



Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha

Xenotransplantation in immunosuppressed mice collected from total unilateral laparoscopic ovariectomy in sheep

F.F.P.C. Barros¹, P.P.M. Teixeira^{1,3,4}, M.A.M. Silva¹, A.S.L. Silva¹, R.M. Medeiros¹, C.M.M. Coelho¹, M.B. Bandarra¹, M.F. Macedo², M.B. Bezerra², W.R.R. Vicente¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, (FCAV/Unesp), Jaboticabal, SP, Brasil.

²Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (Ufersa), Mossoró, RN, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), *Campus* Cedeteg, Guarapuava, PR, Brasil.

⁴Correspondência: p_paulomt@yahoo.com.br

Resumo

Objetivou-se neste estudo descrever a técnica de xenotransplante gonadal em camundongos imunossuprimidos por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica (OVL) em ovelhas. Foram utilizadas quatro ovelhas como doadoras do tecido reprodutivo e camundongos em fase reprodutiva (n = 12) como receptores. As coletas foram realizadas por videocirurgia, e foram avaliados o tempo de cirurgia, as respostas comportamentais antiálgicas, o apetite, o escore corporal e a locomoção durante 10 dias pós-operatórios. Os xenotransplantes foram realizados na cápsula renal dos camundongos, sendo avaliados histologicamente 60 dias após o transplante. O tempo de cirurgia foi de 18 ± 3 min. A técnica OVL apresentou-se minimamente invasiva, sem complicações cirúrgicas, proporcionando mínimo desconforto e ótima recuperação dos animais, e pode ser empregada em ovelhas adultas e pré-púberes para coleta de tecidos reprodutivos para conservação de gametas. Para histologia dos tecidos xenotransplantados, verificou-se viabilidade tecidual, com neovascularização e ausência de focos necróticos, porém não se visualizaram folículos nas diferentes fases. Concluiu-se que a OVL pode ser a técnica empregada em ovelhas pré-púberes e adultas para recuperação de tecido reprodutivo para xenotransplante. Para o xenotransplante, sugere-se que os fragmentos ovarianos selecionados contenham um número suficiente de folículos primordiais para o possível sucesso da biotécnica.

Palavras-chave: conservação de gametas, ovinos, videocirurgia, xenotransplante.

Abstract

The aim of this study was to describe the technique of gonadal xenotransplantation in immunosuppressed mice from total unilateral laparoscopic ovariectomy (OVL) in sheep. Four sheep were used as donors of reproductive tissue in mice in the reproductive phase (n = 12) as receivers. Samples were collected by laparoscopic surgery, evaluating the time of surgery, observation of behavioral anti-painful responses, monitoring appetite, body condition score and locomotion for 10 days postoperatively. The xenografts were performed in the renal capsule of mice, as evaluated histologically 60 days after transplantation. The operation time was 18 ± 3 min, the technique presented OVL minimally invasive surgical complications without providing minimum discomfort and optimum recovery of the animals and can be used in adult and prepubertal sheep for collecting reproductive tissues for the conservation of gametes. Histology tissue xenotransplanted was a viable tissue, with neovascularization and absence of necrotic foci, but follicles at different stages were not visualized. It was concluded that the OVL technique can be employed in sheep and adult prepubertal for recovering reproductive tissue for xenotransplantation. For xenotransplantation, it is suggested that the ovarian fragments selected contain a sufficient number of primordial follicles for the possible success of biotech.

Keywords: conservation of gametes, laparoscopic, sheep, xenotransplantation.

Introdução

A vídeolaparoscopia é uma técnica cirúrgica minimamente invasiva (Bouré, 2005), a qual apresenta como vantagem pequenas incisões e ausência de exposição de vísceras. Isso reduz o tempo de recuperação e as intercorrências e, assim, favorece o uso em animais de produção por diminuir o custo do procedimento e a necessidade de observação e de cuidados com os animais. Comum em pequenos ruminantes, essa técnica pode ser realizada sucessivas vezes, se necessário (Teixeira et al., 2011b).



