capaz de fornecer dados sobre o tamanho da área medida, sendo cada vaso medido separadamente. Para avaliar a área percentual de tecido ovariano ocupada por vasos, utilizou-se a mesma ferramenta para medição da área total de cada corte avaliado em relação à área total de vasos que cada um deles possuía. Já para as amostras tratadas com KI-67, foi utilizado o microscópio de luz para contagem de folículos, e foram considerados positivos aqueles que possuíam ao menos uma das células da granulosa marcadas com o anticorpo. Foram avaliados 54 cortes nos grupos CRIO+EPO, EPO+CRIO e CRIO, e 24 nos grupos controle.

### **5.5.3 Coloração com Tricômio de Mallory**

Essa coloração foi realizada a fim de observar possíveis áreas de fibrose no tecido ovariano, decorrentes de processos inflamatórios. O Tricômio de Mallory é uma combinação de corantes capazes de marcar tecido conjuntivo, que costuma ser abundante em regiões em processo de cicatrização ou degeneração. Para o procedimento, as lâminas foram desidratadas em três banhos de xilol e três de álcool 100% (um minuto cada). Depois foram deixadas em água corrente por 10 segundos e

inseridas em hematoxilina. Posteriormente foram lavadas em água corrente outra vez, inseridas na coloração A (0,5 g de fucsina ácida e 100 ml de água destilada) por três minutos e na coloração B (0,5 g de azul de anilina, 2 g de Orange G, 1 g de ácido fosfotúngstico e 100 ml de água destilada) por cinco minutos e direcionadas a dois banhos de álcool 93% por um minuto cada. A reidratação dos cortes ocorreu a partir de três banhos de álcool, um banho de xilol + álcool e mais três de xilol. Por fim, foram colocadas as lamínulas sobre os cortes com verniz para a montagem das lâminas.

As lâminas foram escaneadas no microscópio EVOS M500 Imaging System (Termofisher, Brazil) e analisadas por meio do software Image J Fiji (Estados Unidos), em que se utilizou uma escala de cores nos tons verde e azul, escolhida devido aos tons associados às áreas de fibrose. Esta escala foi comparada com os tecidos e a área de fibrose foi calculada.

## **5.6 Análise em microscopia eletrônica de transmissão- MET**

As amostras que permaneceram 24 horas no Karnovsky e foram transferidas para tampão cacodilato (0,1 M) foram direcionadas ao processamento para a MET. Elas foram lavadas em 3 banhos de 15 minutos com tampão cacodilato e incubadas por uma hora em ósmio (1%) e ferrocianeto de potássio (1,6%) para a pós-fixação. Depois, ocorreu o contraste *in bloc* com acetato de uranila (0,5%) e a desidratação em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70% e 100%).

As amostras foram embebidas em resina *Spurr* e acetona, e ao final foram incluídas em resina pura em uma forma de silicone para o emblocamento. Quando os blocos já estavam consistentes, foram realizados cortes semifinos de 1,5 µm para a localização dos folículos e, posteriormente, os blocos foram submetidos aos cortes ultrafinos. As análises no microscópio eletrônico consistiram na avaliação da distribuição e integridade das organelas do ovócito e das células da granulosa. Foram selecionados somente fragmentos recuperados aos 28 dias pós-transplante dentro dos grupos CRIO, EPO+CRIO e CRIO+EPO, a fim de avaliar as ultraestruturas do tecido a longo prazo, além de uma amostra do controle fresco para as comparações.

## **5.7 Análises estatísticas**

Para os resultados da contagem e classificação folicular, foi avaliada a proporção entre o número bruto de folículos morfologicamente normais (MN) juntamente com o número de folículos degenerados. Para este e também para o teste imunohistoquímico com o anticorpo KI-67, foram realizados testes qui-quadrado por meio do software R (versão 4.1.0 Vienna, Áustria), comparando os grupos transplantados (CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO) entre si e os controles fresco, EPO, controle CRIO, controle CRIO+EPO e controle EPO+CRIO também entre si. Para os resultados das demais análises, foi feita uma ANOVA de 2 vias entre os grupos transplantados (CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO) e um teste T de amostras independentes entre os controles fresco, EPO, controle CRIO, controle CRIO+EPO e controle EPO+CRIO ambos os testes realizados por meio do software SPSS (versão 20, Chicago, Estados Unidos).

## **6. Resultados e discussão**

### **6.1 Análise histológica**

Ao todo, foram encontrados 3.646 folículos nos grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO, sendo 2.120 classificados como primordiais, dentre os quais 83,91% eram morfologicamente normais (MN), como está demonstrado na tabela 1; e 1.526 folículos em crescimento, sendo 86,63% MN (tabela 2). Já nos grupos controle, foram analisados 5.210 folículos, dos quais 4.410 eram primordiais, sendo 88,66% deles MN; e 800 em crescimento, desses 87,50% MN. Todas as análises estatísticas foram realizadas com base no número bruto de folículos MN e degenerados.

Em relação aos folículos primordiais MN, o grupo CRIO+EPO obteve número significativamente maior do que os grupos CRIO e EPO+CRIO aos 7 e 14 dias, mas foi menor que o grupo CRIO também aos 21 dias pós-transplante ( $P < 0,05$ ). Já aos 28 dias pós-transplante, o grupo EPO+CRIO apresentou maior número de folículos primordiais MN do que o grupo CRIO+EPO ( $P < 0,05$ ), porém nenhum dos dois obteve diferença estatística em relação ao grupo CRIO. As médias e diferenças estatísticas estão dispostas na tabela 1.

Estima-se que durante o período de hipoxia, haja a perda de 50-90% dos folículos ovarianos (NISOLLE et al., 2000), evento que ocorre em grande parte devido ao *burnout* de folículos primordiais característico do período pós-transplante (Cacciotola 2021). No entanto, a eficácia do xenotransplante de tecido ovariano quanto à ativação e desenvolvimento de folículos primordiais já havia sido demonstrada em outras espécies, como ovelhas (GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, 1994), bovinos (BOLS et al., 2010), leões (WIEDEMANN et al., 2012) e suínos (KAGAWA et al., 2005).

Porém, apesar dos resultados positivos apresentados na literatura, a sobrevivência folicular continua sendo um desafio em relação ao transplante. Assim, a EPO se apresenta como uma ferramenta potencial, levando em conta o seu sucesso em diversos estudos (SUZUKI et al., 2008; KOLUSARI; OKYAY; KOÇKAYA, 2018). No presente estudo, foi possível observar efeitos positivos da EPO na sobrevivência de folículos primordiais, considerando as diferenças estatísticas do grupo CRIO+EPO em relação aos demais. Isto indica que a aplicação não sistêmica de EPO foi capaz de auxiliar na manutenção da reserva de folículos primordiais, fator de grande importância para a conservação do tecido ovariano.

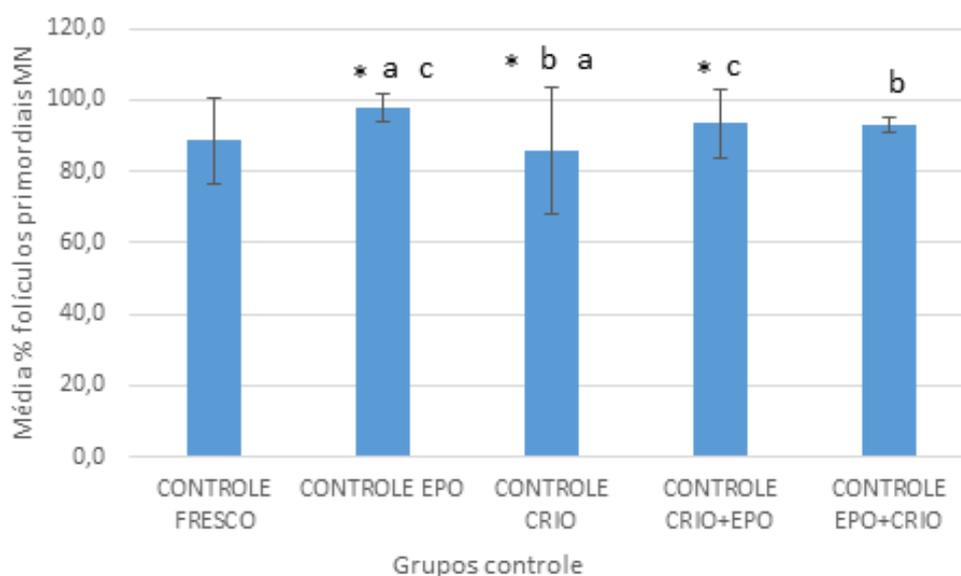
**Tabela 1.** Número total e média percentual de folículos primordiais considerados morfológicamente normais (MN) nos tratamentos EPO+CRIO, CRIO+EPO e CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante.

7 DIAS	<i>Folículos Primordiais</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	285	58,7±30,0	228 <sup>a</sup>	74,5±37,3
<i>CRIO+EPO</i>	227	73,8±22,6	212 <sup>*b</sup>	81,8±32,2
<i>CRIO</i>	367	63,6±32,3	303	70,2±36,7
14 DIAS	<i>Folículos Primordiais</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	46	49,0±11,53	28 <sup>a</sup>	49,1±20,9
<i>CRIO+EPO</i>	375	40,4±31,28	322 <sup>*b</sup>	67,0±35,3
<i>CRIO</i>	258	72,2±17,0	185	73,1±16,2
21 DIAS	<i>Folículos Primordiais</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	4	3,0±3,16	3	41,7±43,3
<i>CRIO+EPO</i>	26	21,6±24,05	10 <sup>*</sup>	34,4±41,3
<i>CRIO</i>	95	37,5±24,55	82	89,6±13,0
28 DIAS	<i>Folículos Primordiais</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	405	31,8±31,56	386 <sup>a</sup>	89,5±17,9
<i>CRIO+EPO</i>	19	10,6±8,64	9 <sup>b</sup>	37,0±33,7
<i>CRIO</i>	10	31,3±25,17	10	100±0

\*: diferença dos grupos CRIO+EPO ou EPO+CRIO quando comparados ao grupo CRIO. **Letras minúsculas diferentes:** diferenças estatísticas entre os grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO. P<0,05. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. **DP:** desvio padrão. **MN:** folículos morfológicamente normais. **%:** porcentagem de folículos MN. Grupo EPO+CRIO, em que os fragmentos ovarianos de gata foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C primeiro, criopreservados, descongelados e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em EPO da mesma forma e xenotransplantados; grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e transplantados.

Quanto aos folículos primordiais nos grupos controle, houve diferença significativa entre o controle fresco e os controles CRIO, EPO e CRIO+EPO, e em todas as três comparações, o grupo fresco obteve número estatisticamente inferior de folículos primordiais MN ( $P < 0,05$ ). O controle CRIO também apresentou menor número de folículos MN quando comparado aos controles EPO e EPO+CRIO ( $P < 0,05$ ). Além disso, na comparação entre os controles EPO e EPO+CRIO, o primeiro obteve número estatisticamente menor de folículos primordiais MN ( $P < 0,05$ ). Os controles CRIO+EPO e EPO+CRIO também foram comparados, e o CRIO+EPO obteve significativamente menor de folículos MN ( $P < 0,05$ ). Estas comparações estão demonstradas na figura 4. A partir destes resultados, é possível inferir que os protocolos de criopreservação e incubação direta em EPO, por si só, não surtiram efeitos negativos para a morfologia dos folículos ovarianos, tendo em vista que em relação ao controle fresco, os demais controles não apresentaram número menor de folículos primordiais MN, além do alto número de folículos MN encontrados no controle EPO+CRIO.

**Figura 4.** Representação gráfica da estatística da porcentagem média de folículos primordiais morfologicamente normais (MN) nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.



