UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA DA VIABILIDADE DO AUTO-ENXERTO DE TECIDO OVARIANO NA REGIÃO SUBCAPSULAR DO RIM DE RATAS

Michelly Fernandes de Macedo

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária – Área de concentração (Cirurgia Veterinária).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Agosto de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MICHELLY FERNANDES DE MACEDO – filha de Osvaldo Pinheiro de Macedo e Vanderluce Fernandes de Macedo, nascida em 04 de abril de 1982, na cidade de Natal, RN, é Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA (antiga Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM), em julho de 2005. Durante a graduação, foi monitora da disciplina de Fisiologia Veterinária, e aluna do programa PIBIC/CNPq/ESAM, cada uma das atividades com duração de dois anos. Em agosto de 2006, ingressou no Programa de Pós-graduação, ao nível de Mestrado em Cirurgia Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

(Louis Pasteur)

Dedico,

Aos meus pais e família,
pelo exemplo de vida que todos são para mim,
e por me ajudarem a ser quem fui, sou hoje e serei em vidas futuras.

Ao meu noivo, Marcelo Bezerra,
Meu companheiro amoroso, leal e ubíquo,
Obrigada por ser o promotor de minha melhoria diária.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pai celestial, ser cheio de amor, compreensão e bondade, que me iluminou junto aos meus protetores por mais esta caminhada que está sendo concluída com vitórias e alegria. Dedico-te minha eterna gratidão e fé. Obrigada pela sabedoria dada nas horas mais difíceis que me fizeram crescer e enxergar a verdadeira relevância de todas as coisas, e por ter me feito chegar tão longe.

O mérito dessa vitória está nos momentos e nas pessoas que tive de renunciar para ser digna de possuí-la hoje. Foi muito difícil ter que renunciar às suas presenças quando saí andando pela vida em busca de um sonho: ser alguém e deixá-los orgulhosos. Então, por este mérito e por justiça, divido esta vitória com as pessoas que a merecem de fato: MINHA FAMÍLIA.

Aos meus pais, **Osvaldo Pinheiro de Macedo e Vanderluce Fernandes de Macedo**, por terem dado a oportunidade da reencarnação, concebido, educado e amado de forma tão brilhante. Concluímos juntos mais uma pequena etapa desta vida, e sei que sem suas presenças e orientação, nunca teria dado sequer o primeiro passo para que esta caminhada estivesse sendo seguida e aos poucos concretizada. Hoje sei que todos nós somos vitoriosos. Obrigada pela compreensão, apoio, resignação e abdicação para que as oportunidades da vida fossem dadas a mim e ao meu irmão. O meu ETERNO MUITO OBRIGADO, por terem sido as primeiras pessoas a acreditarem em mim, na minha capacidade pessoal e profissional e por fazerem de mim uma pessoa de princípios.

Ao ser pacífico e doce que é meu irmão, **Osvaldo Pinheiro de Macedo Júnior**, obrigada por ser tão protetor, zeloso e fraterno comigo. Àquela sempre linda, feliz, radiante, companheira e dedicada, **Ana Cristina Araújo Rodrigues**, minha cunhada e comadre, agradeço pela cumplicidade, amizade e amor que dedicas a mim e à nossa família; e principalmente, por ter proporcionado, junto com meu irmão, a vinda a este mundo daquele com olhar cativante e sorriso largo no rosto, **Caio Jonathan Rodrigues de Macedo**, meu sobrinho e afilhado; meus sinceros agradecimentos pela confiança e por fazerem parte de minha existência. Amo imensamente todos vocês!

Aos demais membros das **famílias Fernandes e Macedo** por todos os conselhos, apoio e carinho direcionados a minha pessoa.

Ao grande amor desta e de outras vidas, **Marcelo Barbosa Bezerra**, por ter me acompanhado dia-a-dia sendo meu fiel orientador, amigo, cúmplice e companheiro. Obrigada por toda a força e carinho que oferecestes a mim durante nossa convivência. És uma pessoa essencial ao meu desenvolvimento profissional, pessoal e espiritual. Obrigada por fazer-me feliz em todos os momentos, por reafirmar e concluir comigo mais um plano nosso. Dedico-te ontem, hoje e sempre, o meu amor integral e lealdade eterna. Que eu possa ser agraciada com pelo menos mais mil encarnações ao seu lado, pois isto irá com certeza, levar-me à evolução espiritual que tanto almejo. Amo-Te Muito!

Às **famílias Cordeiro e Bezerra** por todo o respeito e carinho dedicados a minha pessoa, e em especial à **Beatriz da Nóbrega Bezerra** e **Benjamin da Nóbrega Bezerra** por serem crianças tão adoráveis.

Aos meus padrinhos **Luis Antônio e Maria José** por proporcionarem momentos tão agradáveis e terem ajudado desde a infância na aquisição de valores que levarei comigo durante toda a vida.

Hoje tenho a convicção de que algumas pessoas não fazem parte do meu convívio por um simples acaso. Todas proporcionam em doses significantes, elementos ao meu enriquecimento e evolução pessoal, espiritual e profissional.

Primeiramente quero agradecer ao Prof. Dr. **Wilter Ricardo Russiano Vicente**, que além de ser um orientador excepcional, é exemplo de humanidade e justiça. Obrigada pela oportunidade dada para mostrar meu potencial e capacidades, e por proporcionar os meios de alcançar meus objetivos. Saiba que o admiro, e quero tê-lo sempre como um grande amigo e exemplo a ser seguido. Esforçar-me-ei sempre para corresponder às suas expectativas.

À Profa. Dra. **Maria Rita Pacheco**, sempre tão carinhosa, preocupada e gentil comigo. És verdadeiramente uma pessoa de infinitos predicados. Obrigada por suas considerações e auxílio durante toda a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. **Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima**, que ouviu minhas preocupações e frustrações sem questionamentos e auxiliou de forma significante deste a concepção deste projeto até os momentos finais de aprimoramento. Agora sei, que este trabalho está bem melhor, pois você contribuiu muito para que isso se concretizasse.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Toniolli**, com quem tive o prazer de conviver no mesmo laboratório, dividindo conhecimentos e experiências. Muito obrigada pela companhia agradável, senso de humor, e por toda a contribuição que destes nesse trabalho de mestrado.

Ao técnico de laboratório **Sr. Orandi Matheus**, que ajudou na confecção das lâminas de histopatológico desse experimento. Muito obrigada por tudo que aprendi com o senhor, por sua paciência e sabedoria.

Aos inesquecíveis amigos e mestres **Alexandro Íris Leite, Everardo Ferreira Praça, Raimundo Alves Barreto Júnior, Faviano Ricelli da Costa e Moreira, Benito Soto Blanco, Carlos Campos Câmara, Nilza Dutra Alves, Regina Valéria da Cunha Dias, Eraldo Barbosa Calado, Valéria Veras de Paula, Kilder Dantas Filgueira, Valdir Martins da Fonsêca Filho, Jael Soares Batista, Jean Berg Alves da Silva, José Fernando Gomes de Albuquerque, Moacir Franco de Oliveira, Ana Kelen Felipe Lima, Débora Andréa Evangelista Façanha Morais, Rui Sales Júnior, Sidney Miyoshi Sakamoto e Wirton Peixoto Costa**, obrigada pelos anos de convivência e por encherem minha alma de saudades.

À amiga querida **Luciane Barreto** que faz uma falta enorme! Obrigada por sua amizade sincera e todo o carinho.

Ao casal **Adriana Oliveira de Almeida e Max Vitória Resende** pela convivência sempre fraterna, gostosa e edificante que vocês me proporcionam. Meu sincero e humilde agradecimento ao Max, por ter ajudado sempre que possível neste experimento e Dri, minha querida amiga, obrigada por sua lealdade e pelo seu jeito meigo e terno de ser. Obrigada

meus amigos, pelos ouvidos emprestados com tanto carinho quando necessitei, pela amizade sincera e por suas companhias iluminadas. Vocês são um presente divino!

À **Mabel Freitas Cordeiro**, pessoa de personalidade forte, às vezes não fácil de compreender, mas que resumidamente mostram o quão especial e importante você é para todos nós. Por toda sua colaboração desde o início deste trabalho, por seus conselhos e tudo enfim, muito obrigada.

À **Maria Emília Franco Oliveira** sempre tão solícita, sorridente e de bem com a vida. Sua amizade e convívio me fizeram um bem enorme.

À **Amélia Lizziane Leite Duarte** pelos momentos agradáveis e descontraídos que me proporcionastes, além de toda a ajuda oferecida durante a execução deste trabalho. Por me fazer compreender que tudo na vida pode ser visto de forma descomplicada, muito obrigada.

Ao casal **Juliana Corrêa Borges e Márcio Ribeiro Silva**, amigos recentes, mas que chegaram por uma força espiritual inexplicável. Obrigada principalmente pelos abraços apertados e sorrisos largos que tanto me fizeram bem. Vocês são seres iluminados. Obrigada.