A técnica de xenotransplante de um tecido envolve a coleta de tecido de um doador de uma determinada espécie e a inserção desse tecido em um receptor de uma espécie diferente (Aubard, 2003). Quando realizada em tecidos reprodutivos, estima-se que ela possa contribuir para a manutenção do potencial reprodutivo do animal doador e servir de ferramenta para a preservação de espécies ameaçadas de extinção (Kikuchi et al., 2011).

Apesar de diversos trabalhos anteriores, Kaneko et al. (2003) foram os pesquisadores que conseguiram demonstrar a capacidade de fertilização de oócitos oriundos de folículos primordiais. De acordo com Kikuchi et al. (2011), o transplante de ovário é uma ferramenta que favorece o crescimento e a maturação desses oócitos em várias espécies.

Deste modo, os objetivos do presente estudo foram descrever a técnica de xenotransplante de tecidos ovarianos de ovelhas pré-púberes e adultas, coletados por meio de ovariectomia total videolaparoscópica, em camundongos imunossuprimidos, e avaliar tanto a viabilidade da técnica de coleta dos ovários quanto à viabilidade dos tecidos enxertados.

Material e Métodos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da FCAV/Unesp, protocolo n. 027419/11. Como doadoras, foram utilizadas quatro ovelhas da raça Santa Inês, sendo duas adultas, com aproximadamente dois anos, e duas pré-púberes, com idade aproximada de quatro meses. As receptoras utilizadas (n = 12) foram camundongos pertencentes às linhagens CB 17 e Balb C *nude*, fêmeas, previamente ovariectomizadas, em fase reprodutiva.

Antes do procedimento, as doadoras foram submetidas a jejum alimentar e hídrico de 36 h e imediatamente pesadas. Estas foram canuladas com cateter intravenoso 16G na veia jugular, pré-anestesiadas com 2,0 mg/kg de tramadol (IM) e induzidas com 6 mg/kg de propofol via intravenosa (IV), entubadas com sonda orotraqueal n. 6.0 e mantidas sob anestesia geral com 0,5 mg/kg/min de propofol via bomba de infusão contínua. No local das incisões, administrou-se 1,0 mL de cloridrato de lidocaína.

As ovelhas foram posicionadas em decúbito dorsal, com posterior inclinação em 45° (*Trendelenburg*). Com o auxílio de um bisturi, fez-se uma pequena incisão cutânea, 5 a 10 cm cranial ao úbere e 5 cm à direita da linha média, para facilitar a introdução às cegas do primeiro trocar de 5 mm com válvulas para insuflação, e estabelecer o pneumoperitônio com CO₂, utilizando-se pressão intrabdominal (PIA) de 5 mmHg e velocidade de insuflação de 5 L/min. Por este trocar, foi introduzido o laparoscópio para a colocação videoassistida dos demais trocarts. O segundo trocar, de 5 mm, foi posicionado de maneira antimerica ao primeiro. Já o terceiro trocar, também de 5 mm, foi colocado na linha média, 15 cm cranial ao úbere.

Ato contínuo, o endoscópio foi transferido para o terceiro trocar obtendo-se campo visual. Sequencialmente, introduziram-se, pelo primeiro e segundo trocarts, as pinças atraumáticas (Babcock), que permitiram a manipulação do útero, das tubas e das bursas ováricas e a individualização dos ovários, que eram fixados, com esses instrumentos, pelo mesovário, evitando-se sempre lesar qualquer estrutura.

Com uma das pinças se apreendeu e se posicionou o ovário, facilitando a visualização do pedículo ovariano, e, pelo segundo canal, introduziu-se uma pinça coaguladora bipolar (Lina PowerBlade - WEM Ribeirão Preto, SP), realizando-se exérese intrabdominal e retirando-se o ovário por um dos portais laparoscópicos (Fig. 1). O corte e a coagulação foram realizados de modo a possibilitar uma margem para evitar qualquer tipo de lesão na gônada.