\*: diferenças estatísticas entre os demais controles quando comparados ao controle Fresco. **Letras minúsculas iguais:** diferenças estatísticas entre dois grupos controle (exceto o controle Fresco).  $P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Controle fresco: os fragmentos ovarianos de gata foram imediatamente fixados assim que chegaram ao laboratório; Controle EPO: os fragmentos foram

incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados; Controle CRIO: os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e transplantados; Controle CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em EPO e fixados; Controle EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro, criopreservados, descongelados e fixados

Já em relação aos folículos em crescimento MN, o grupo CRIO+EPO obteve número significativamente superior em relação ao grupo CRIO aos 7, 14 e 21 dias pós-transplante. Aos 21 dias, o grupo CRIO+EPO também obteve número superior de folículos em crescimento MN quando comparado ao grupo EPO+CRIO ( $P < 0,05$ ), e aos 28 dias nenhuma diferença estatística foi observada entre os 3 grupos (Tabela 2). A continuidade do desenvolvimento de folículos primordiais para estágios seguintes é um fator de suma importância para a manutenção da viabilidade do tecido ovariano após criopreservação e transplante (DEMEESTERE et al., 2009). Commin et al. (2012) observou o desenvolvimento de folículos em tecido ovariano de cadela tratado com EPO e xenotransplantado para camundongas imunodeficientes. Foram detectados folículos secundários com estrutura preservada 16 semanas após o transplante de fragmentos ovarianos, apesar da massiva perda folicular. Kulusari et al. (2018), no seu estudo com tecido ovariano de ratas autotransplantado, notaram o decaimento de folículos antrais no grupo de amostras que não receberam tratamento com EPO. Estes resultados corroboram com a ideia de que a EPO possui efeitos benéficos não somente para a sobrevivência folicular, mas também para a continuidade do desenvolvimento destes folículos. Do mesmo modo, no presente estudo, a presença de folículos em crescimento aos 21 dias no grupo CRIO+EPO indica que provavelmente estes folículos se desenvolveram ao longo do período pós-transplante, sinalizando a atuação positiva da EPO sobre o tecido.

**Tabela 2.** Total e a média percentual de folículos em crescimento considerados morfológicamente normais nos tratamentos EPO+CRIO, CRIO+EPO e CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias de transplante.

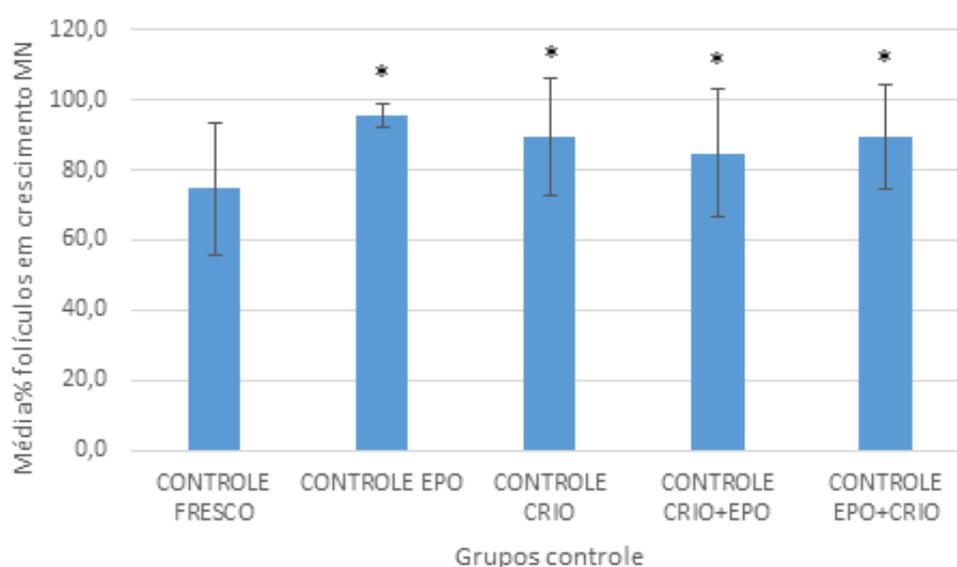
7 DIAS	<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	40	41,3±30,0	34	89,3±14,9
<i>CRIO+EPO</i>	86	26,2±22,6	81*	84,8±18,2
<i>CRIO</i>	166	27,3±26,7	115	81,4±30,2
14 DIAS	<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	33	51,0±11,53	30	94,6±5,4
<i>CRIO+EPO</i>	250	59,6±31,28	244*	96,0±5,4
<i>CRIO</i>	86	27,8±17,00	61	46,2±31,0
21 DIAS	<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	76	97,0±3,16	54 <sup>a</sup>	69,5±5,7
<i>CRIO+EPO</i>	122	56,2±36,72	117 <sup>*b</sup>	83,4±32,1
<i>CRIO</i>	99	62,5±24,55	79	72,3±34,8
28 DIAS	<i>Folículos Em crescimento</i>			
	<i>n °</i>	<i>% ± DP</i>	<i>n ° MN</i>	<i>% MN ± DP</i>
<i>EPO+CRIO</i>	325	53,9±36,22	281	90,4±10,0
<i>CRIO+EPO</i>	230	89,4±8,64	213	90,0±6,8
<i>CRIO</i>	15	68,7±25,17	13	76,7±37,3

\*: diferença os grupos CRIO+EPO ou EPO+CRIO e o grupo CRIO. **Letras minúsculas diferentes:** diferenças estatísticas entre os grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO.  $P < 0,05$ . **DP:** desvio padrão. **MN:** morfológicamente normal. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados.

Nas comparações entre os grupos controle em relação ao número de folículos em crescimento MN, houve diferença estatística entre o controle fresco e todos os demais, sendo o controle fresco o que apresentou o menor número de folículos MN em todas as comparações ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). Novamente, é possível observar que

os protocolos escolhidos e o método de uso da EPO para este estudo não apresentaram efeitos tóxicos ao tecido ovariano, tendo em vista que os controles CRIO+EPO, EPO+CRIO e CRIO apresentaram número satisfatório de folículos em crescimento MN em relação ao controle fresco. Estes resultados apresentados pelos grupos controle, tanto para folículos primordiais, quanto em crescimento, são de extrema importância, tendo em vista que a incubação direta do tecido em EPO é uma técnica que ainda não havia sido testada, e assegurar que ela não apresente efeitos nocivos aos folículos e essencial para garantir a sua viabilidade.

**Figura 5.** Representação gráfica da estatística da porcentagem média de folículos em crescimento morfológicamente normais (MN) nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.



\*: diferenças estatísticas entre os controles comparados ao controle Fresco. Não houve diferença entre os grupos quando comparados entre si ( $P < 0,05$ ). EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Controle Fresco: os fragmentos ovarianos de gata foram levados ao laboratório e imediatamente fixados. Controle EPO: os fragmentos foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados; Controle CRIO: os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e fixados; Controle CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados; Controle EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e fixados.

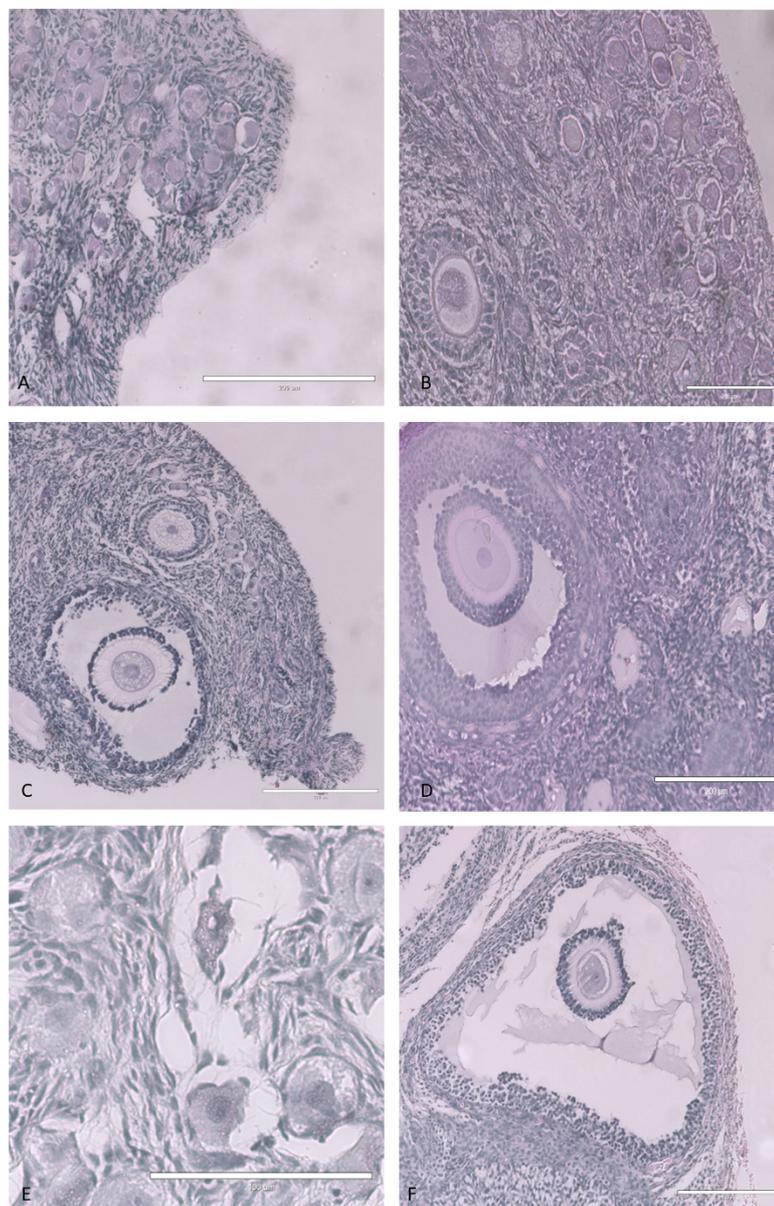
As principais degenerações encontradas tanto nos grupos de tratamento, quanto nos grupos controle foram ovócitos totalmente descolados dos folículos e folículos descolados do estroma. Todos os grupos apresentados nesse estudo

demonstraram degenerações citoplasmáticas e nucleares em pelo menos uma parte dos folículos analisados. Assim, um folículo somente era classificado como degenerado quando apresentava mais de uma alteração morfológica. A Figura 6 mostra os fragmentos de tecido ovariano corados com hematoxilina e eosina, bem como algumas das degenerações encontradas.

As degenerações podem ser indicativas de atresia folicular, causadas tanto pela criopreservação, quanto pelo transplante (DOLMANS; DONNEZ; CACCIOTTOLA, 2021). Demirci et al. (2003) demonstraram alterações morfológicas em tecido ovariano de ovelha criopreservado e descongelado, em que foi possível observar degenerações citoplasmáticas ou mais de uma degeneração em um mesmo folículo em pelo menos um dos protocolos de criopreservação testados no estudo. Já no presente estudo, levando em conta as comparações feitas entre os grupos controle (tanto para folículos primordiais, quanto para folículos em crescimento), não foram observadas degenerações que fossem capazes de diminuir significativamente a quantidade de folículos morfológicamente normais no grupo controle CRIO em relação aos demais controles, indicando que a criopreservação por si só não foi capaz de gerar alterações morfológicas drásticas.

As degenerações, como mencionado previamente, também podem ser provenientes do período de hipóxia sofrido após o transplante. Mahmoodi et al. (2014) não observaram diferenças morfológicas entre os controles e os fragmentos de tecido ovariano autotransplantado para camundongas que receberam injeções de EPO. Isto corrobora com os efeitos protetivos da EPO, mas discorda com os achados do estudo aqui descrito, onde apesar dos bons resultados apresentados pelo grupo CRIO+EPO, as degenerações foliculares foram comumente observadas nos grupos CRIO, EPO+CRIO e CRIO+EPO tanto em folículos primordiais, quanto em crescimento.