A todos os que fazem parte da grande família do Centro Espírita Universal (CEU), **Ferroni & Nercy, Flávia & Reginaldo, Vanderley & Beth, Lúcia Sipaúba, Clorivaldo Júnior, Ângela, Rosinha, Wanessa, Luizão, Carol, e Leonardo**, muito obrigada por me ajudarem incansavelmente no longo caminho que ainda tenho a percorrer rumo à evolução espiritual tão desejada.

Aos amigos distantes fisicamente, mas que estão sempre em meu pensamento, **Mariana Machado Matos, Igôr Gurgel Ibiapina, Jussara Benvindo Neri, Wescley Batista dos Santos, Márcia Viviane Alves Saraiva, Elita Miranda de Sousa, Flávio Cyreneu Lira Gomes, Edinaidy Suianny Rocha de Moura, Cynthia Renée Cavalcante, Rômulo Moraes Lacerda e José Eldismar Firmino do Nascimento**, muito obrigada pela convivência maravilhosa durante os cinco anos de nossa graduação e por torcerem pelo meu sucesso.

Às colegas de trabalho, **Clara Slade Oliveira e Letícia Zocolaro de Oliveira**, que tanto me ajudaram neste experimento. Vocês são pessoas que sempre agregam valor àqueles com quem convivem. Obrigada pela amizade, disposição, convivência e alegria.

Aos funcionários e pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal, **Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida, Isabel Aparecida Penharol Natarelli, Felipe Perecin, Simone Cristina Niciura, Frederico Ozanan Barros Monteiro, Naiara Zoccal, Rubia Bueno da Silva, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Ana Paula Perini, Eliana Cristina Gazoto, Lourival Paz Landim, Danilas Salinet de Melo, Aline Costa de Lúcio, Kellen de Sousa Oliveira, Eveline dos Santos Zanetti, Karen Vicente Diagone, Fernanda Patrícia Gottardi, Juliana Pieroni**; e aos residentes e pós-graduandos da obstetrícia veterinária, **Aracélle Elisane Alves, Maricy Apparicio Ferreira, Ana Paula Coelho Ribeiro, Eliandra Antonia Pires, Giuliano Queiroz Mostachio, Karen Vicente Diagone, Diogo José Cardilli, Valeska Rodrigues, Fabiana Azevedo Voorwald, Michele Garcia Medeiros e Tathiana Ferguson Motheo** obrigada por tornarem nosso ambiente de trabalho tão agradável.

Às funcionárias D. Izilda e Anésia pelo carinho. Vocês são pessoas especiais para mim.

Muito obrigada aos **funcionários, residentes e pós-graduandos da Cirurgia Veterinária** que me receberam de forma carinhosa quando cheguei a Jaboticabal-SP.

Aos docentes dos **Departamentos de Reprodução Animal e Clínica e Cirurgia Veterinária** muito obrigada pelos ensinamentos, convívio, respeito, atenção e carinho dedicados a mim.

À **CAPES** pela concessão de minha bolsa de mestrado.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da **Universidade Estadual Paulista** instituição que me acolheu, e a **Universidade Federal Rural do Semi-Árido** que me preparou de forma exemplar para o mundo profissional. Honrarei e serei sempre grata por tudo que aprendi nessas instituições.

E **aos animais** resta apenas a admiração, devotamento, e respeito eternos por toda a contribuição dada por eles à minha vida profissional.

Àqueles que ajudaram e, sempre que podem ajudam, com tanta presteza, e contribuem magnificamente para a minha formação pessoal e profissional.

Muito obrigada a todos !!!
Que Deus os abençoe.

SUMÁRIO **Pág.**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xv**
LISTA DE TABELAS ..... **xvi**
LISTA DE FIGURAS ..... **xviii**
RESUMO ..... **xxi**
SUMMARY ..... **xxii**
1. INTRODUÇÃO **01**
2. REVISÃO DE LITERATURA **03**
3. MATERIAL E MÉTODOS **11**
3.1. Animais e manejo **11**
3.2. Grupos e tratamentos **11**
3.3. Instrumental cirúrgico **12**
3.4. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos **12**
3.5. Colheita de material **17**
3.6. Histologia **18**
3.7. Parâmetros de avaliação **19**
3.8. Análise estatística **19**
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **20**
4.1. Procedimento cirúrgico **20**
4.2. Análise morfológica **22**
4.3. Análise histopatológica **27**
4.3.1. Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais **27**
4.3.2. Morfometria dos folículos pré-antrais e antrais **29**
4.3.3. Avaliação quantitativa e qualitativa dos folículos pré-antrais e antrais **31**
4.3.4. Suprimento vascular para o tecido enxertado **37**
4.3.5. Luteinização **38**
4.3.6. Parênquima renal **40**

5. CONCLUSÕES..... 42
6. REFERÊNCIAS..... 43
APÊNDICES..... 53
Apêndice A: INSTRUMENTAL CIRÚRGICO..... 54
Apêndice B: FICHA I..... 55
Apêndice C: FICHA II..... 56
Apêndice D: FICHA III..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	**Análise de variância**
CAM	**Membrana cório-alantóide**
CEBEA	**Comissão de Ética e Bem-Estar Animal**
COBEA	**Código Brasileiro de Experimentação Animal**
FIV	**Fertilização *in vitro***
FOPA	**Folículos pré-antrais**
HE	**Hematoxilina-Eosina**
IM	**Intramuscular**
TGBβ-1	**Transformação do fator de crescimento β1**
TM	**Tricrômico de Masson**
VEGF	**Fator de crescimento endotelial vascular**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ratas submetidas a ovariosalpingectomia bilateral e inserção de enxerto ovariano sob a cápsula renal (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 12

Tabela 2 - Tempo médio, mínimo e máximo da latência anestésica e dos procedimentos cirúrgicos realizados em ratas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 21

Tabela 3 – Análise morfológica realizada durante a colheita do material quanto à facilidade de localização e migração do enxerto, neovascularização e infecção visível nos diferentes grupos experimentais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 23

Tabela 4 – Análise morfológica realizada durante a colheita do material quanto à alteração no rim, rejeição do enxerto e morfologia uterina nos diferentes grupos experimentais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 24

Tabela 5 - Média e limites mínimo e máximo dos diâmetros (µm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos pré-antrais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 30

Tabela 6 - Média e limites mínimo e máximo dos diâmetros (µm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos antrais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 31

Tabela 7 - Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos normais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 32

Tabela 8 - Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos atrésicos em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007)..... 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Campo cirúrgico; **B**. Incisão na pele; **C**. e **D**. Exposição do ovário, tuba e parte do útero; **E**. Ovário e tuba removidos após ligadura do pedículo ovariano; **F**. Ovário sendo isolado da tuba e fragmentado, com auxílio de lupa e pinças, para posterior inserção sob a cápsula renal..... 15

Figura 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Abertura e divulsão da cápsula renal com pinça denteada; **B**. Inserção de fragmento ovariano através da abertura na cápsula; **C**. Fragmento de tecido ovariano enxertado sob a cápsula renal do rim direito; **D**. Devolução do rim direito à posição anatômica após procedimento de enxertia; **E**. Sutura da camada muscular por fio monofilamento de nylon 5-0 agulhado com auxílio de pinça e porta-agulha; **F**. Finalização da sutura na camada muscular..... 16

Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Finalização da sutura na pele; **B**. Aspecto da sutura na pele após a finalização do procedimento..... 17

Figura 4 - Histograma da fase do ciclo estral em função do tempo de enxerto ovariano em ratas..... 25

Figura 5 - Fotomicrografia de ovário de rata (região cortical): **A**. Folículo primordial (FP) e folículos de transição (FT); **B**. Folículos de transição (FT); **C**. Folículo primário; **D**. Folículo secundário. Núcleo do oócito (no), oócito (*) e células da granulosa (g). HE, 40x..... 27

Figura 6 - Fotomicrografia de ovário de rata (região cortical): **A**. Folículos pré-antrais: primordial (FP), de transição (FT), e secundário (F2˚). HE, 20x; **B**. Folículo antral inicial com duas pequenas cavidades antrais em formação. HE, 20x; **C**. Folículo antral contendo um único antro. HE, 20x; **D**. Folículo pré-ovulatório com antro repleto de fluido folicular e células do *cumulus oophorus* circundando o oócito. HE, 10x. Células da Teca (seta preta), oócito (*), antro (a), células da granulosa (g), células do *cumulus oophorus* (c)..... 28

Figura 7 - Histograma do número total de folículos pré-antrais em função do tempo de enxerto ovariano em ratas..... 35

Figura 8 - Histograma do número total de folículos antrais em função do tempo de enxerto ovariano em ratas..... 36

Figura 9 - Histograma da área total ocupada por folículos no parênquima do tecido enxertado (μm^2) em função do tempo de enxerto..... 36

Figura 10 - Fotomicrografias de tecido ovariano **A**. enxertado sob a cápsula renal e obtido após uma semana (Grupo 1S). **B**. rata controle. Notar vênula e seu respectivo lúmen repleto de hemácias (LV); e artéria de médio calibre em corte transversal evidenciando lúmen (LA), membrana elástica interna (*), túnica íntima (►), média (**) e adventícia (seta preta). HE, 40x..... 38