Por fim, as dermorráfias foram realizadas com pontos tipo Wolf, sem necessidade de sutura da camada muscular e de redução de espaço subcutâneo. Ato contínuo, procedeu-se à limpeza da ferida cirúrgica com polivinilpirrolidona-iodo e utilização de pomada repelente/cicatrizante ao redor da ferida cirúrgica. Após os procedimentos, as doadoras receberam oxitetraciclina LA, na dose de 20 mg/kg de peso vivo.

No transcirúrgico, foi cronometrado o tempo de cirurgia para cada técnica, bem como possíveis transtornos que dificultassem o procedimento. Após o transcirúrgico, as ovelhas foram avaliadas nas primeiras seis horas em relação a alterações comportamentais sugestivas de dor, tomando-se por base comportamentos algícos característicos, como curvatura do dorso, deslocamento com dificuldade e diminuição do apetite (Teixeira et al., 2011a).

Após as ovariectomias, os ovários foram colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e imediatamente encaminhados para o laboratório, onde foram seccionados, obtendo-se fragmentos corticais de aproximadamente 1 mm³, conforme técnica já descrita em experimentos (Gosden et al., 1994; Paris e Schlatt, 2007), tomando-se sempre a precaução de não se obterem, junto com esses fragmentos, folículos antrais visíveis. Os fragmentos retirados ficaram imersos novamente em PBS estéril até o momento do enxerto.

Após tricotomia bilateral da região sublombar e demais preparos assépticos, os animais receptores do transplante foram submetidos à ovariectomia bilateral por incisão sublombar direita e esquerda de aproximadamente 1 cm, sempre caudal à última costela.