**Figura 6.** Figuras histológicas de tecido ovariano de gatas domésticas criopreservados e xenotransplantados, corados com Hematoxilina e Eosina.



(A) grupo EPO+CRIO barra 200  $\mu\text{m}$ , (B) grupo CRIO+EPO barra 200  $\mu\text{m}$ , (C) grupo CRIO barra 200  $\mu\text{m}$ , (D) Controle Fresco barra 200  $\mu\text{m}$ , (E) Folículos primordiais descolados do estroma encontrados no grupo CRIO+EPO barra 100  $\mu\text{m}$ . (F) Ovócito descolado das células da granulosa encontrado no grupo EPO+CRIO, barra= 200 $\mu\text{m}$ . Fonte: Figura elaborada pela autora. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e

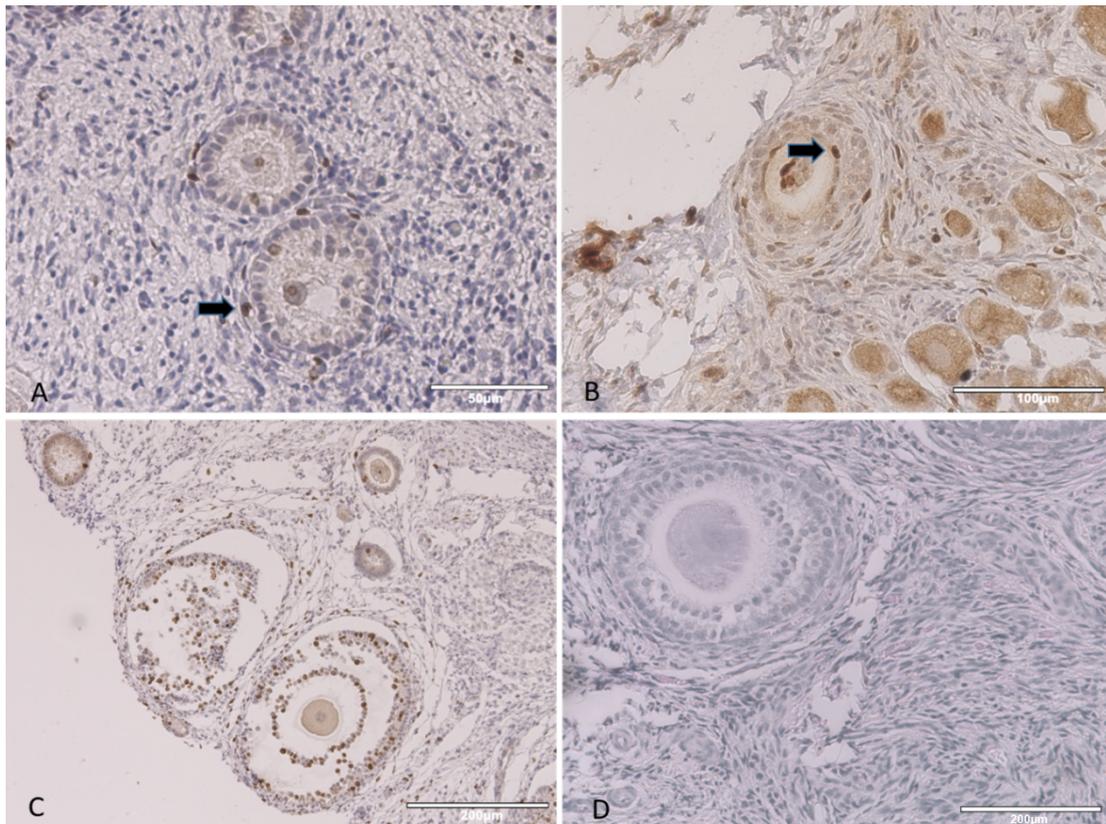
xenotransplantados; Controle fresco: os fragmentos foram imediatamente fixados assim que chegaram ao laboratório.

Por fim, os resultados apresentados apontam para os efeitos protetivos da incubação direta em EPO, com ênfase no maior sucesso da utilização da EPO após a criopreservação em relação à sobrevivência folicular. O uso da EPO de forma não sistêmica também já foi demonstrado em outros estudos com sucesso. KOLUSARI et al. (2018) realizaram autotransplante de tecido ovariano de ratas para a região subcutânea abdominal, e aplicaram injeções de 5000 UI/kg de EPO no local do transplante. Ao final, obtiveram uma contagem folicular significativamente maior no grupo tratado com EPO do que no que não recebeu o tratamento. SUZUKI et al. (2008) experimentaram a aplicação de asialo EPO, uma forma sintética de eritropoietina sem funções eritropoiéticas, no tecido ovariano de cadelas por meio de uma esponja embebida na substância, colocada sob o local do transplante, demonstrando altas taxas de sobrevivência de folicular. Assim, juntamente com os resultados aqui apresentados, é possível inferir que a aplicação não sistêmica de EPO possui eficácia para a sobrevivência e preservação da morfologia folicular.

## **6.2 Proliferação celular**

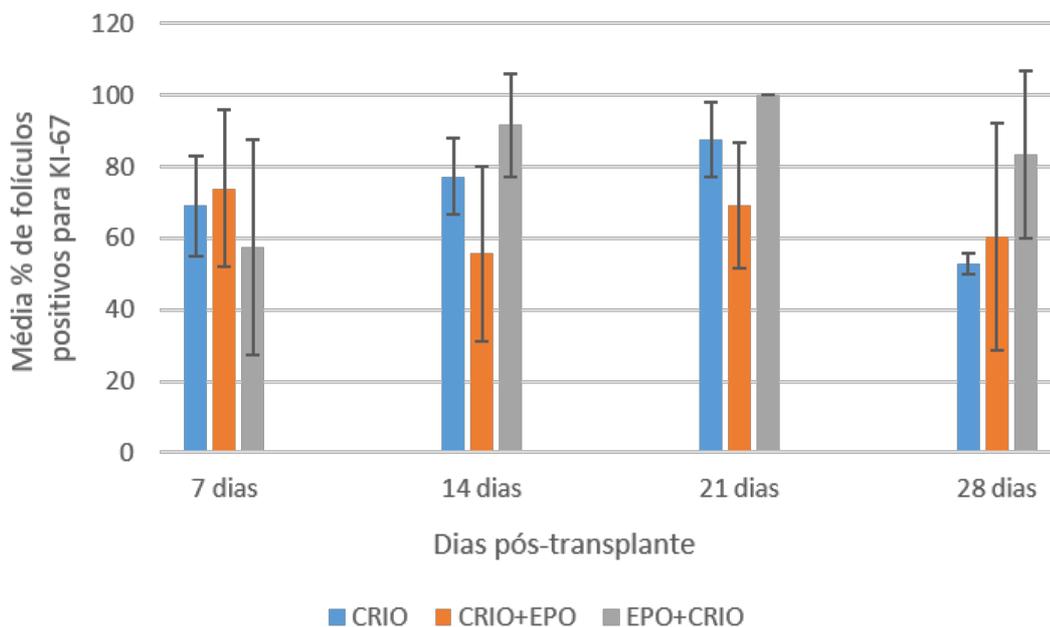
Ao todo, foram analisados 379 folículos nos grupos de tratamento (EPO+CRIO, CRIO+EPO e CRIO), dos quais 261 (68,80%) apresentaram marcação com KI-67. Nos controles, o total de folículos foi de 212, sendo 141 (66,50%) proliferativos, ou seja, marcados por KI-67. Foram considerados proliferativos os folículos que apresentaram pelo menos uma célula da granulosa marcada. A marcação para KI-67 está ilustrada na Figura 7. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO (Figura 8).

**Figura 7.** Tecido ovariano de gatas marcado com o anticorpo KI-67 e corado com Hematoxilina.



(A) grupo EPO+CRIO barra= 50µm, (B) grupo CRIO+EPO barra= 100µm, (C) grupo CRIO, barra= 200µm, (D) tecido sem marcação por KI-67, barra= 200µm. Os folículos considerados positivos foram aqueles que apresentaram ao menos uma célula da granulosa positiva para KI-67 (células com coloração marrom). Fonte: Figura elaborada pela autora. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados. Note que as setas pretas na figura A e B apontam para células da granulosa marcadas por KI-67, o que não pode ser visto na figura D, onde não há marcações pelo anticorpo.

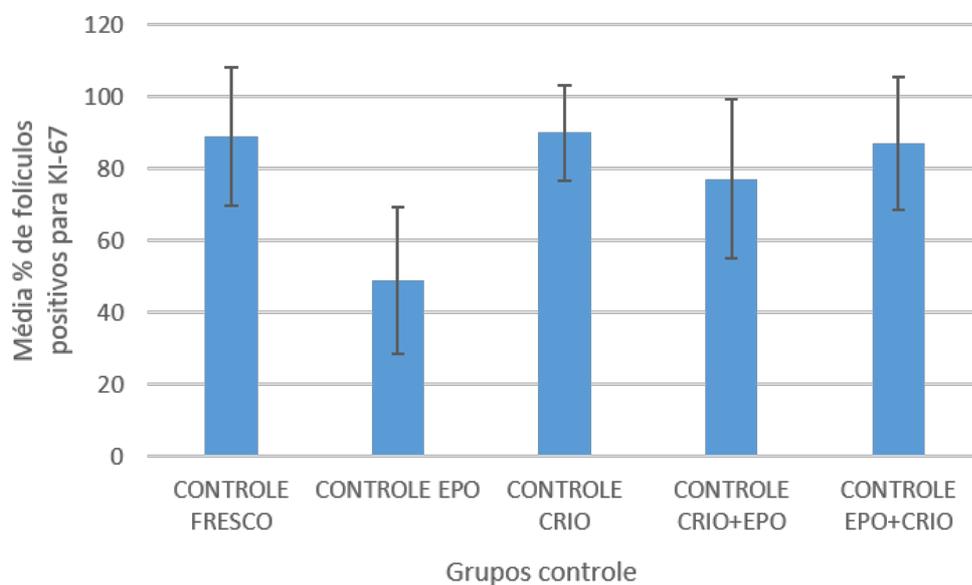
**Figura 8.** Representação gráfica da análise estatística para a porcentagem média de folículos positivos para KI-67 nos grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante.



Não houve diferenças estatísticas em nenhuma das comparações realizadas entre os grupos.  $P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados.

Assim como nos grupos de tratamento, nenhuma das comparações realizadas demonstrou diferenças estatísticas para os controles ( $p < 0,05$ ). A Figura 9 representa os resultados relacionados aos controles.

**Figura 9.** Representação gráfica da análise estatística para a média percentual de folículos positivos marcados com KI-67 realizada entre os grupos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO



EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Controle fresco: os fragmentos ovarianos de gata foram fixados assim que chegaram ao laboratório; Controle EPO: os fragmentos foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados; Controle CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e fixados; Controle CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados; Controle EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e fixados.