Figura 11 - Histograma da presença de corpo lúteo (%) em função do tempo em animais enxertados..... 39

Figura 12 - Fotomicrografia de ovário enxertado sob a cápsula renal de rata após uma semana. Notar corpo lúteo (CL), cápsula renal (CR) e parênquima renal (PR). TM, 10x..... 39

Figura 13 - Fotomicrografia da região cortical do parênquima renal de rata após quatro semanas de enxerto sob a cápsula renal. Dois corpúsculos renais (CR) são visualizados com folhetos interno (►) e externo da cápsula de Bowman (CB) e glomérulo (G). Notar espaço capsular (*). HE, 40x..... 40

Figura 14 - Fotomicrografia da região cortical do parênquima renal de rata, **A**. após 24 horas, **B**. 72 horas, **C**. uma semana, TM, 10x, e **D**. quatro semanas de enxerto sob a cápsula renal, TM, 20x. Notar cápsula renal (CR), parênquima renal (PR), enxerto ovariano (EO)..... 41

AVALIAÇÃO CIRÚRGICA E HISTOPATOLÓGICA DA VIABILIDADE DO AUTO-ENXERTO DE TECIDO OVARIANO NA REGIÃO SUBCAPSULAR DO RIM DE RATAS

RESUMO: Objetivou-se desenvolver uma técnica de cultivo de folículos pré-antrais pelo auto-enxerto de tecido ovariano, avaliando a viabilidade cirúrgica e histopatológica desta técnica em função do tempo. Sessenta ratas Wistar foram submetidas à ovariosalpingectomia bilateral e enxerto de fragmento ovariano inserido sob a cápsula renal do rim direito. Os animais foram subdivididos em seis grupos experimentais baseados no tempo de pós-cirúrgico. Transcorridas 24 h (grupo 24H), 72 h (grupo 72H), 1 semana (grupo 1S), 2 semanas (grupo 2S), 3 semanas (grupo 3S), e 4 semanas (grupo 4S), os animais foram sacrificados. As peças cirúrgicas, compostas por enxerto ovariano e parênquima renal subjacente, foram imersas em solução de Bouin durante 24 horas, sendo processadas histologicamente, e coradas por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. Aspectos técnicos cirúrgicos, morfológicos e histopatológicos foram avaliados. Os procedimentos cirúrgicos foram de fácil execução e a avaliação morfológica revelou facilidade de localização, poucos casos de migração e neovascularização do enxerto após 1 semana. Não houve sinais de rejeição do enxerto, e o aspecto macroscópico do útero foi normal na maioria dos animais. A histopatologia mostrou diferentes proporções entre as categorias foliculares em função do tempo de enxerto sem alterações no parênquima renal. Concluiu-se que a técnica de enxerto do tecido ovariano sob a cápsula renal é exeqüível e viável tanto cirúrgica quanto histopatologicamente permitindo o desenvolvimento de folículos a estágios antrais num curto espaço de tempo.

Palavras-Chave: Auto-enxerto, cápsula renal, ovariosalpingectomia, folículo, rata.

SURGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF VIABILITY OF OVARIAN AUTOGRAFT IN THE RENAL SUBCAPSULAR SITE IN RATS

SUMMARY: This study aims to develop a technique to culture preantral follicles using ovarian autograft, and to evaluate surgically and histopathologically the viability of this technique regarding the time. Sixty Wistar rats were submitted to bilateral ovariosalpingectomy and her ovarian tissue grafted under renal capsule of the right kidney. The animals were divided into six groups based on the post surgical time. After 24 h (group 24H), 72 h (group 72H), 1 week (group 1S), 2 weeks (group 2S), 3 weeks (group 3S), e 4 weeks (group 4S), the animals were sacrificed. The surgical samples, composed by ovarian graft and the near renal parenchyma, were fixed in Bouin solution for 24 hours, submitted to semi-serially sections, and stained with hematoxiline-eosine and Masson tricromic. Surgical, morphological and histopathological aspects were evaluated. The surgical procedures were performed easily and the morphological evaluation resulted easily located, few cases of migration with neovascularization of the graft after one week. No signals of graft rejection and the uterine macroscopy was normal in the majority of the animals. The histology showed different proportions between follicular categories during the graft period and no alterations in the renal parenchyma. In conclusion, grafting of ovarian tissue under renal capsule is easy to execute, viable of the surgical and histopathological points of view, allowing follicular development in a short time.

Keywords: Autograft, renal capsule, ovariosalpingectomy, follicle, rat.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um sistema de cultivo que promova o crescimento dos folículos pré-antrais (FOPA) a um estágio no qual possam ser maturados e fecundados *in vitro*, pode possivelmente, permitir a obtenção de uma grande população de oócitos homogêneos evitando ainda, que eles tornem-se atrésicos (McCAFFERY et al., 2000; SAHA et al., 2000). O cultivo desses folículos pode ser realizado *in vivo* pelo enxerto de ovários inteiros ou de fragmentos ovarianos (SALLE et al., 2002). Esta técnica visa, além do cultivo, à manutenção da função endócrina e restauração da capacidade reprodutiva (PETROIANU et al., 2004a), podendo também ser usada para restaurar a fertilidade de fêmeas com infertilidade adquirida (CAMPBELL et al., 2000). As perspectivas de aplicação desta técnica vão desde a manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer (DONNEZ et al., 2004) até a preservação da diversidade genética necessária à conservação de animais ameaçados de extinção (DEMIRCI et al., 2003).

Uma alternativa a esta técnica seria a maturação de folículos primordiais *in vitro*. O objetivo desse tipo de cultivo é tentar reproduzir os processos que ocorrem *in vivo*, investigando suas bases fisiológicas para atingir um crescimento folicular pleno (CECCONI, 2002). Porém, o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* ainda é um desafio a ser vencido, fato este que pode ser comprovado pelas publicações na área, as quais demonstram sucesso apenas na maturação de folículos antrais (CHA et al., 1991; DANDEKAR et al., 1991) e a perda de material genético ocorrida, por exemplo, quando em 1996, EPPIG & O'BRIEN, relataram sucesso na maturação *in vitro* de folículos primordiais em camundongas, porém o nascimento de um animal foi obtido somente após o cultivo de aproximadamente 475 folículos primordiais.

Apesar dos recentes avanços nestas áreas, condições ótimas para o cultivo de FOPA utilizando transplante ovariano ainda não foram estabelecidas, uma vez que o sucesso da técnica depende de uma série de fatores tais como tamanho do

enxerto, local escolhido para transplantá-lo, e presença de fatores angiogênicos; bem como do número de folículos que sobrevivem ao procedimento e da habilidade desses em completar o seu desenvolvimento (DISSEN et al., 1995; CAMPBELL et al., 2000; ISRAELY et al., 2003).

Neste contexto, pesquisas experimentais estão sendo executadas com o objetivo de conhecer e avaliar comparativamente qual técnica cirúrgica é mais adequada e oferece o melhor desenvolvimento ao tecido enxertado (ISRAELY et al., 2003; YANG et al., 2006). Porém, histopatologicamente, existem poucas avaliações da viabilidade folicular para os diferentes tipos de tecido receptor e ovário autotransplantado, bem como, qual a interação entre os tecidos ao longo do tempo (PETROIANU et al., 2004a).

Por necessidade de esclarecimento das questões técnicas citadas anteriormente, principalmente na área da medicina veterinária, elaborou-se este trabalho que objetivou elucidar quais as alterações morfológicas e histopatológicas, impostas tanto ao órgão receptor quanto ao tecido enxertado em diferentes tempos de pós-cirúrgicos; além de verificar cirurgicamente quais os principais aspectos relacionados à aplicação do auto-enxerto ovariano utilizando ratas como modelo experimental avaliando por fim, se o cultivo de folículos ovarianos utilizando a técnica de enxerto de tecido ovariano sob a cápsula renal é viável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Enxertar consiste em transferir por meios cirúrgicos para um indivíduo, partes de tecido ou órgão retirado dele mesmo ou de um doador; sendo este conceito também um sinônimo de transplantar de acordo com o dicionário LAROUSSE ESCOLAR DA LÍNGUA PORTUGUESA (2004). Os enxertos ovarianos podem ser classificados de acordo com a espécie receptora como: auto (mesmo indivíduo), iso (animal geneticamente idêntico), alo (outro ser da mesma espécie) ou xeno-enxerto (de outra espécie) (ANDRADE et al., 2004). Segundo a sua localização, os enxertos podem ser classificados em: ortotópicos (quando implantados na cavidade pélvica) ou heterotópicos (quando são enxertados fora dela) (DONNEZ et al., 2006).