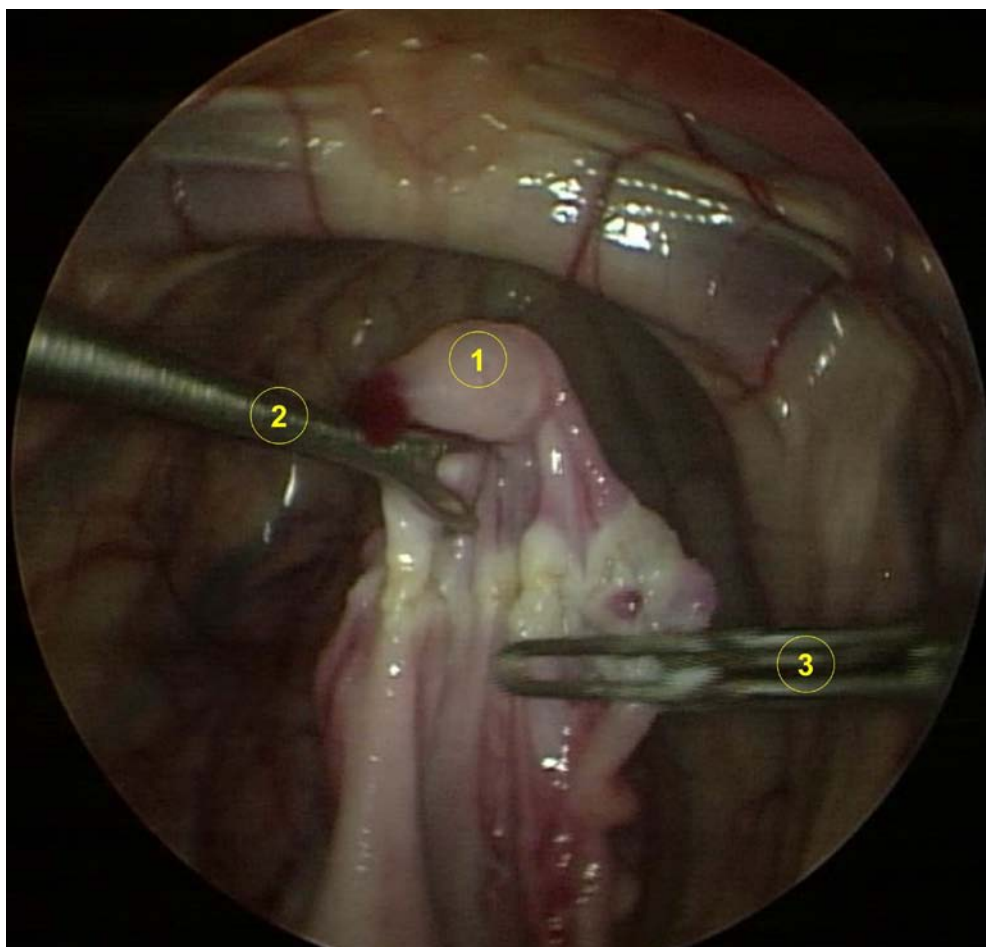


Figura 1. Imagem videolaparoscópica da porção interna da região abdominal inguinal de um ovino, demonstrando apreensão do ovário (1) pela pinça atraumática (2), corte e coagulação com a pinça bipolar (3) para retirada do ovário.

Por ser o rim direito um órgão anatomicamente mais caudal que o seu contralateral e, portanto, de acesso mais facilitado, este foi escolhido para ser submetido ao procedimento de enxertia. Para tanto, após a ovariectomia direita, o rim direito foi isolado, sendo apoiado de forma cuidadosa entre os dedos polegar e indicador, quando se procedeu a uma pequena secção em sua cápsula com auxílio de pinça denteadas. Apreenderam-se os fragmentos previamente selecionados, aproximadamente cinco fragmentos, os quais foram inseridos cuidadosamente através da secção realizada; feito isso, estes foram posicionados nos locais desejados.

Ao final, o rim foi devolvido à sua posição anatômica de origem, e, em seguida, realizou-se a síntese com sutura em “X” da camada muscular com fio absorvível (Catgut 5-0 agulhado) e com sutura de Wolff da camada dérmica utilizando-se fio inabsorvível (monofilamento náilon 5-0 agulhado). Após os procedimentos realizados do lado direito, a receptora foi posicionada em decúbito direito para a realização da ovariectomia esquerda. Ao ser retirado o ovário, os protocolos de hemostasia e síntese foram realizados como já descrito anteriormente.

Após 60 dias, os animais receptores foram submetidos ao procedimento de eutanásia, utilizando-se sobredose de barbitúrico (Tiopental sódico, 150 mg/kg, via intraperitoneal), para a retirada dos rins contendo os tecidos transplantados (Fig. 2). Esses órgãos foram submetidos ao preparo histológico, fixados em Bouin, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para cortes micrométricos de 7 μ m de espessura. Um corte a cada 70 μ m foi selecionado e montado em lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM), conforme Behmer et al. (1976).



Figura 2. Rim direito de um camundongo CB17 fêmea castrada, retirado 60 dias após transplante de tecido ovariano. Os fragmentos podem ser observados sob a cápsula renal (setas amarelas).

Resultados

Em relação ao procedimento anestésico das doadoras, este demonstrou ser adequado, uma vez que nenhum animal doador apresentou intercorrências cardiopulmonares, mesmo quando submetidos à posição de *Trendelenburg*.

Apesar do jejum prolongado, um animal apresentou regurgitação moderada do conteúdo ruminal, intercorrência sem maiores preocupações, devido ao fato de as ovelhas doadoras estarem entubadas. A analgesia local com lidocaína também demonstrou ser efetiva, pois não foi observado nenhum movimento ou alteração cardiopulmonar no ato da instituição dos portais de trabalho.

Os procedimentos cirúrgicos duraram, em média, 18 ± 3 min, não havendo diferença significativa entre os animais adultos e pré-púberes ($p > 0,05$). A PIA de 5 mmHg, associada com o posicionamento em *Trendelenburg*, foi considerada suficiente para afastar as vísceras da parede abdominal, permitindo ao operador a visualização apropriada da cavidade abdominal e de seus órgãos. Também não ocorreram dificuldades para a observação e a manipulação do útero e dos ovários, uma vez que os animais pré-púberes apresentam um menor tamanho dos órgãos reprodutivos em relação aos adultos.