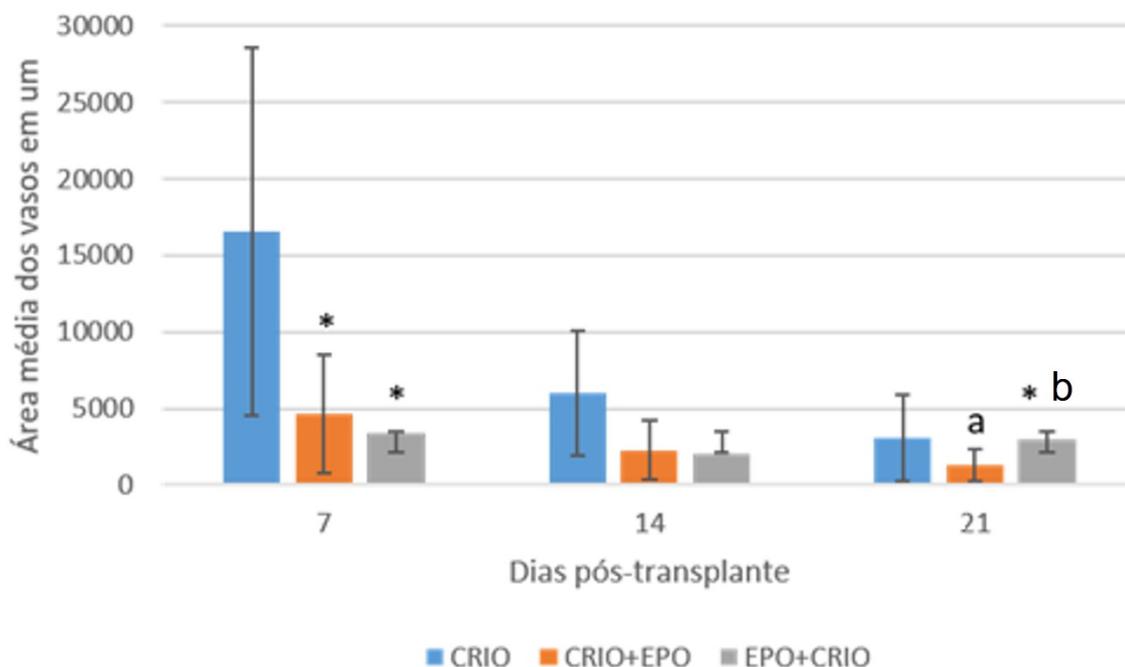
A manutenção da proliferação celular em tecido ovariano de gatas já foi previamente observada em outro estudo com criopreservação por congelamento lento e xenotransplante (BOSCH et al., 2004), demonstrando que a continuidade da proliferação celular é mantida mesmo depois do tecido ser submetido a ambos os procedimentos. Mahmoodi et al. (2014) realizaram a avaliação das taxas de apoptose em tecido ovariano de camundonga autotransplantado, na qual os animais receberam injeções de EPO (500 UI/Kg), demonstrando taxas significativamente menores de apoptose no grupo que recebeu a EPO em relação ao controle. Kulusari et al. (2018) demonstraram a diminuição da apoptose em ensaios de TUNEL e a diminuição dos níveis de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo, em tecido ovariano de ratas autotransplantados e tratados com EPO de

forma sistêmica. Estes resultados mostram uma perspectiva diferente do que foi achado no presente estudo. Aqui foi possível observar a presença de folículos positivos para KI-67 em todos os grupos (tanto nos grupos de CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO, quanto nos controles), sendo observado apenas um pequeno número de folículos negativos em cada um deles. No entanto, a ausência de diferenças estatísticas aponta para a necessidade de investigações futuras sobre a eficiência da incubação de tecido ovariano diretamente em EPO em relação à proliferação celular dos folículos.

### **6.3 Vascularização**

Dentre as três análises realizadas para a avaliação da angiogênese (área média dos vasos, número de vasos e área percentual ocupada por vasos), foram encontradas diferenças estatísticas somente em relação à área média dos vasos, onde o grupo CRIO apresentou áreas de vasos maiores que os grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO aos 7 dias, e EPO+CRIO apresentou áreas de vasos maiores do que os grupos CRIO e CRIO+EPO aos 21 dias ( $p < 0,05$ ), como está ilustrado na Figura 10. Ao todo, foram analisados 54 cortes dentro dos grupos de tratamento e 24 dentro dos grupos controle fresco e EPO. O dia 28 pós-transplante foi excluído de todas as análises referentes à vascularização devido à escassez de amostras.

**Figura 10.** Representação gráfica da análise estatística da área média dos vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos dias 0, 7, 14 e 21 pós-transplante.



\*: diferenças entre o grupo EPO+CRIO ou CRIO+EPO e o grupo CRIO. **Letras minúsculas diferentes** diferenças entre os grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO.  $P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados.

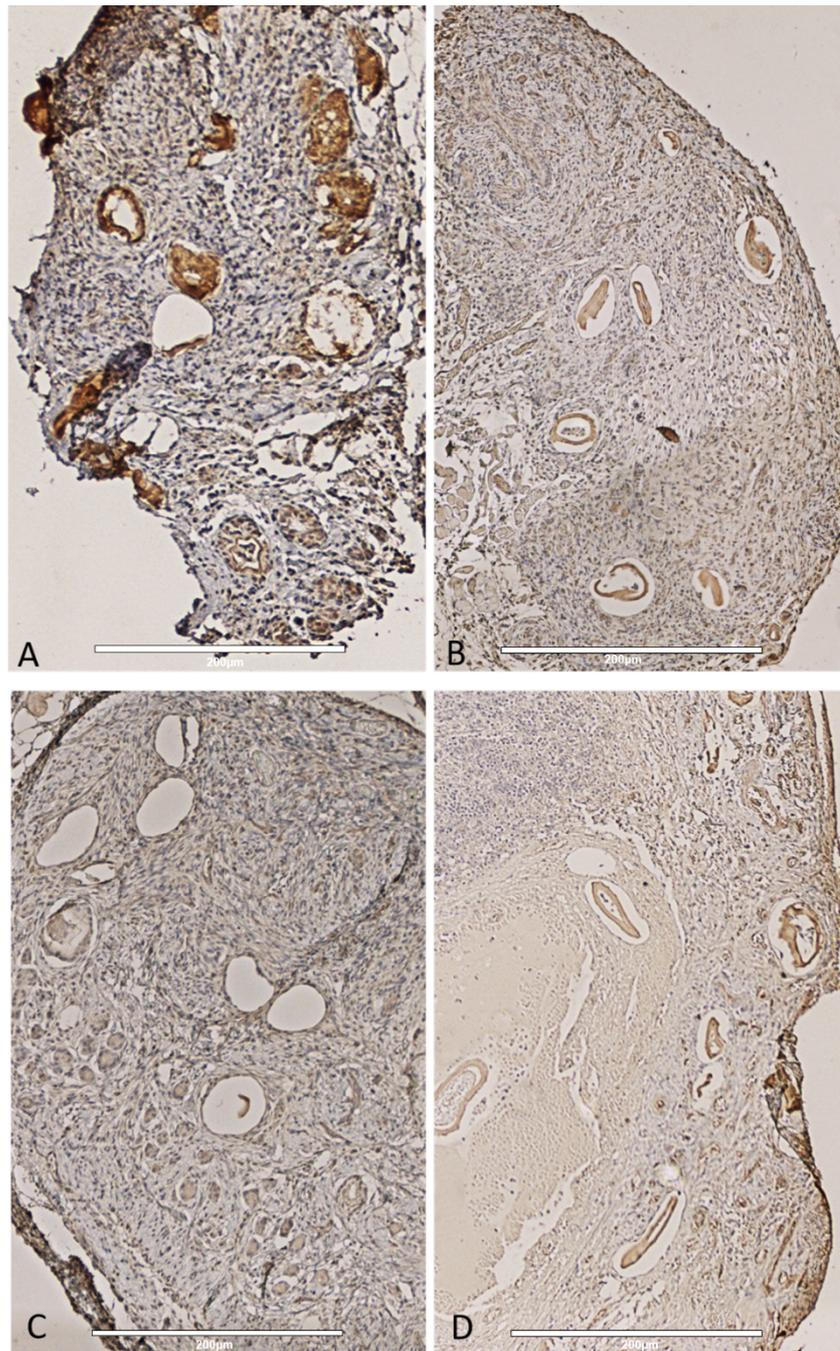
A EPO é um fator angiogênico associado a diversas vias de sinalização. Sabe-se que quando ela se liga a receptores presentes em células hematopoiéticas que estão em processo de diferenciação, ela é capaz de ativar, dentre outras, a via de sinalização JAK2/STAT5, associada ao processo de angiogênese (RIBATTI et al., 2003). Além disso, células endoteliais possuem receptores para EPO, aumentando o seu nível de proliferação como resposta (ANAGNOSTOU et al., 1994).

Kolusari et al. (2018) mostraram resultados positivos para o aumento da neoangiogênese em tecido ovariano transplantado para a região subcutânea abdominal de ratos, com injeção local de 5000UI/Kg de EPO. Foram medidos os níveis

dos fatores de crescimento VEGF e VEGF-C, que se mostraram elevados no grupo que recebeu o tratamento. Já no presente estudo, não foi realizada a avaliação dos marcadores ou vias de sinalização associados à angiogênese, mas foi possível observar que o grupo EPO+CRIO apresentou área média de vasos estatisticamente maior do que os grupos CRIO e CRIO+EPO aos 21 dias pós-transplante, o que pode indicar o avanço da angiogênese nestes fragmentos ovarianos.

O tempo de revascularização de tecido ovariano transplantado já foi medido em alguns estudos, incluindo uma pesquisa realizada com ratos, em que ovários transplantados apresentaram revascularização abundante em aproximadamente 48 horas (DISSEN; FAHRENBACH; OJEDA, 2014). Em contrapartida, em outro estudo realizado com xenotransplante de tecido ovariano de rato para camundongo (intramuscular e subcutâneo), os transplantes estavam avasculares quando avaliados dois dias após as cirurgias, mas mostravam sinais de vascularização avançados dos sete aos dez dias, e maturidade da vascularização aos 21 dias (ISRAELY et al., 2004). Estes dados corroboram em partes com os resultados apresentados no presente estudo, levando em conta o aumento da área dos vasos aos 21 dias (no grupo EPO+CRIO). Porém, também é importante observar que, aos 7 dias pós-transplante, os grupos EPO+CRIO e CRIO+EPO apresentaram área média de vasos estatisticamente menor que o grupo CRIO. Esta menor área média pode indicar novos vasos, de menor calibre. Esta informação, somada à maior área média de vasos no grupo EPO+CRIO aos 21 dias pós-transplante, pode ser um indicativo do aumento do calibre dos vasos sanguíneos que antes (aos 7 dias) eram menores, e aumentaram de calibre ao longo de 21 dias. As marcações dos vasos pelo anticorpo Von Willenbrand estão ilustradas na Figura 11.

**Figura 11.** Tecido ovariano marcado com o anticorpo Von Willenbrand e corado com Hematoxilina.

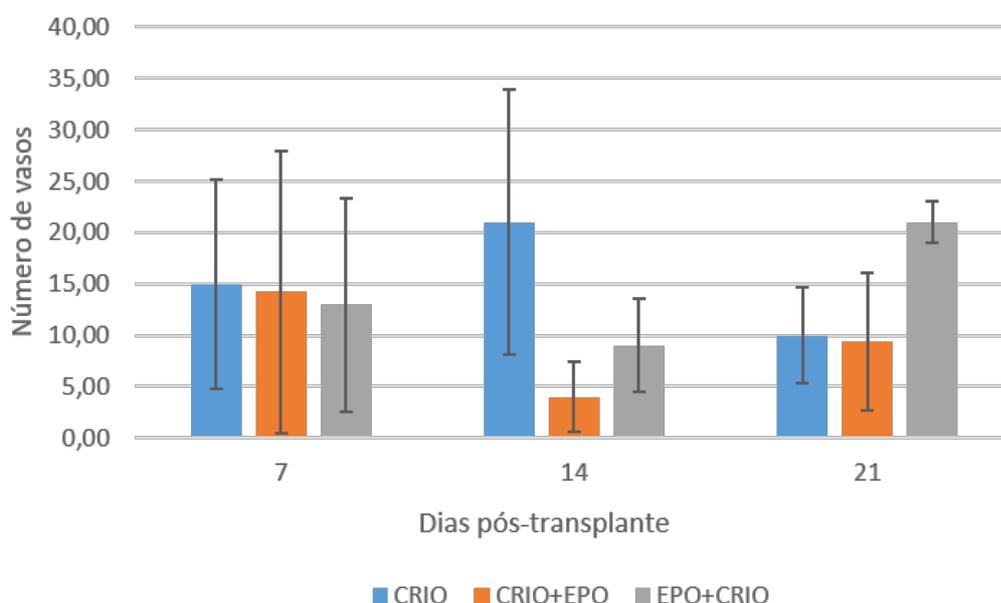


(A) grupo CRIO, (B) grupo CRIO+EPO, (C) grupo EPO+CRIO, (D) controle fresco. Os vasos com coloração marrom foram considerados positivos para o anticorpo Von Willenbrand. Barra=400µm. Fonte: Figura elaborada pela autora. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos de gata foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma

maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Controle fresco: os fragmentos foram imediatamente fixados assim que chegaram ao laboratório.