Esses conceitos, não são novos na medicina reprodutiva. Os primeiros relatos constam de MORRIS (1895) e KNAUER (1896), que visavam o rejuvenescimento mediante a manutenção dos níveis hormonais após o climatério. A partir da década de 40, com o advento das pílulas de reposição hormonal, houve uma diminuição das investigações sobre o transplante ovariano. Entretanto, foi apenas no final do século XX que se retomou o interesse pelo assunto, graças aos conceitos emergentes de endocrinologia e imunologia, possibilitando assim, estudos mais aperfeiçoados em transplantes experimentais (PETROIANU et al., 2004a).

De acordo com HAFEZ & HAFEZ (2004), o ovário tem duas funções principais, a produção cíclica de oócitos fertilizáveis e de hormônios esteróides, em proporções balanceadas. Tais hormônios atuam no desenvolvimento do trato genital, facilitando a migração de embriões nas fases iniciais, e assegurando sua implantação e crescimento no útero. O folículo é a estrutura ovariana que permite ao ovário exercer suas duas funções: a gametogênese e a esteroidogênese. Eles estão presentes aos milhares no córtex ovariano em estágios pré-antrais e antrais.

Para estimar-se o número de folículos ovarianos existentes num ovário GOUGEON & CHAINY (1987) utilizaram métodos estereológicos baseados no

número total de folículos observado para cada categoria, total de secções histológicas feitas e observadas, na espessura dos cortes (μm), e no diâmetro médio do núcleo de cada tipo de folículo.

Para HIRSHFIELD & REES MIDGLEY JR (1978) e LINTERN-MOORE & EVERITT (1978), a classificação folicular pode ser feita de duas formas: uma baseada no tamanho folicular e a outra, no tipo celular ou estágio de desenvolvimento. Segundo PEDERSEN & PETERS (1968), os folículos são classificados de acordo com o tipo e o número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito. Sendo os primordiais àqueles contendo um oócito circundado por uma camada parcial ou completa de células pavimentosas da granulosa. Folículos intermediários ou de transição, contendo uma camada de células da granulosa tanto pavimentosas quanto cúbicas. Os primários mostrando uma camada simples de células da granulosa cúbicas. Folículos secundários, sendo assim classificados, quando possuem mais de uma camada de células da granulosa cúbicas sem antro visível. E por fim, folículos antrais iniciais aqueles com uma, ou mais, pequenas áreas de fluido folicular (antro), os antrais mostrando uma única e grande cavidade antral e o pré-ovulatório, aquele que possui um alo ou camada de células do *cumulus* circundando o oócito.

Em mamíferos, o “pool” dos folículos primordiais estabiliza-se na vida fetal ou logo após o nascimento dependendo da espécie. Uma vez estável, a reserva desse tipo folicular começa a diminuir pelo desenvolvimento dos folículos pré-antrais a antrais, ou por degeneração *in situ*, o que ocorre com a maioria deles ao longo da vida reprodutiva de uma fêmea (99%) (HIRSHFIELD, 1988). Seria de grande benefício se estes folículos, destinados a se tornarem atrésicos, pudessem ser recuperados antes de sua degeneração (SAHA et al., 2000). Por essa reserva nunca ser reposta ao longo da vida da fêmea, é que algumas linhas de pesquisa, buscando a estimulação desses folículos até sua fase antral, têm-se tornado incansáveis, e cada vez mais freqüentes (OKTAY et al., 1995).

Etimologicamente, a atresia não é um sinônimo de degeneração. Entretanto, degeneração folicular, pode ser comumente denominada atresia,

quando estiver relacionada aos oócitos que são perdidos no ovário por várias razões que não a ovulação. Porém, a homologia dos fenômenos envolvidos nestes processos, justifica a utilização do termo atresia (INGRAM, 1977). Esta, por sua vez, está associada a uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e histológicas, que variam de acordo com o estágio do crescimento folicular, e espécie animal. Tais mudanças podem estar relacionadas às alterações funcionais das células da granulosa e no transporte de nutrientes do plasma para o folículo. A degeneração é acompanhada pela perda do oócito, das células da granulosa e de receptores para vários hormônios. Fatores como idade, estágio do ciclo reprodutivo, gestação, lactação, equilíbrio entre estrógenos e andrógenos de fontes intra e extra-ovarianas, nutrição e isquemia tecidual, regulam a atresia folicular (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Folículos são considerados atrésicos se houver picnose nuclear nas células da granulosa e se o oócito apresentar sinais de degeneração (ISRAELY et al., 2003). Pode-se observar ainda descontinuidade da lâmina basal, com numerosas fibras de tecido conectivo ao redor, condensação de heterocromatina, descontinuidade focal do oolema folicular, irregularidades no perfil nuclear, grupos de gotas lipídicas ou pequenos vacúolos (CAMBONI et al., 2005).

A coordenação da formação folicular e o início da ativação dos folículos primordiais em roedores, associados ao tamanho do ovário, permitem o cultivo desses órgãos inteiros e fazem com que eles sejam frequentemente utilizados como modelos experimentais. Em primatas e ruminantes não ocorre o mesmo, já que sua formação folicular inicia durante o desenvolvimento fetal e esta permanece até que alguns folículos sejam ativados e deixem o grupo dos folículos quiescentes. O início do crescimento folicular pode ser regulado primariamente por uma possível inibição proveniente da zona mais central da região medular do ovário. Se esta informação procede, pode-se explicar porque a maioria dos folículos primordiais é ativada quando fragmentos corticais ovarianos de bovinos ou babuínos são colocados em cultivo, desde que a situação deles seja, presumivelmente, livre da influência dessa inibição medular. Porém, quando se

cultivam ovários inteiros de camundongas contendo todos os componentes ovarianos, espera-se que haja a continuidade desse controle do número de folículos primordiais ativados. Entretanto, isso não é obtido diretamente, o que não dá respaldo à hipótese de inibição medular. Outro fato, também contrário a essa hipótese, é aquele que ocorre quando fragmentos corticais de ovários bovinos ou babuínos são enxertados *in ovo* (geralmente na membrana cório-alantóide - CAM), e a ativação espontânea dos folículos não é observada (FORTUNE et al., 2000).

Teoricamente, existem cinco caminhos possíveis à maturação oocitária: o auto, o alo ou o xeno-enxerto, a maturação *in vitro*, e a transferência nuclear. Cada uma dessas técnicas tem suas utilidades e limitações. Com relação ao auto-enxerto as principais vantagens estão no retorno rápido e espontâneo à fertilidade em fêmeas ovariectomizadas, normalmente sem necessidade de terapia hormonal, não havendo chance de rejeição do enxerto, e por esse motivo, não há exigência de terapia imunossupressiva. Também não se tem relatos de dificuldades na obtenção de folículos maduros, e não esbarra em questões éticas, como por exemplo, a chance de transmissão de agentes infecciosos ou o risco de alteração do genoma do receptor como ocorre no xeno-enxerto. No entanto, a limitação do auto-enxerto, que também deve ser extensível às demais técnicas de enxertia, está no desconforto do paciente que precisa ser monitorado com uma maior freqüência (AUBARD, 2003).

O enxerto ovariano preserva a função deste órgão e minimiza os efeitos indesejáveis do climatério precoce em mulheres ovariectomizadas (STIFF et al., 1997). Isto se deve ao fato de que o ovário de mamíferos, quando transplantado para um sítio ectópico, torna-se hormonalmente competente e capaz de ovular dentro de poucas semanas (DISSEN et al., 1994). No entanto, alguns problemas técnicos relacionados aos transplantes, como a incerteza do sucesso na revascularização do órgão, rejeição do tecido transplantado e toxicidade das drogas imunossupressoras, que em certos casos são necessárias, frequentemente obscurecem o objetivo original de alguns trabalhos (WOOD, 1982).

São várias as aplicações da técnica de enxertia ovariana. Dentre elas podemos especificar a manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer que necessitam submeter-se a seções de quimio e radioterapia, e tem seus ovários ou parte deles, criopreservados para após o tratamento serem re-enxertados, em sua posição anatômica de origem (DONNEZ et al., 2004) originando o nascimento de crianças saudáveis sem que nenhuma outra intervenção seja necessária; ou no tecido subcutâneo do antebraço (OKTAY et al., 2004) sendo nesse último caso, necessária a fertilização *in vitro* (FIV) para chegar-se à gestação e nascimento. A preservação da diversidade genética necessária à conservação de animais ameaçados de extinção, também constitui um emprego à técnica de xeno ou alo-enxertia; entretanto, pode ser necessário utilizar técnicas de criopreservação ovariana, por não se ter um receptor exatamente no momento requerido para o transplante (DEMIRCI et al., 2003). Além disso, o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* ainda é um desafio a ser vencido. O objetivo desse tipo de cultivo é tentar reproduzir os processos que ocorrem *in vivo*, investigando suas bases fisiológicas para atingir um crescimento folicular pleno, deixando-os aptos para serem submetidos aos procedimentos de maturação e fertilização *in vitro*. (CECCONI, 2002).