A recuperação das doadoras foi rápida e sem intercorrências, nenhuma apresentou sinais de dor ou desconforto abdominal ao ficar em estação e nas primeiras seis horas pós-operatórias. O apetite foi normal e o escore corporal se manteve nos dias de observação.

Apesar do comportamento característico dos ovinos de permanecerem deitados com o abdômen encostado ao solo e de ter havido apenas uma administração de antibiótico, nenhum animal apresentou infecção na ferida cirúrgica, com os pontos retirados com 10 dias. Este resultado é atribuído à antisepsia da técnica e à menor incisão e manipulação da cavidade abdominal, o que comprovou ser uma grande vantagem da técnica, a qual pode, em grandes rebanhos, diluir os custos com a aquisição do equipamento.

Na avaliação histológica, os tecidos apresentaram-se vascularizados (presença de microvasos) e sem áreas de rejeição em nenhuma das seções, mostrando boa viabilidade da técnica (Fig. 3). Porém, não apresentaram folículos ovarianos e nenhuma fase. Microscopicamente, na aderência do tecido ovariano ao tecido renal, notou-se a presença de pequeno infiltrado de células inflamatórias, bem como de células polimorfonucleares e mononucleares.

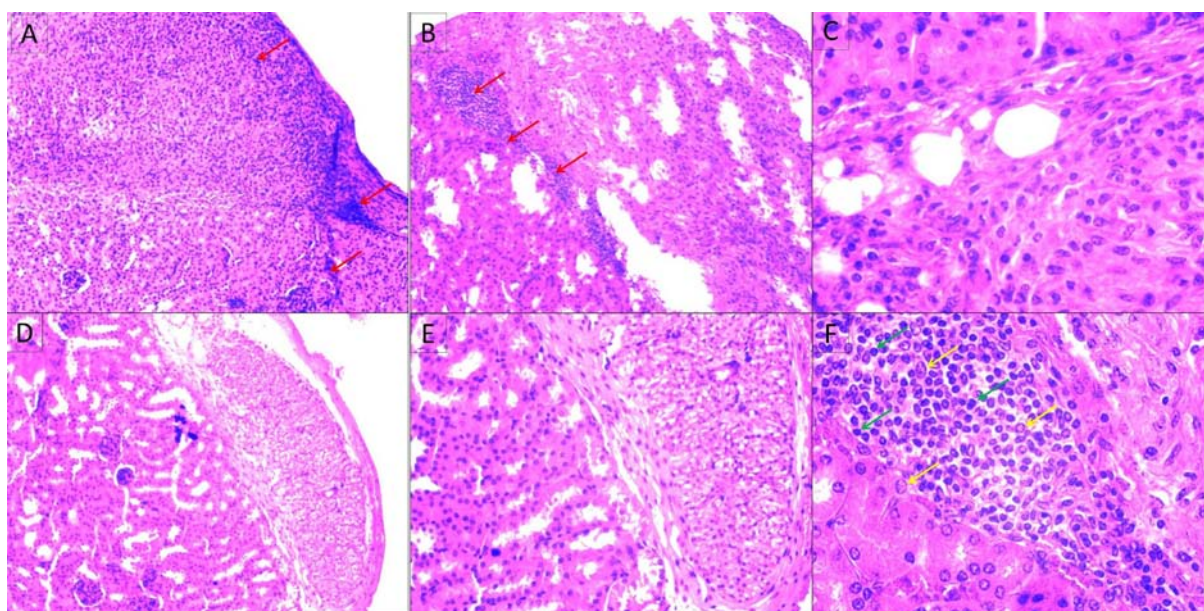


Figura 3. Fotomicrografias de rim de rato com tecido ovariano de ovelhas transplantado, ilustrando xenotransplante em ovelhas adultas (A, B e C) e pré-púberes (D, E e F) transplantado durante 60 dias sob a cápsula renal de camundongos fêmeas imunodeficientes. Observa-se, nas figuras A e B, um fragmento ovariano de ovelha adulta aderido ao tecido renal, com a presença de pequeno infiltrado de células inflamatórias (setas vermelhas) em um aumento de 10x. A figura C mostra a área de transição entre os dois tecidos (40x). Observa-se, nas figuras D e E, um fragmento ovariano de ovelha pré-púbere aderido ao tecido renal sem infiltrado de células inflamatórias, demonstrando microvascularização no tecido ovariano (asterisco vermelho), em um aumento de 10x. Já na figura F, observa-se, na área de transição entre os tecidos, a presença tanto de células polimorfonucleares (seta amarela) quanto de mononucleares (seta verde), em um aumento de 40x. Não se observaram áreas de rejeição do tecido transplantado em nenhuma das secções.

Discussão

A habilidade de usar ovários frescos ou congelados, tecidos ovarianos, folículos ou oócitos em biotécnicas reprodutivas é de extrema importância, já que permite o uso desse material pertencente à linha germinativa da fêmea, esteja ela viva ou morta, por um tempo indeterminado (Jewgnow e Paris, 2006). O tempo cirúrgico médio nas coletas videolaparoscópicas dos ovários foi inferior ao descrito para ovariectomias videolaparoscópicas em vacas (120 - 150 min; Bouré, 2005); ovariectomias videoassistidas em ovelhas adultas (37.5 ± 13.04 min.); ovariectomia total videolaparoscópica em ovelhas adultas (27.5 ± 2.89 ; Teixeira et al., 2011a); biópsias hepáticas videoassistidas em carneiros (23 min; Duarte et al., 2009); e aspirações foliculares em cabras (35 min; Cordeiro, 2006).