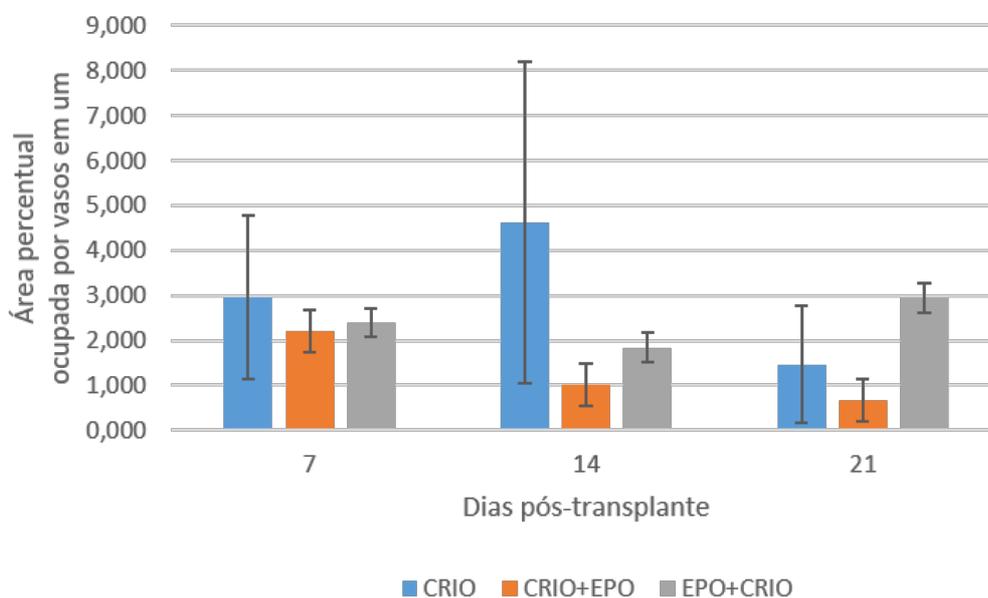
Não foram observadas diferenças estatísticas para a contagem do número de vasos sanguíneos por fragmento, ou para a área percentual de cada fragmento ocupada por vasos. Os dados relacionados ao número de vasos sanguíneos e área percentual ocupada por vasos estão representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

**Figura 12.** Representação gráfica das análises estatísticas do número de vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 0,7, 14 e 21 dias pós-transplante.



$P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados;

**Figura 13.** Representação gráfica das análises estatísticas da área percentual de tecido ovariano ocupada por vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 0, 7, 14 e 21 dias pós-transplante.



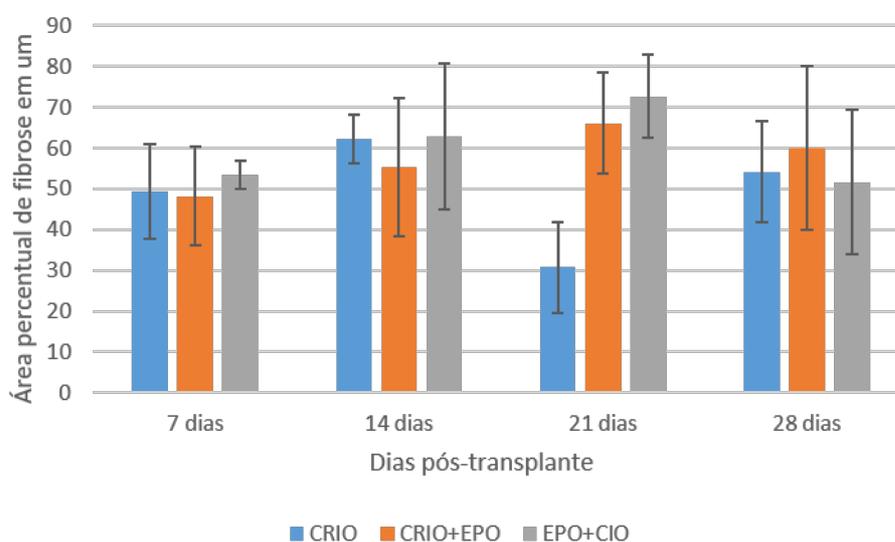
$P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram incubados em EPO primeiro da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados.

O uso da EPO também demonstrou efeito angiogênico significativo em tecido ovariano de cadelas xenotransplantado para a região subcutânea dorsal de camundonga imunodeficiente (COMMIN et al., 2012). Os animais receberam administração sistêmica de EPO, e o grupo que passou pelo tratamento obteve maior densidade de vasos em comparação ao grupo que não foi tratado com EPO. Isso foi um contraponto em relação ao que foi achado no presente estudo, tendo em vista que não foi possível observar um aumento significativo da área de tecido ovariano ocupada por vasos e nem o aumento do número de vasos quando foram comparados os grupos tratados com EPO e o controle CRIO. No entanto, o aumento da área dos vasos corrobora com as perspectivas futuras para o sucesso da EPO enquanto fator angiogênico em tecido ovariano xenotransplantado.

## 6.4 Áreas de fibrose

Ao todo, foram analisados 72 cortes dentro dos grupos de tratamento e 30 cortes dentro dos grupos controle fresco e EPO. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO na avaliação das áreas de fibrose nos fragmentos ( $P < 0,05$ ) (Figura 14).

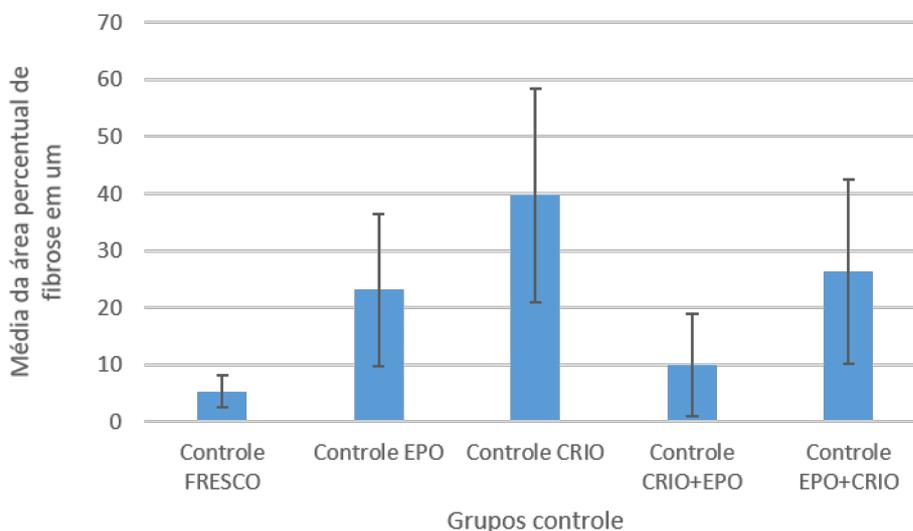
**Figura 14.** Representação gráfica da análise estatística da área percentual de fibrose observada a partir da coloração com Tricômio de Mallory e hematoxilina nos grupos CRIO+EPO, CRIO e EPO+CRIO aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-transplante.



$P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO os fragmentos ovarianos de gata foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados; Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO: fragmentos foram primeiramente incubados em EPO da mesma maneira, criopreservados, descongelados e xenotransplantados.

Em relação aos grupos controle, todos eles, exceto o controle CRIO+EPO, apresentaram aumento significativo das áreas de fibrose quando comparados ao controle fresco ( $p < 0,05$ ). Também foi possível observar diferenças significativas entre os controles CRIO e CRIO+EPO, em que o segundo apresentou menores áreas de fibrose (Figura 15).

**Figura 15.** Representação gráfica da estatística para a média de áreas percentuais de fibrose detectadas a partir da coloração com tricômio de Mallory e hematoxilina nos controles Fresco, EPO, CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO.

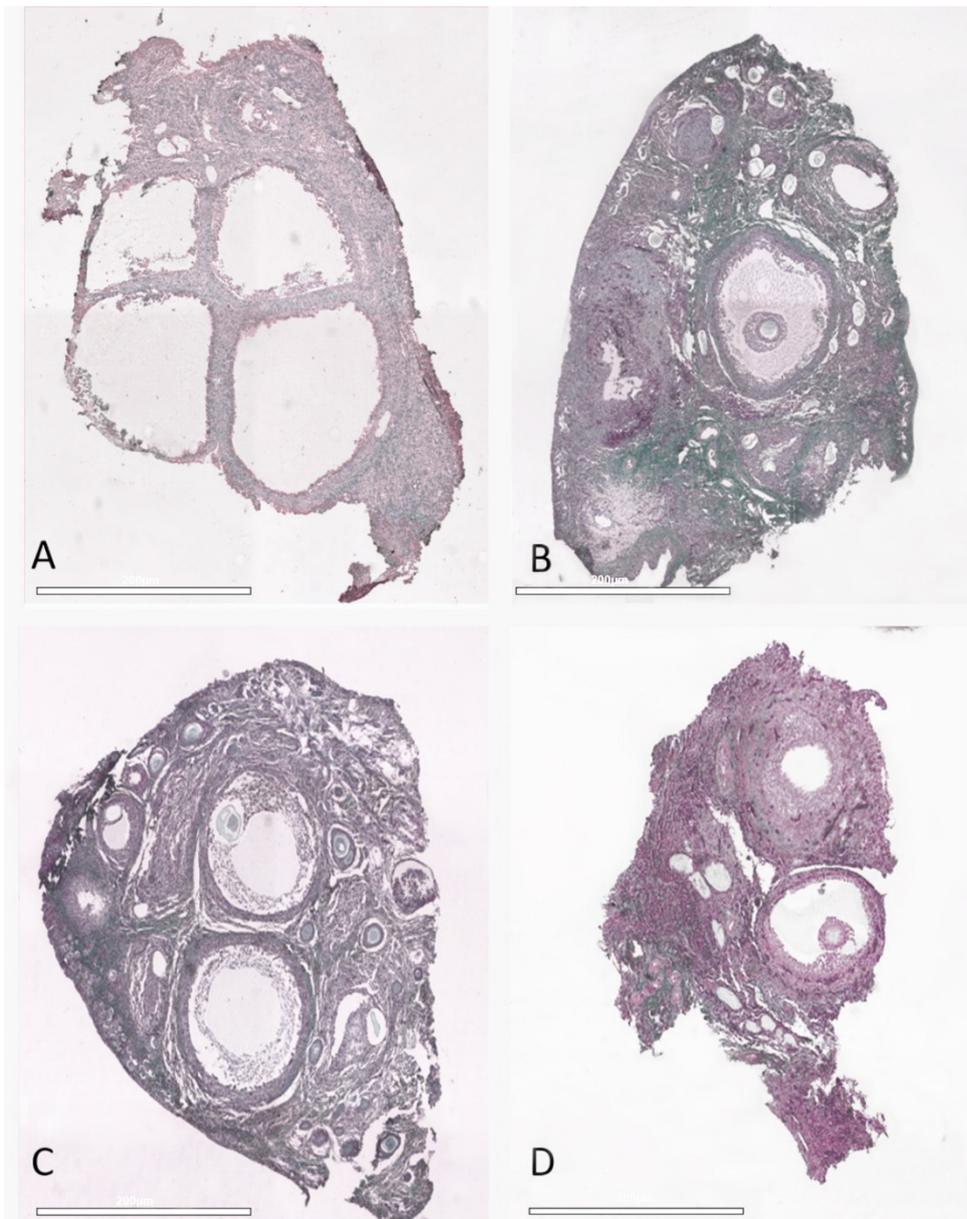


$P < 0,05$ . EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Controle Fresco: os fragmentos ovarianos de gata foram trazidos ao laboratório e fixados imediatamente; Controle EPO: os fragmentos foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e fixados. Controle CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e fixados. Controle CRIO+EPO: os fragmentos foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C, e fixados; Controle EPO+CRIO: os fragmentos foram primeiramente incubados em EPO da mesma maneira, criopreservados, descongelados e fixados.