Estudos experimentais estão sendo executados com o objetivo de conhecer a técnica cirúrgica mais adequada e eficiente para realização do enxerto, bem como, quais locais do organismo permitem um melhor desenvolvimento do tecido enxertado. Dentre eles, poucos não obtiveram sucesso em seus resultados como, por exemplo, o que foi realizado com enxerto de ovário íntegro na bolsa omental de ratas, resultando em morte do tecido enxertado, sugerindo que o enxerto de fragmentos ovarianos seja mais adequado pela facilidade de revascularização (BRITO et al., 2005). Entretanto, a maioria dos estudos realizados obteve êxito, como por exemplo, àqueles em que o tecido ovariano foi transplantado heterotopicamente para o antebraço (WOLNER-HANSSEN et al., 2005) e parede abdominal em humanos (SCHMIDT et al., 2005), cápsula renal (LEE et al., 2005), tecido subcutâneo (ISRAELY et al., 2003), tecido muscular (ISRAELY et al., 2003)

de camundongos, omento maior em coelhas (ALBERTI et al., 2002), retroperitônio de ratas (D'ACAMPORA et al., 2004), região inguinal de ratas (CESCHIN et al., 2004) e ortotopicamente para a bursa ovariana sem anastomose vascular em ratas (GUNASENA et al., 1997; PETROIANU et al., 2004b; PETROIANU et al., 2006).

Segundo YANG et al. (2006), pesquisas promissoras em animais têm demonstrado que crias vivas podem ser obtidas a partir de oócitos de ovários enxertados tanto em locais ortotópicos quanto heterotópicos, mas ainda não existem estudos que comparem diretamente a qualidade dos oócitos produzidos entre esses diferentes locais. Sabe-se que a localização anatômica escolhida para receber o enxerto influencia diretamente em vários aspectos, dentre eles, o número e a qualidade dos oócitos produzidos a partir deles (YANG et al., 2006). ISRAELY et al. (2003) explicam que isso pode ser devido à injúria sofrida pelo tecido enxertado, denominada período de isquemia – reperfusão, que em roedores oscila entre 24 e 48 horas pós-transplante, e perdura até haver uma estabilização do novo suprimento vascular, bem como, dos danos sofridos pelas células endoteliais e perivasculares.

DISSEN et al. (1995) e ISRAELY et al. (2003) afirmam que a duração da isquemia e reperfusão do tecido enxertado depende de uma série de fatores, tais como tamanho do enxerto, local escolhido para transplantá-lo e presença de fatores angiogênicos. Esse período de tempo é, sem dúvida, o fator determinante para o sucesso da técnica, pois enquanto o enxerto permanece sem suprimento sanguíneo, suas células utilizam reservas intracelulares, aguardando a vascularização pós-transplante. A neovascularização está acompanhada de um aumento na expressão de genes que codificam fatores angiogênicos, fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), e transformação do fator de crescimento β1 (TGFβ-1). O procedimento de enxertia também interrompe a inervação do ovário, que possui nervos intrínsecos e extrínsecos, os quais controlam o fluxo sanguíneo, bem como, influenciam no desenvolvimento folicular e oocitário.

Embora os enxertos ovarianos tornem-se revascularizados e reinervados, todo esse processo pode desregular o sistema essencial ao crescimento normal dos folículos e oócitos, resultando num número menor de oócitos competentes (YANG et al., 2006). Dois estudos realizados com enxerto sob a cápsula renal, não obtiveram uma sobrevivência folicular satisfatória, mesmo sendo este local, rico em suprimento sanguíneo. Num deles, o tecido ovariano transplantado a fresco sob a cápsula renal de camundongas, resultou numa redução de 50% no número de folículos (FELICIO et al., 1983); e em ovelhas, apenas 35% dos folículos sobreviveram (BAIRD et al., 1999). Outras alterações como uma redução de 30-70% no tamanho do enxerto e proliferação de tecido fibroso também já foram relatadas (KIM et al., 2001). A maioria dessas alterações ocorre durante os primeiros dias após o transplante (FELICIO et al., 1983).

Enxertos heterotópicos localizados abaixo da cápsula renal de camundongas produziram oócitos viáveis que se desenvolveram satisfatoriamente após uma FIV, gerando embrião que veio a termo numa gestação por mãe substituta (CARROL et al., 1990; WATERHOUSE et al., 2004). Entretanto, existe apenas um relato de nascimento em animais, derivado de enxerto localizado no tecido subcutâneo, ocorrido em macaco, resultante também de embriões que foram transferidos para mães de aluguel (LEE et al., 2004). Um embrião humano de quatro células foi produzido por injeção espermática intracitoplasmática num oócito coletado de um tecido ovariano enxertado subcutaneamente na parede abdominal. Entretanto, este embrião não se desenvolveu até o nascimento após ser implantado no útero da paciente (OKTAY et al., 2004).

Como pôde ser observado, o sucesso da técnica depende diretamente da posição escolhida para alocar-se o enxerto, possibilitando maior ou menor chance de recuperar tanto o enxerto realizado quanto os folículos nele contidos. A cápsula renal promove uma maior taxa de recuperação folicular quando comparada ao tecido subcutâneo; provavelmente, devido ao vasto suprimento vascular, que facilita o estabelecimento do enxerto e o suporte adequado às suas células, em contrapartida ao tecido subcutâneo que possui uma baixa vascularização

(ISRAELY et al., 2003; YANG et al., 2006). Para LIU et al. (2003), o transplante de ovário a esses outros locais do corpo, pode desregular vários processos intra-ovarianos, deixando-o exposto a diferentes ambientes. Estes autores citam como exemplo dessa situação, o enxerto realizado no tecido subcutâneo, região que, além de passar por alterações de pressão, sofre constantes oscilações de temperatura, danificando o citoesqueleto celular e a seqüência de eventos meióticos necessários ao desenvolvimento oocitário satisfatório.

PETROIANU et al. (2004a) afirmam que a maioria dos trabalhos experimentais sobre transplante ovariano visa principalmente à manutenção da função endócrina e à restauração da capacidade reprodutiva. Porém, histopatologicamente existem poucas avaliações da viabilidade folicular e ovariana para os diferentes sítios de tecido receptor e autotransplantado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – SP, sob o protocolo 024676-06.

3.1. Animais e manejo

Foram utilizadas 60 ratas (*Rattus novergicus*) da linhagem Wistar, adultas, pesando entre 200 e 300 gramas, procedentes do Biotério da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba, e mantidas durante a fase experimental, no Biotério do Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal – SP.

Após o transporte e chegada a este local, os animais foram submetidos à quarentena, sendo mantidos durante todo o experimento em número de quatro animais por caixa (20x30x13 cm), tendo livre acesso à água e ração, apropriada para a espécie[1], além de sementes de girassol duas vezes por semana.

3.2. Grupos e tratamentos

Os 60 animais foram subdivididos aleatoriamente em seis grupos experimentais de tratamento (Tabela 1).

[1] Labina Animais de Laboratório, Purina - Paulínia – São Paulo

Tabela 1 – Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ratas submetidas a ovariosalpingectomia bilateral e inserção de enxerto ovariano sob a cápsula renal (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

GRUPOS	TRATAMENTOS (Remoção do enxerto)
24 H (n = 10)	Após 24 horas
72 H (n = 10)	Após 72 horas
1 S (n = 10)	Após 1 semana
2 S (n = 10)	Após 2 semanas
3 S (n = 10)	Após 3 semanas
4 S (n = 10)	Após 4 semanas

n: número de animais por grupo; H: horas; S: semanas.

3.3. Instrumental cirúrgico

Para realização dos procedimentos cirúrgicos de ovariosalpingectomia e auto-enxerto ovariano, foram utilizados instrumentais cirúrgicos apropriados a microcirurgia, incluindo tesouras, pinças (hemostáticas, para tecidos, de dissecação e de campo), cabos para lâmina de bisturi, e material auxiliar (Apêndice A).

3.4. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

Utilizou-se o protocolo de anestesia dissociativa composto por cloridrato de xilazina[2] (10 mg/kg de peso corpóreo) e cloridrato de ketamina[3] (70 mg/kg de peso corpóreo), misturados na mesma seringa de 1 mL e administrados por via

[2] Dorcipec, Vallée – Montes Claros-MG
[3] Dopalen, Vetbrands – Jacareí-SP

intramuscular (IM) na face interna do membro pélvico, sendo esta dose ajustada individualmente durante o procedimento cirúrgico para manutenção do plano anestésico desejado (parâmetros fisiológicos estáveis e imobilidade, permitindo a realização da técnica cirúrgica). Em roedores não são necessários jejum hídrico e alimentar.

Os procedimentos cirúrgicos realizados durante o experimento obedeceram às técnicas básicas de incisão e excisão de tecidos a saber: manutenção da hemostasia, manipulação e cuidados com os tecidos expostos, uso de suturas e outros materiais para a restauração da estrutura anatômica e sustentação dos tecidos durante a cicatrização (HOLMBERG, 1998).

Após tricotomia bilateral da região sublombar, realizou-se anti-sepsia com solução alcoólica de iodo a 2%, seguida pela colocação de panos de campo (Figura 1.A).