Ovariectomias em ovelhas adultas utilizando a técnica de laparotomia pela linha média geralmente apresentam dificuldade em se localizarem os ovários entre as porções do trato gastrointestinal (Teixeira et al., 2011a), o que não ocorre em procedimentos videolaparoscópicos, pelo bom posicionamento da câmera e pelo pneumoperitônio, mesmo sendo inferior ao volume descrito em outros estudos de videolaparoscopia (Tabet et al., 2005; Cordeiro, 2006; Duarte et al., 2009).

Em estudos de Nugent et al. (1998), pôde-se observar que os fragmentos recebem um aporte de oxigênio e nutricional, mesmo antes que ocorra neovascularização, a qual, em camundongos, acontece por volta do terceiro dia após o transplante. Como observado no presente estudo e de acordo com Baird et al. (1999), a ausência de necrose isquêmica generalizada é a grande vantagem do transplante de fragmentos da região cortical do ovário, sendo um aspecto positivo em relação ao transplante do ovário inteiro ou de pedaços maiores.

Mesmo os tecidos tendo mostrado integridade, não apresentaram folículos ovarianos e nenhuma fase, apesar de os fragmentos selecionados estarem de acordo com a literatura, ou seja, retirados do córtex ovariano, com aproximadamente 1 mm^3 e sem folículos antrais (Gosden et al., 1994; Paris e Schlatt, 2007). Especula-se que os tecidos xenotransplantados possivelmente não apresentassem folículos primordiais, e, mesmo que os enxertos tenham-se apresentado viáveis, não houve foliculogênese.

Já se realizaram alguns trabalhos com xenotransplante de tecido ovariano em primatas (Von Schönfeldt et al., 2011), elefantes (Gunaseena et al., 1998), gatas (Gosden et al., 1994), wombats (Wolvekamp et al., 2001), cadelas (Metcalf et al., 2001), vacas (Hernandez-Fonseca et al., 2005), porcas (Kikuchi et al., 2011), ovelhas (Gosden et al., 1994) e em seres humanos (Dath et al., 2010). Todavia, a maioria das pesquisas foi realizada com



ovários provenientes de abatedouros, e recuperação desse tecido de animais *in vivo*, é uma informação importante, uma vez que possibilita trabalhar com pacientes que tiveram problemas reprodutivos adquiridos ou incapazes de serem submetidos à reprodução convencional ou por biotécnicas tradicionais, assim verificando que a coleta, principalmente de maneira minimamente invasiva, apresenta-se de forma significativa para o processo.