As áreas de fibrose no estroma podem ser causadas tanto pela criopreservação, quanto pelos danos isquêmicos que ocorrem após transplante (DATH et al., 2010). Elas surgem por conta da hipóxia, que desencadeia a expressão de uma série de genes de fatores inflamatórios que ocasionam a transmigração de macrófagos e neutrófilos e geram danos ao tecido (VOLLMAR et al., 1995). Os dados apresentados na Figura 15 demonstram que não houve diferença estatística entre os grupos CRIO, CRIO+EPO e EPO+CRIO, além disso, foi possível observar a presença de áreas de fibrose em todos eles de acordo com as medições realizadas. A elevação destas áreas nos controles em relação ao controle fresco mostra que a criopreservação e a exposição à EPO por duas horas a 37°C podem iniciar a fibrose mesmo antes do transplante. Commin et al. (2012) realizaram o xenotransplante de tecido ovariano criopreservado de cadela para camundongos imunodeficientes, e

obtiveram resultados que contrastam com o presente estudo. Foi demonstrado que nos tecidos tratados com EPO, nenhuma área de fibrose foi detectada, no entanto, a aplicação de EPO foi realizada de forma sistêmica. Assim, são necessários estudos futuros para avaliar se os protocolos de aplicação da EPO utilizados aqui podem ser eficientes na preservação contra a formação de áreas de fibrose. A coloração observada nos tecidos com área de fibrose está representada na Figura 16.

**Figura 16.** Tecido ovariano de gatas domésticas corado com Tricômio de Mallory.



(A) Grupo CRIO+EPO, (B) grupo CRIO, (C) grupo EPO+CRIO, (D) controle EPO, (E) controle fresco. A coloração esverdeada indica a presença de áreas de fibrose. Barra=400µ. Fonte: Figura elaborada

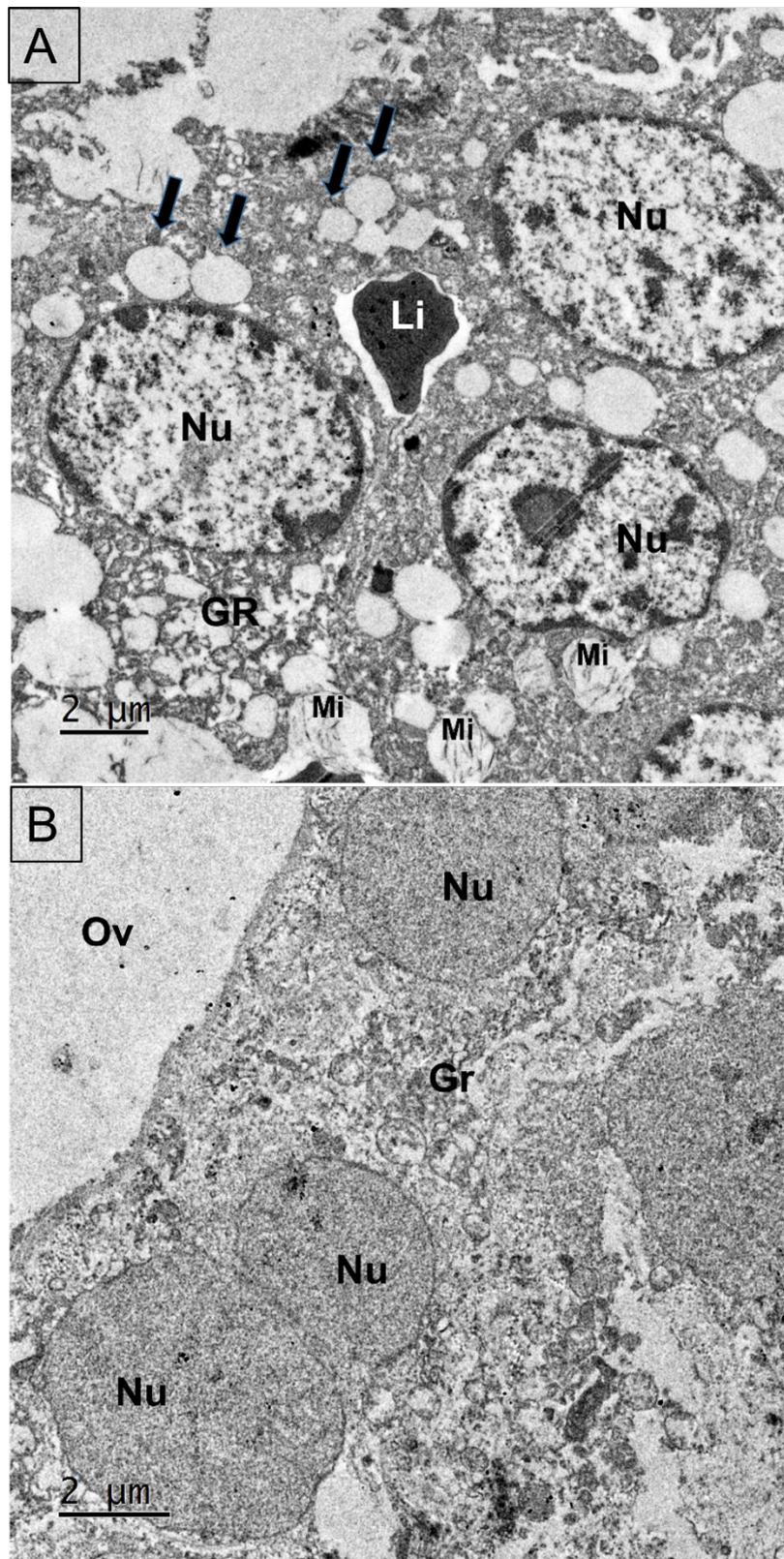
pela autora. EPO: Eritropoietina, CRIO: Criopreservação. Grupo CRIO+EPO: os fragmentos foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C, e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo CRIO os fragmentos ovarianos foram somente criopreservados, descongelados e xenotransplantados para camundongas NUDE; Grupo EPO+CRIO, em que os fragmentos foram incubados em EPO da mesma forma primeiro, criopreservados, descongelados e xenotransplantados para camundongas NUDE; Controle fresco: os fragmentos foram fixados assim que chegaram ao laboratório.

## **6.5 MET**

### **6.5.1. Grupo CRIO+EPO (criopreservação do tecido ovariano, descongelamento e incubação em eritropoietina por 2h e transplante por 28 dias)**

No grupo CRIO+EPO, foi possível observar boa aderência entre o ovócito e a zona pelúcida, bem como núcleos morfologicamente normais e mitocôndrias arredondadas e relativamente próximas ao núcleo nas células da granulosa. Notou-se a presença de inúmeras vesículas ao longo do citoplasma das células da granulosa, e a presença de um depósito de lipídeo ligeiramente descolado do restante do citosol (Figura 17). Devido ao núcleo arredondado das células foliculares, os folículos observados provavelmente já haviam deixado o estágio primordial. O ovócito apresentou citoplasma homogêneo e pouco eletrondenso, com forte aderência das células da granulosa.

**Figura 17:** Microfotografia de folículos pré-antrais do grupo CRIO+EPO aos 28 dias pós-transplante

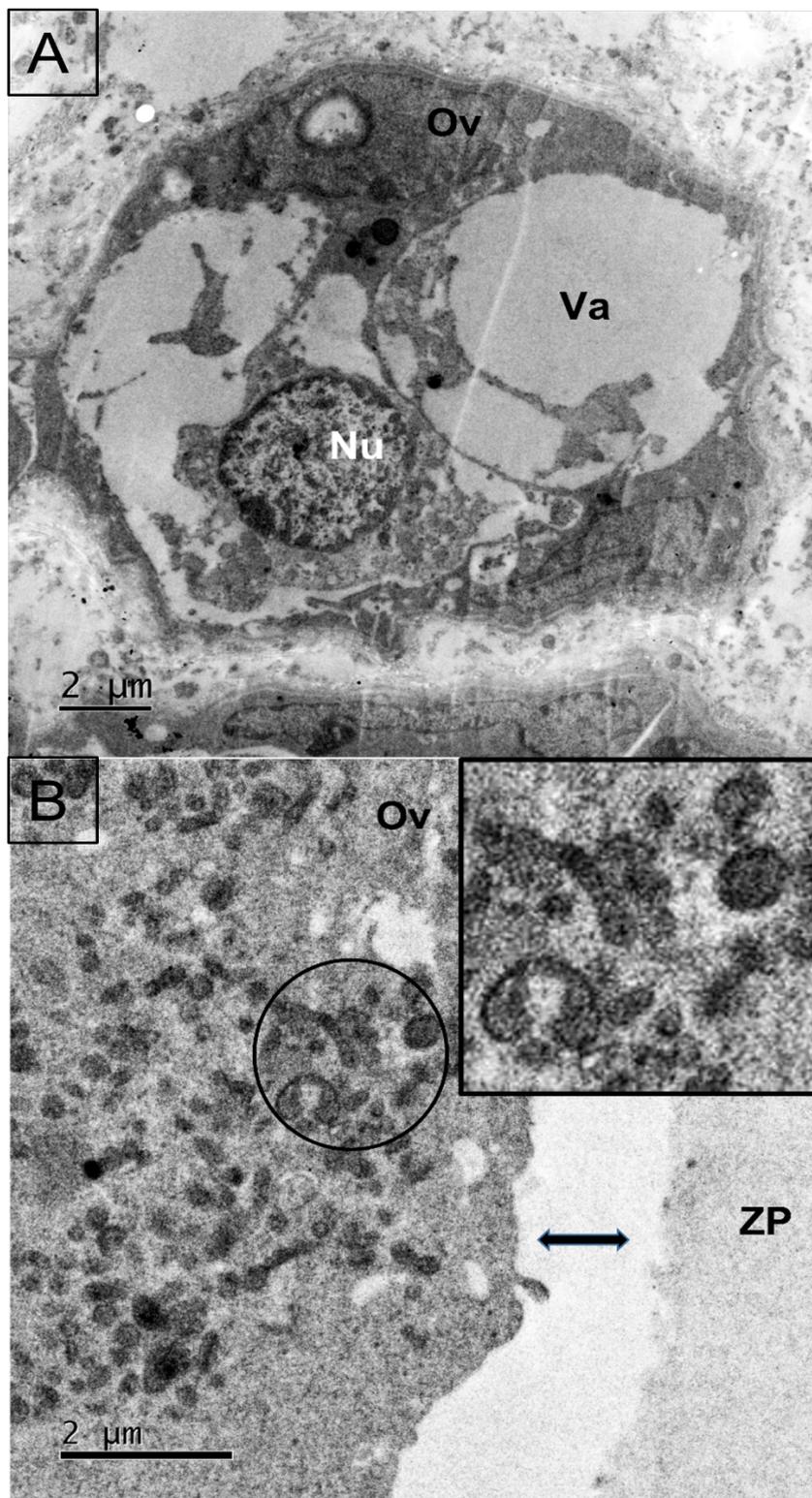


Grupo CRIO+EPO: os fragmentos ovarianos de gata foram criopreservados e após o descongelamento foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C e xenotransplantados para camundongas NUDE. Aumento de 800x. Barra: 2 um. A) Gr: camada de células da granulosa. Mi: mitocôndrias com morfologia normal. Li: depósito de lipídeo ligeiramente descolado do restante do citoplasma. Nu: Núcleos de células da granulosa arredondados, indicando célula cuboide. Setas pretas: vesículas claras amplamente distribuídas pelo citoplasma das células. B) Gr: camada de células da granulosa com forte adesão ao ovócito (Ov). Nu: núcleos de células da granulosa cuboide.