Todos os animais foram submetidos à ovariosalpingectomia bilateral por incisão sublombar direita e esquerda de aproximadamente 1 cm, sempre caudal à última costela (Figura 1.B), com lâmina de bisturi n˚23 apoiada em cabo n˚4. Após identificação dos órgãos internos e tracionamento cuidadoso do pedículo ovariano (Figuras 1.C e 1.D) utilizando gancho de ovário-histerectomia e pinça de tecido, procedeu-se a ligadura deste por meio de sutura com fio absorvível (catgut simples 4-0 agulhado[4]) e posterior secção com tesoura imediatamente acima da ligadura executada. As estruturas recém-ligadas foram cuidadosamente inspecionadas, quanto a possíveis hemorragias e reposicionadas no abdômen.

Seguiu-se então, com a sutura simples separada dos planos muscular, subcutâneo e dérmico com fio inabsorvível (monofilamento nylon 5-0 agulhado[5]).

O ovário esquerdo removido junto com a tuba uterina correspondente (Figura 1.E) foi cuidadosamente isolado desta e da bolsa ovariana com auxílio de lupa, pinças e lâmina de bisturi (Figura 1.F). Este ovário após ser isolado, foi seccionado, obtendo-se um fragmento cortical de aproximadamente 1mm^3,

[4] Catgut, Brasuture - São Sebastião de Grama - SP
[5] Nylon, Brasuture - São Sebastião de Grama - SP

tomando sempre a precaução de não obter-se esse fragmento com folículos antrais visíveis. Esse fragmento foi imerso novamente em solução fisiológica estéril até que fosse enxertado. Os ovários direitos e tubas uterinas ipsilaterais foram descartados.

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 ovariosalpingectomia direita, isolou-se o rim direito, apoiando-o de forma cuidadosa entre os dedos polegar e indicador, procedendo-se pequena secção em sua cápsula com auxílio de pinça denteada (Figura 2.A). Apreendeu-se o fragmento previamente selecionado e seccionado procedente do ovário esquerdo do mesmo animal, inserindo-o cuidadosamente através da secção realizada (Figura 2.B). Feito isso, alocou-se o fragmento no local desejado (Figura 2.C), retirou-se a pinça promovendo uma hemostasia criteriosa com auxílio de compressas de gazes estéreis por compressão local, evitando assim posteriores aderências. Não havendo sangramentos, o rim era devolvido à sua posição anatômica de origem (Figura 2.D), perfazendo então as suturas dos demais planos cirúrgicos (Figuras 2.E, 2.F, 3.A, e 3.B).

Ao final do procedimento cirúrgico foi preenchida uma ficha (Apêndice B) com os seguintes parâmetros: período de latência anestésica após administração intramuscular, grau de analgesia obtido, facilidade para execução das ovariosalpingectomias, e inserção do enxerto sob a cápsula renal, adequação do instrumental cirúrgico aos procedimentos realizados, complicações transcirúrgicas e tempo transcirúrgico.

No período de pós-operatório, foi realizada observação diária da ferida cirúrgica, principalmente com relação a sinais de hemorragia, deiscência de pontos, e infecção.

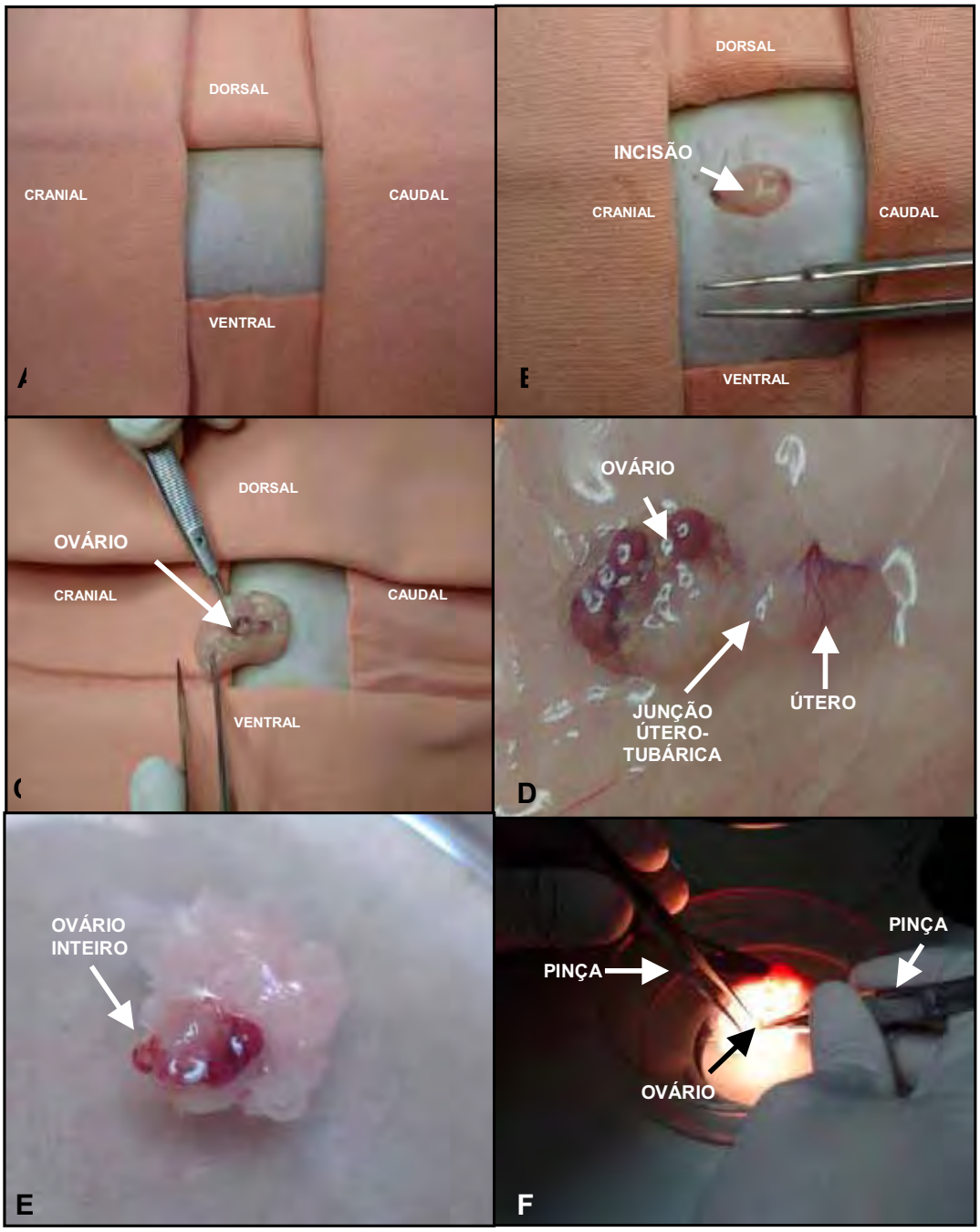

Figura 1 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Campo cirúrgico; **B**. Incisão na pele; **C**. e **D**. Exposição do ovário, tuba e parte do útero; **E**. Ovário e tuba removidos após ligadura do pedículo ovariano; **F**. Ovário sendo isolado da tuba e fragmentado, com auxílio de lupa e pinças, para posterior inserção sob a cápsula renal.