Nesta pesquisa, a OVL apresentou-se de grande valia por ser um processo minimamente invasivo, sem complicações cirúrgicas, proporcionando mínimo desconforto e ótima recuperação do animal, podendo ser empregada em ovelhas pré-púberes e adultas para recuperação de tecido reprodutivo para xenotransplante. Porém, deve-se ter certeza de que os fragmentos ovarianos selecionados contenham um número suficiente de folículos primordiais para o possível sucesso da biotécnica.

Referências

- Aubard Y.** Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol*, v.108, p.14-18, 2003.
- Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG.** Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196°C. *Endocrinology*, v.140, p.462-471, 1999.
- Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas Neto AG.** Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart, 1976. 256p.
- Bouré L.** General principles of laparoscopy. *Vet Clin North Am Food Anim*, v.21, p.227-249, 2005.
- Cordeiro MF.** Laparoscopic assessment of ovum pick-up in prepubertal and adult ewes, with or without ovarian hormonal stimulation. 2006. 59f. Dissertation (PhD Fellowship of Veterinary Medicine) - School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, 2006.
- Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J, Van Langendonck A.** Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum Reprod*, v.25, p.1734-1743, 2010.
- Duarte ALL, Cattelan JW, Bezerra MB, Vicente WRR, Cordeiro MF.** Biópsia hepática com agulha tru-cut guiada por videolaparoscopia em caprinos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.12-19, 2009.
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R.** Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil*, v.101 p.619-623, 1994.
- Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, Mcgann LE, Critser JK.** Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.265-275, 1998.
- Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Brackett BG.** Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. *Fertil Steril*, v.83, p.1180-1187, 2005.
- Jewgnow K, Paris MCJ.** Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology*, v.66, p.93-100, 2006.
- Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, Akita T.** Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. *Biol Reprod*, n.69, p.1488-1493, 2003.
- Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N, Kaneko H.** Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. *Anim Sci J*, v.82, p.495-503, 2011.
- Metcalfe SS, Shaw JM, Gunn IM.** Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Fertil*, v.57, p.323-329, 2001.
- Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG.** Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Fertil*, v.114, p.341-346, 1998.
- Paris MCJ, Schlatt S.** Ovarian and testicular tissue xenografting: its potential for germline preservation of companion animals, non-domestic and endangered species. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.771-782, 2007.
- Tabet AF, Silva LC, Shinhorini IL.** Comparação entre duas técnicas de biópsia renal guiadas por laparoscopia em equinos. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.42, p.150-156, 2005.
- Teixeira PPM, Padilha LC, Motheo TF, Silva MAM, Oliveira MEF, Da Silva ASL, Barrosa FFPC, Coutinho LN, Flôres FN, Lopes MCS, Rodrigues LFS, Vicente WRR.** Ovariectomy by laparotomy, a video-assisted approach or a complete laparoscopic technique in Santa Ines sheep. *Small Rumin Res*, v.99, p.199-202, 2011a.
- Teixeira PPM, Padilha LC, Oliveira MEF, Motheo TF, Da Silva ASL, Barrosa FFPC, Coutinho LN, Flôres FN, Lopes MCS, Bandarra MB, Silva MAM, Vasconcelos RO, Rodrigues LFS, Vicente WRR.** Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Anim Reprod Sci*, v.127, p.169-175, 2011b.
- Von Schönfeldt V, Chandolia R, Kiesel L, Nieschlag E, Schlatt S, Sonntag B.** Advanced follicle development in xenografted prepubertal ovarian tissue: the common marmoset as a nonhuman primate model for ovarian tissue transplantation. *Fertil Steril*, v.95, p.1428-1434, 2011.
- Wolvekamp MC, Cleary ML, Cox SL, Shaw JM, Jenkin G, Trounson AO.** Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.135-147, 2001.