### **6.5.2. Grupo CRIO (criopreservação do tecido ovariano, descongelamento e transplante por 28 dias)**

Nas análises realizadas nos folículos antrais do grupo CRIO, foi possível observar um maior número de degenerações, o que inclui a formação de extensos vacúolos no citoplasma do ovócito, além de nítido descolamento entre o ovócito e a zona pelúcida. No entanto, foi possível observar núcleo morfológicamente normal contendo nucléolo e mitocôndrias arredondadas e alongadas com distribuição homogênea ao longo do citoplasma do ovócito, além de zona pelúcida bem desenvolvida, o que indica que o folículo provavelmente já havia atingido ao menos o estágio secundário de desenvolvimento (Figura 18).

**Figura 18.** Microscopia eletrônica de transmissão de folículos ovarianos do grupo CRIO aos 28 dias pós-transplante.

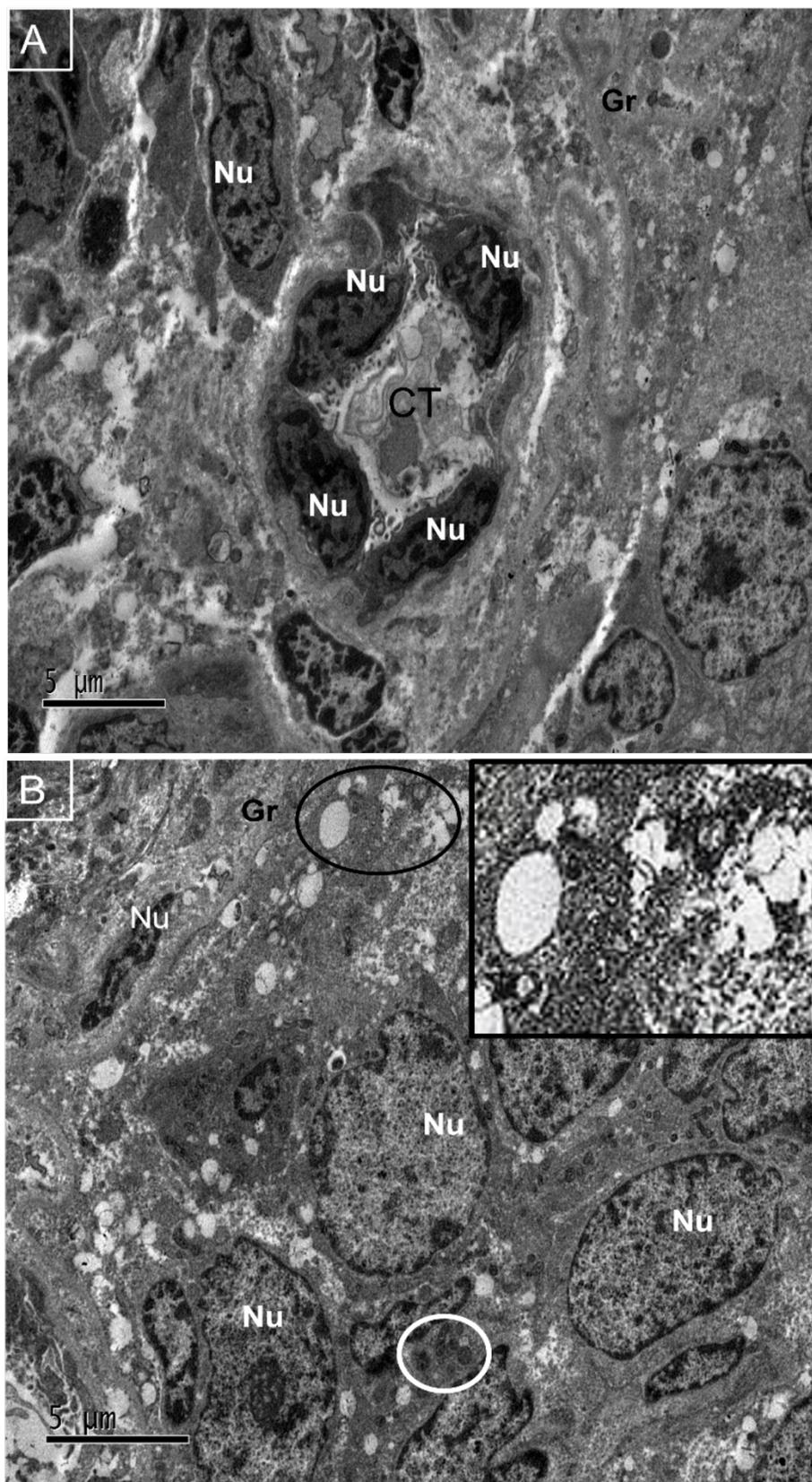


Grupo CRIO: os fragmentos ovarianos de gata foram somente criopreservados, e após o descongelamento, foram xenotransplantados para camundongas NUDE. Aumento de 800x. Barra: 2µm. A) Ovócito (Ov) com degenerações causadas pela presença de vacúolos (Ve) no citoplasma. Núcleo morfologicamente normal (Nu). B) Mitocôndrias arredondadas e alongadas (inset referente à região inserida no círculo preto) com distribuição homogênea ao longo do citoplasma do ovócito (Ov). É possível observar o descolamento (seta preta) entre o ovócito e a zona pelúcia (ZP).

### **6.5.3. Grupo EPO+CRIO (incubação do tecido ovariano em eritropoietina por 2h, criopreservação, descongelamento e transplante por 28 dias)**

No grupo EPO+CRIO foi possível observar a presença de células da granulosa com formato pavimentoso, citoplasma rico em mitocôndrias bem como vesículas de cor clara. O citoplasma das amostras não estava homogêneo, e foi possível observar núcleos com nucléolos e heterocromatina. As estruturas podem ser observadas na Figura 19.

**Figura 19.** Microscopia eletrônica de transmissão de folículos do grupo EPO+CRIO aos 28 dias pós-transplante.

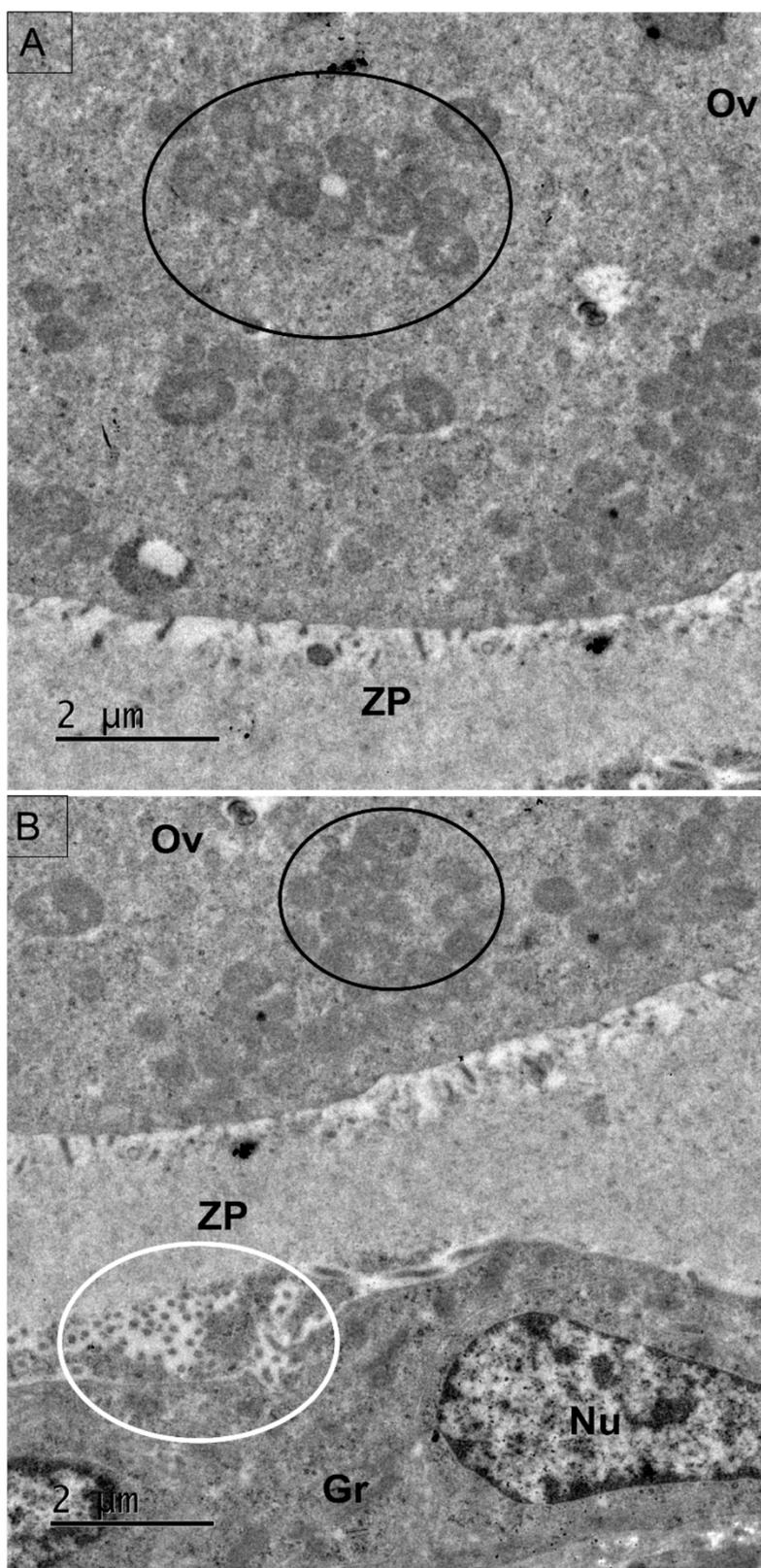


Grupo EPO+CRIO: os fragmentos ovarianos de gata foram incubados em MEM e 100 UI de EPO por duas horas em estufa umidificada à 37°C, criopreservados e descongelados, e depois xenotransplantados para camundongas NUDE. Aumento de 800x. Barra: 5µm. A) Camada da granulosa (Gr). Núcleos (Nu) pavimentosos e morfológicamente normais, indicando provavelmente folículo em estágio primordial de desenvolvimento. No centro das células da granulosa, é possível observar a região citoplasmática de um ovócito (CT). B) Núcleos (Nu) morfológicamente normais com formato arredondado e pavimentoso, indicando folículo em transição entre o estágio primordial e em crescimento, e mitocôndrias (círculo branco) com estrutura e distribuição normais. É possível notar a presença de um número elevado de vesículas (inset referente à região inserida no círculo preto) ao longo do estroma ovariano.

#### **6.5.4. Controle Fresco (tecido ovariano fixado por 24h)**

Na análise do controle fresco foram observadas estruturas intracelulares com estrutura íntegra e distribuição normal. O ovócito, a zona pelúcida e a camada de células da granulosa mostraram forte adesão entre si, e foi possível observar uma comunicação entre membranas, indicando provavelmente um processo de endocitose ou difusão. Devido à presença de zona pelúcida, entende-se que o folículo observado não se encontrava mais em estágio primordial, pois a zona pelúcida já pode ser evidente em gatos domésticos a partir do estágio primário de desenvolvimento. Além disso, foram vistas mitocôndrias arredondadas organizadas em grupos e predominantes na região periférica do citoplasma do ovócito, traço presente em folículos a partir do estágio secundário de desenvolvimento (Paulini et al., 2014). Não foram observadas degenerações nesta amostra (figura 20).