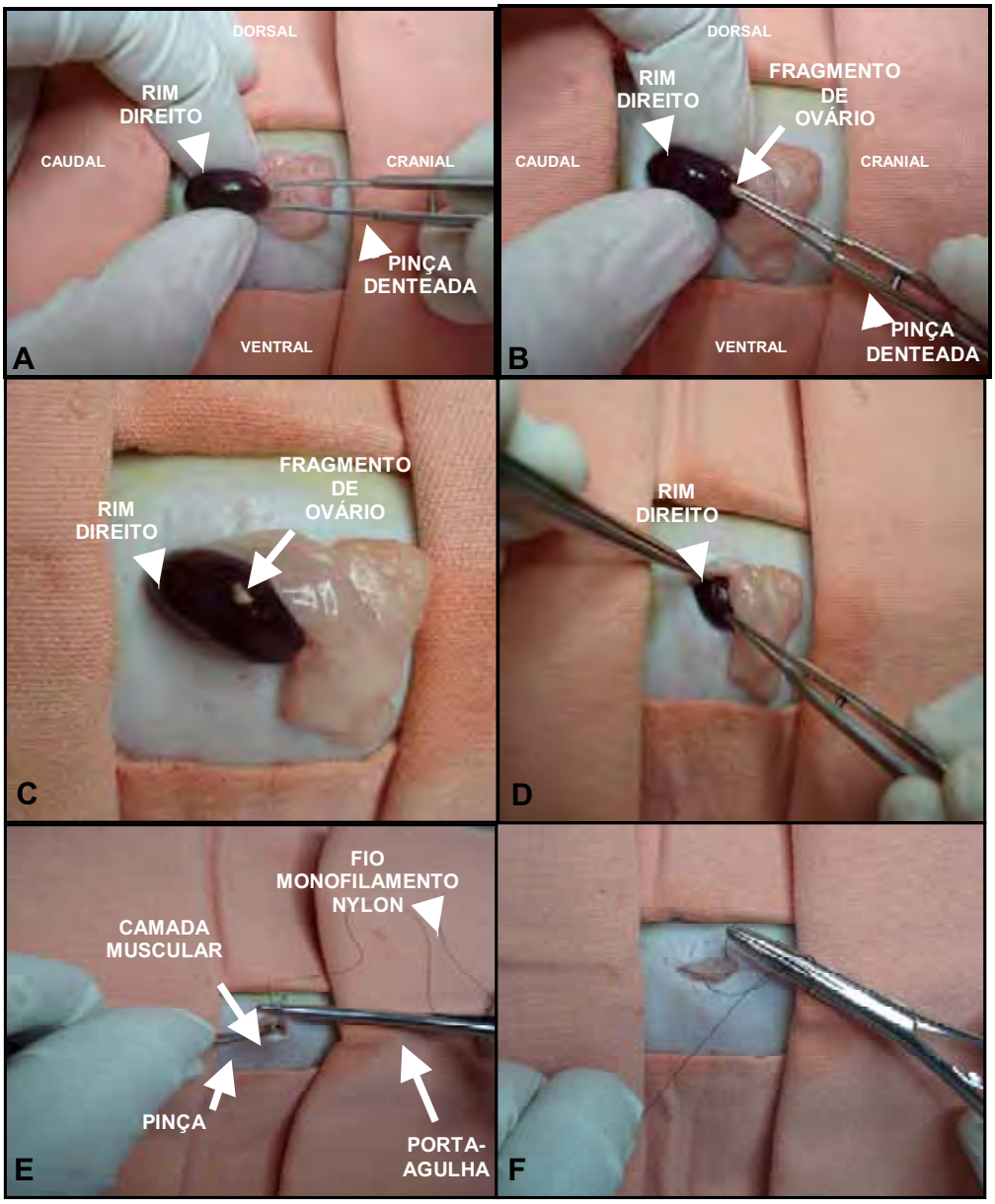

Figura 2 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Abertura e divulsão da cápsula renal com pinça denteada; **B**. Inserção de fragmento ovariano através da abertura na cápsula; **C**. Fragmento de tecido ovariano enxertado sob a cápsula renal do rim direito; **D**. Devolução do rim direito à posição anatômica após procedimento de enxertia; **E**. Sutura da camada muscular por fio monofilamento de nylon 5-0 agulhado com auxílio de pinça e porta-agulha; **F**. Finalização da sutura na camada muscular.

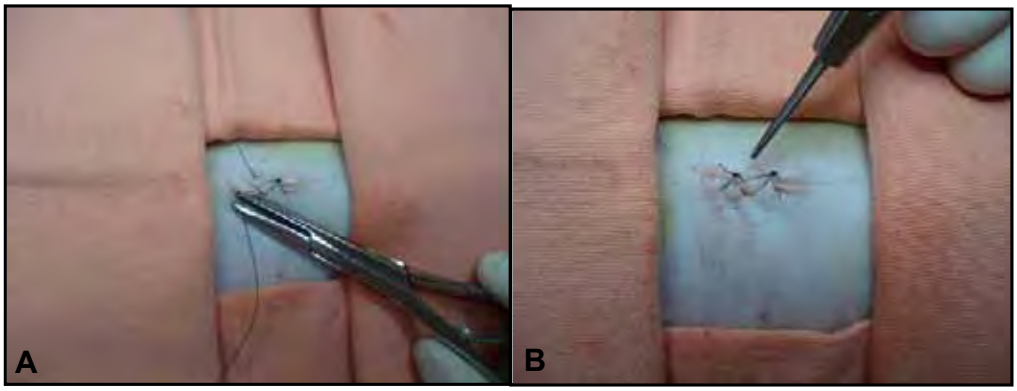

Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico de ovariosalpingectomia e enxerto ovariano sob a cápsula renal. **A**. Finalização da sutura na pele; **B**. Aspecto da sutura na pele após a finalização do procedimento.

3.5. Colheita de material

Seguindo o delineamento experimental, os animais foram submetidos à anestesia geral com éter etílico por via inalatória e sacrificados por deslocamento cervical. Realizou-se a retirada em bloco do fragmento de tecido ovariano enxertado sob a cápsula renal e parênquima renal subjacente.

Durante a colheita algumas informações como facilidade para localização do tecido enxertado, migração do enxerto, neovascularização macroscopicamente visível, sinais de infecção, alteração morfológica no órgão receptor, rejeição do tecido enxertado e aspecto morfológico do útero, foram coletadas (Apêndice C).

Esfregaços vaginais foram realizados após o sacrifício dos animais com o intuito de conhecer a fase do ciclo estral que eles apresentavam no momento. Para tal avaliação utilizaram-se os padrões estabelecidos por LONG & EVANS (1922) e COOPER et al. (1993).

O material obtido foi devidamente identificado por grupo e animal, imerso em solução de Bouin e enviado para processamento histológico.

3.6. Histologia

Os fragmentos colhidos foram fixados em solução de Bouin (70% de solução concentrada de ácido pícrico, 25% de formol comercial 40% e 5% de ácido acético glacial) por 24 horas e processados de forma rotineira para inclusão em Histosec® e obtenção de cortes medindo 5 µm de espessura. Uma secção foi montada em lâmina histológica a cada 70 µm. Os cortes foram corados posteriormente pela hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) conforme BEHMER et al. (1976).

Os folículos visualizados foram contabilizados e devidamente classificados quando evidenciavam o núcleo do oócito. A análise morfométrica foi feita com auxílio de uma ocular micrométrica, e objetivas de 10x, 20x, e 40x, a depender do tamanho do folículo. A morfometria dos folículos ovarianos classificados em normais foi realizada por medições do diâmetro do núcleo do oócito e oócito. Além disso, foram feitas duas medições do diâmetro folicular (menor e maior obtendo-se a média), tendo como limite a camada de células da Teca externa, e por referencial o núcleo do oócito. Para efeito de cálculo estereológico, os folículos foram considerados como estruturas esféricas. As devidas correções e estimativas de população folicular foram calculadas com a utilização da fórmula de GOUGEON & CHAINY (1987):

$$N_t = \frac{N_o \times S_t \times t_s}{S_0 \times d_0}$$

Sendo: N_t = número total de folículos calculado para cada tipo; N_o = número de folículos observados no ovário; S_t = total de secções no ovário; t_s = espessura da secção (µm); S_0 = número total de secções observadas; e d_0 = diâmetro médio do núcleo de cada tipo de folículo.

A avaliação da área folicular total observada nos grupos experimentais foi realizada tomando-se por base a soma das proporções existentes de cada categoria, multiplicadas pela área dos mesmos ($4\pi r^2$) a cada 100 folículos

contabilizados. Todos os parâmetros coletados para esta finalidade foram de folículos considerados normais.

Foram observadas também características como presença ou ausência, e tipo do suprimento vascular para o tecido enxertado, processo hemodinâmico evidente, sinais de infecção ou inflamação, e luteinização (Apêndice D).

3.7. Parâmetros de avaliação

Os folículos ovarianos visualizados foram classificados morfologicamente de acordo com PEDERSEN & PETERS (1968).

Os folículos também foram classificados qualitativamente em normais ou degenerados de acordo com ISRAELY et al. (2003).

A classificação para citologia vaginal foi baseada nos critérios estabelecidos por LONG & EVANS (1922) e COOPER et al. (1993).

3.8. Análise estatística

Os dados relativos ao procedimento cirúrgico, morfologia do rim e tecido enxertado, e área folicular total foram expressos descritivamente.

As proporções entre os diferentes folículos ovarianos (normais e atrésicos) em função do tempo de enxerto foram comparados pelo teste de qui-quadrado ($p<0,05$). Os diâmetros nuclear, oocitário e folicular foram comparados entre as categorias foliculares por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$) utilizando o programa GraphPad InStat (versão 3.06).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Procedimento cirúrgico

Nos estudos realizados sobre auto-enxerto ovariano, a rata é o animal mais utilizado para comparação de resultados morfológicos e por este fato, foi a espécie escolhida para a realização do presente trabalho. Apresenta ciclo estral que se completa num período de quatro a cinco dias, ideal para estudar a recuperação da função ovariana em um período curto de avaliação pós-cirúrgica (GUYTON & HALL, 1997). Além disso, a mesma apresenta-se como animal de fácil manuseio, obtenção e manutenção.

Optou-se pela técnica de enxerto ovariano como forma de cultivo *in vivo* de folículos por essa ser realizada com sucesso em roedores. Além disso, já foi reportado na literatura o desenvolvimento satisfatório de folículos primordiais humanos quando transplantados para camundongas imunossuprimidas (OKTAY et al., 1998) e o nascimento de ratos e camundongos após fertilização *in vitro* de oócitos viáveis obtidos após xeno-enxerto realizado sob a cápsula renal (CARROL et al., 1990; WATERHOUSE et al., 2004).