**Figura 20.** Microscopia eletrônica de transmissão de folículos do controle fresco (tecido ovariano fixado por 24 horas e não transplantado).



Controle fresco: os fragmentos chegaram no laboratório e foram imediatamente fixados em paraformaldeído por 24 horas e depois transferidos para álcool 70%. Aumento de 800x. Barra: 2um A) Ovócito (Ov) com citoplasma bem estruturado e mitocôndrias arredondadas distribuídas em grupos (círculo preto). Note a boa adesão entre o ovócito e a zona pelúcida (ZP), com a formação de micro vilos (seta). B) Ainda a visão do mesmo ovócito, mas com detalhe para processo de endocitose (círculo branco) entre a zona pelúcida (ZP) e células da granulosa (Gr). Também é possível observar um núcleo (Nu) morfológicamente normal de célula da granulosa.

## 7. Conclusão

O presente estudo é inédito no uso da incubação do tecido diretamente em EPO. Os resultados positivos na sobrevivência de folículos primordiais e em crescimento em ambos os grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO, bem como a presença de vasos sanguíneos nos grupos CRIO+EPO e EPO+CRIO aos 7 dias pós-transplante e o aumento da área média dos vasos no grupo EPO+CRIO aos 21 dias apontam para os efeitos benéficos da EPO em contato direto com o tecido. Além disso, foi possível observar a preservação de ultraestruturas nos fragmentos que foram incubados em EPO. Os protocolos apresentados (EPO antes e depois da CRIO) se revezaram em alguns dos resultados mostrados. Porém o grupo CRIO+EPO se sobressaiu, tendo em vista a preservação da morfologia de folículos primordiais e em crescimento observada somada à presença de vasos sanguíneos aos 7 dias pós-transplante. No entanto, investigações futuras são necessárias para a confirmação da eficácia dos protocolos apresentados na manutenção de tecido ovariano de gata criopreservado e xenotransplantado.

## 8. Referências

AMORIM, C. A. et al. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 3 SUPPL. 1, p. 682–686, 2003.

ANDREWS, C. J. et al. Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review. **Mammal Review**, v. 49, n. 1, p. 16–30, 2019.

AUBARD, Y. Ovarian tissue xenografting. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 108, n. 1, p. 14–18, 2003.

BAKKER, J.; BAUM, M. J. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 21, n. 3, p. 220–262, 2000.

BAYAZIT, V. Evaluation of Cortisol and Stress in Captive Animals. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1022–1031, 2009.

BELESLIN-COKIC, B. B. et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. **Blood**, v. 104, n. 7, p. 2073–2080, 2004.

BELESLIN-ČOKIĆ, B. B. et al. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 129–135, 2011.

BITTORF, T. et al. Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. **Cellular Signalling**, v. 12, n. 1, p. 23–30, 2000.

BOLS, P. E. J. et al. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. **Theriogenology**, v. 73, n. 6, p. 740–747, 2010.

BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 581–594, 2004.

BRIDGE, H. B. et al. Retards DNA Breakdown and Prevents Programmed Death in Erythroid Pnitor Cells. **Science**, v. 248, p. 378–381, 1990.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5–13, 2006.

BRITO, D. C. C. et al. Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. **Theriogenology**, v. 111, p. 69–77, 2018.

BROWN, J. L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 155–162, 2011.

BUNN, H. F. Erythropoietin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 3, 2013.

CAMPOS, L. B. et al. Advances and challenges of using ovarian preantral follicles to develop biobanks of wild mammals. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 4, p. 334–341, 2019.

CHEN, C. H. et al. Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after

frozen banking at -196°C. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4 SUPPL., p. 1059–1066, 2006.

CHONG, Z. Z.; KANG, J. Q.; MAIESE, K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of AKt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. **Circulation**, v. 106, n. 23, p. 2973–2979, 2002.

CLEARY, M. et al. Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an ischemic environment. **Cryobiology**, v. 42, n. 2, p. 121–133, 2001.

COMMIN, L. et al. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 3, p. 461–471, 2012.

CONDE, D. A. et al. An emerging role of zoos to conserve biodiversity. **Science**, v. 331, n. 6023, p. 1390–1391, 2011.

DA COSTA, M. M. et al. Investigation on revascularization time and initial damage after transplantation of fresh and cryopreserved ovarian tissue in domestic cats. **Cell and Tissue Banking**, v. 21, n. 2, p. 303–312, 2020.

DATH, C. et al. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: Comparison between four grafting sites. **Human Reproduction**, v. 25, n. 7, p. 1734–1743, 2010.

DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 6, p. 649–665, 2009.

DEMIRCI, B. et al. The cryopreservation of ovarian tissue: Uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 999–1010, 2003.

DING, Y. et al. Effects of Lipoic Acid on Ischemia-Reperfusion Injury. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 70, p. 63–80, 2021.

DONFACK, N. J. et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 391–403, 2017.

FASSBENDER, M. et al. High-resolution ultrasonography of xenografted domestic cat ovarian cortex. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 5, p. 1023–1034, 2007.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, n. 1, p. 3–15, 2011.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction 3rd Edition**, 2004. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/canine-and-feline-endocrinology-and-reprod/feldman/978-0-7216-9315-6>>

FORTUNE, J. E. I. v. 232, p. 225–232, 1994.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. v. 83, p. 109–126, 2004.

GORRICHIO, C. M. et al. Vitrification of cat ovarian tissue: Does fragment size matters? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. September, p. 125–132, 2018.

GOSDEN RG, BAIRD DT, WADE JC, W. R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. v. 9, n. 4, p. 597–603, 1994.

GRIFFIN, B. Prolific Cats: The Estrous Cycle. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 23, n. 12, p. 1049–1056, 2001.

GUNASENA, K. T. et al. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 2, p. 226–231, 1997.

GUNASENA, K. T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 265–275, 1998.

HENRY, L. et al. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2015.

HOU, J. et al. Erythropoietin Employs Cell Longevity Pathways of SIRT1 to Foster Endothelial Vascular Integrity During Oxidant Stress. **Current Neurovascular Research**, v. 8, n. 3, p. 220–235, 2011.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 2005.

HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Approaches and efficacy of artificial insemination in

felids and mustelids. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 130–148, 2009.

INGEC, M. et al. Prevention of ischemia-reperfusion injury in rat ovarian tissue with the on-off method. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 575–582, 2011.

JEWGENOW, K. et al. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 1, p. 39–47, 1998.

KAGAWA, N. et al. Growth and maturation of follicles and oocytes following xenotransplantation of porcine ovarian tissues and in vitro maturation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 6, p. 741–748, 2005.

KARACA, M. et al. Protective effects of erythropoietin on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, n. 2, p. 157–162, 2009.

KIM, J. S.; QIAN, T.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 494–503, 2003.

KIM, S. S. Revisiting the role of heterotopic ovarian transplantation: Futility or fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 2, p. 141–145, 2014.

KOLUSARI, A.; OKYAY, A. G.; KOÇKAYA, E. A. The Effect of Erythropoietin in Preventing Ischemia–Reperfusion Injury in Ovarian Tissue Transplantation. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 3, p. 406–413, 2018.

KOSHIMURA, K. et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 6, p. 2565–2572, 1999.

LEONEL, E. C. R. et al. Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 83, n. July, p. 9–14, 2018.

MAHMOODI, M. et al. Effects of erythropoietin on ischemia, follicular survival, and ovarian function in ovarian grafts. **Reproduction**, v. 147, n. 5, p. 733–741, 2014.

MASTROMONACO, G. F.; SONGSASEN, N. **Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species**. [s.l.] INC, 2020. v. 2

MAZUR, P. Kinetics of Water Loss From Cells At Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. **The Journal of general physiology**, v. 47, n. December 1963, p. 347–369, 1963.

MCGOWAN, P. J. K.; TRAYLOR-HOLZER, K.; LEUS, K. IUCN Guidelines for Determining When and How Ex Situ Management Should Be Used in Species Conservation. **Conservation Letters**, v. 10, n. 3, p. 361–366, 2017.

MICHAEL, B. R. P.; SCOTT, P. P. Fromt the Department of Psychiatry, Institute of Psychiatry , Maudsley. p. 254–274, 1964.

MOREIRA, N. Reprodução e estresse em felídeos silvestres. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 31, n. 3, p. 333–338, 2007.

NAKANO, M. S. et al. Live birth rate after ovarian tissue cryopreservation followed by autotransplantation in cancer patients : a systematic review. v. 1, n. 2, p. 89–94, 2020.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 109–124, 1991.

NOTTOLA, S. A. et al. Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation with ethylene glycol. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, n. 3, p. 368–377, 2008.

OGILVIE, M. et al. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39754–39761, 2000.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 2, p. 354–361, 2011.

PERDRIX, A. et al. Ovarian tissue thawing: A comparison of two conditions. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 307–310, 2010.

PIMENTEL, M. M. L. et al. Ovarian tissue xenografting in animals: Limitations, techniques and innovations. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 3, 2015.

PRASS, K. et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. **Stroke**, v. 34, n. 8, p. 1981–1986, 2003.

RICHARDS, J. A. S. et al. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 47–54, 1998.

RICHARDS, J. A. S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 195–220, 2002.

RIPPLE, W. J. et al. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. **Science**, v. 343, n. 6167, 2014.

RODRIGUES, A. P. R. et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research**, v. 56, n. 1–3, p. 103–111, 2005.

RUSCHITZKA, F. T. et al. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 21, p. 11609–11613, 2000.

SALLE, B. et al. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 2, p. 403–408, 2002.

SALLE, B. et al. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: Pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 1, p. 172–177, 2003.

SANDOM, C. J. et al. Deconstructed cat communities: Quantifying the threat to felids from prey defaunation. **Diversity and Distributions**, v. 23, n. 6, p. 667–679, 2017.

SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3–4, p. 151–163, 2010.

SCHMIDT, A. M. et al. Serum concentrations of oestradiol and progesterone during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the lion (*Panthera leo*). **Journal of reproduction and fertility**, v. 57, n. 2, p. 267–272, 1979.

SCHMIDT, A. M. et al. sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the leopard (*Panthera pardus*). 1985.

STOREY, B. T.; NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A. Comparison of Glycerol, Other Polyols, Trehalose, and Raffinose to Provide a Defined Cryoprotectant Medium for Mouse Sperm Cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 46–58, 1998.

SUZUKI, H. et al. Beneficial effect of desialylated erythropoietin administration on the frozen-thawed canine ovarian xenotransplantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 25, n. 11–12, p. 571–575, 2008.

TAFTI, D. et al. Vitrified Xenograft Survived Human Ovarian Follicles Using Erythropoietin. **Journal of Gynecology and Obstetrics Forecast**, v. 1, n. 1, p. 1–3,

2018.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, v. 26, n. 8, p. 563–567, 2010.

TENG, R. et al. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 3, p. 343–354, 2011.

VILLA, P. et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 6, p. 971–975, 2003.

VOLLMAR, B. et al. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. **Surgery**, v. 117, n. 2, p. 195–200, 1995.

VON WOLFF, M. et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy - A technique in its infancy but already successful in fertility preservation. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 9, p. 1547–1553, 2009.

WANG, Y. et al. Effects of HMG on revascularization and follicular survival in heterotopic autotransplants of mouse ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 6, p. 646–653, 2012.

WEN, T. C. et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. **Journal of Neuroscience Research**, v. 67, n. 6, p. 795–803, 2002.

WIEDEMANN, C. et al. Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 300–304, 2012.

YASUDA, Y. et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 39, p. 25381–25387, 1998.

YILMAZ, S. et al. The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. **Hpb**, v. 6, n. 3, p. 169–173, 2004.

ZELINSKI, M. B. et al. In vivo delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, p. 1440- 1445.e7, 2011.