Como sítio receptor escolheu-se a região subcapsular do rim por vários motivos dentre eles: a mesma origem embriológica do trato reprodutivo e o fato deste, poder proporcionar um suporte vascular adequado ao tecido enxertado, já que os rins recebem aproximadamente 20 a 25% do débito cardíaco, a despeito do fato desses órgãos representarem menos de 1% do peso total do corpo, resultando numa velocidade e intensidade de fluxo sanguíneo maior que àquela presente em órgãos como cérebro, fígado e coração (CHRISTIE & BJORLING, 1998).

A viabilidade folicular observada no presente estudo corroborou com o sucesso obtido por CORLETA et al. (1998). Esses autores referenciam que a realização do enxerto utilizando fragmentos de tecido ovariano garante uma maior viabilidade folicular quando comparada àquela realizada com o órgão inteiro.

O tempo médio das intervenções cirúrgicas foi de 24 minutos, incluindo-se neste período, a execução das ovariosalpingectomias, seleção e fragmentação do tecido a ser enxertado, inserção do enxerto sob a cápsula renal, diérese e sutura dos planos cirúrgicos. O tempo desses procedimentos consta da tabela 2.

Os resultados obtidos foram considerados excelentes, por tratar-se de uma técnica de metodologias cirúrgicas ainda não conhecidas, e que teve que ser aperfeiçoada ao longo do experimento. Esses tempos foram diminuídos à medida que se praticavam os procedimentos e a equipe adquiria entrosamento.

As ovariosalpingectomias e a inserção do enxerto foram de fácil execução em todos os animais, sendo o excesso de gordura abdominal a principal dificuldade encontrada.

O instrumental cirúrgico escolhido também foi considerado adequado oferecendo precisão de movimentos e manobras cirúrgicas necessários à execução das técnicas sem causar injúrias ou lesões aos órgãos manipulados.

Tabela 2 - Tempo médio, mínimo e máximo da latência anestésica e dos procedimentos cirúrgicos realizados em ratas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

	TEMPO DOS PROCEDIMENTOS (minutos)			
	LATÊNCIA ANESTÉSICA	**OVARIOSSALPING.**	**INSERÇÃO DO ENXERTO**	**TEMPO TOTAL**
MÉDIA	3,35	6,25	1,26	24,12
MÍNIMO-MÁXIMO	0,0–9,0	2,28– 20,5	0,15–5,27	11,5–42,11

Quanto ao protocolo anestésico, tem-se dado preferência à associação xilazina-ketamina devido à abolição do efeito depressor profundo provocado pela xilazina, bem como a abolição da catatonia que a ketamina produz.

O tempo médio de latência anestésica observado foi de 3,35 minutos após administração intramuscular sendo considerado adequado quando comparado às informações disponíveis na literatura (SPINOSA & GÓRNIAK, 1999). Segundo esses autores, a xilazina tem uma intensidade e duração dos efeitos dose-dependente, mas que de modo geral, seu efeito perdura por 30 a 60 minutos; dados estes comprovados e que foram suficientes à execução dos procedimentos cirúrgicos preconizados nesse trabalho.

O grau de analgesia obtido durante os procedimentos foi de bom a excelente em 80% (48/60) dos casos permitindo a realização dos procedimentos cirúrgicos com tranqüilidade e segurança necessários. Em 20% (12/60) dos animais observou-se dispnéia no transcirúrgico; nesses casos o grau de analgesia obtido foi de ruim a regular necessitando de 0,3 sobredoses anestésicas (3 mg/kg de cloridrato de xilazina e 21 mg/kg de cloridrato de ketamina) em média por animal, sendo a técnica exeqüível, após ajuste da dose. Esses últimos apresentavam excesso de tecido adiposo na cavidade abdominal. Esta pode ser a causa para o não aprofundamento do plano cirúrgico, devido à redistribuição nos compartimentos de gordura que ocorre em decorrência da alta lipossolubilidade da ketamina (FANTONI et al., 1999).

Houve cinco óbitos nas primeiras 24 horas de pós-cirúrgico, sendo dois animais pertencentes ao grupo 2S, dois ao grupo 1S e um ao grupo 24H. A causa da morte desses animais não pôde ser determinada, e os mesmos não foram utilizados para fins de avaliação morfológica e histopatológica.

4.2. Análise morfológica

Todos os parâmetros morfológicos observados foram compatíveis com os achados em tecidos normais.

Tabela 3 – Análise morfológica realizada durante a colheita do material quanto à facilidade de localização e migração do enxerto, neovascularização e infecção visível nos diferentes grupos experimentais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

GRUPO	PARÂMETRO AVALIADO							
	FÁCIL LOCALIZAÇÃO		MIGRAÇÃO DO ENXERTO		NEOVASCULARIZAÇÃO		INFECÇÃO	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
24H (n=9)	9	0	0	9	0	9	0	9
72H (n=10)	8	2	1	9	8	2	0	10
1S (n=8)	7	1	0	8	8	0	0	8
2S (n=8)	7	1	1	7	8	0	1	7
3S (n=10)	9	1	3	7	9	1	0	10
4S (n=10)	9	1	3	7	10	0	0	10
TOTAL (n=55)	49	6	8	47	43	12	1	54
TOTAL (100%)	89	11	14	86	78	22	2	98

24H: grupo que teve o enxerto removido após 24 horas; 72H: após 72 horas; 1S: após uma semana; 2S: após dois semanas; 3S: após três semanas e 4S: após quatro semanas.

Todos os fragmentos ovarianos foram enxertados sob a cápsula renal, na borda cranial do rim direito. Considerou-se caso de migração, quando o tecido enxertado foi localizado fora deste posicionamento. Houve migração do enxerto em 14% (8/55) dos casos. Porém, mesmo havendo migração de alguns, na maioria dos casos, cerca de 89% deles (49/55), foi fácil localizar o tecido enxertado.

Com isso, o rim, na qualidade de tecido receptor, demonstrou possuir todas as características esperadas de um bom sítio receptor; pois, ofereceu todas as condições necessárias ao desenvolvimento do fragmento ovariano, demonstrou facilidade para localização e baixa taxa de migração do tecido enxertado. O suprimento vascular oferecido pelo sítio receptor ao enxerto foi rapidamente restabelecido e, portanto considerado satisfatório.

Em 2% (1/55) dos casos houve sinais de infecção ao redor do ponto de sutura realizada no pedículo ovariano que aderiu à borda caudal do rim direito. A incidência de infecção, em feridas cirúrgicas e órgãos internos manipulados

durante os procedimentos cirúrgicos, é de aproximadamente 5% (ROSIN et al., 1998). A baixa porcentagem de animais acometidos por infecção indica que este experimento foi executado dentro dos padrões aceitáveis estabelecidos pela literatura; podendo assim, inferir-se que as técnicas de cuidado na manipulação cirúrgica de tecidos expostos foram criteriosamente seguidas.

Tabela 4 – Análise morfológica realizada durante a colheita do material quanto à alteração no rim, rejeição do enxerto e morfologia uterina nos diferentes grupos experimentais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

GRUPO	PARÂMETRO AVALIADO						
	ALTERAÇÃO NO RIM		REJEIÇÃO DO ENXERTO		MORFOLOGIA UTERINA		
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	DIMIN.	NORMAL	AUMENT.
24H (n=9)	3	6	0	9	0	9	0
72H (n=10)	0	10	0	10	1	9	0
1S (n=8)	0	8	0	8	0	6	2
2S (n=8)	0	8	0	8	2	6	0
3S (n=10)	0	10	0	10	0	10	0
4S (n=10)	0	10	0	10	1	9	0
TOTAL (n=55)	3	52	0	55	4	49	2
TOTAL (100%)	5	95	0	100	7	89	4

Idem legenda tabela 3.

Não houve rejeição do tecido enxertado em nenhum dos animais (0/55). A análise morfológica realizada macroscopicamente no rim revelou que 33% (3/9) dos animais do grupo 24H evidenciaram sinais de sangramento subcapsular devido à manipulação cirúrgica ainda recente desse órgão. Entretanto em 94% (3/55), ou seja, na maioria dos animais avaliados durante o experimento, não houve quaisquer alterações. As lesões ao parênquima renal em decorrência de um traumatismo contuso podem variar desde um sangramento subcapsular pequeno, acompanhado de hematúria, até a fragmentação deste órgão, em que pode ocorrer a morte do indivíduo em decorrência da exsanguinação, choque hemorrágico, ou insuficiência renal aguda (CHRISTIE & BJORLING, 1998). Esses resultados demonstram que o tecido renal possui uma boa capacidade de

recuperação e que os procedimentos cirúrgicos realizados foram pouco traumáticos.

A morfologia uterina, no momento da colheita do material, foi considerada normal em 89% (49/55) das ratas, demonstrando que os padrões estabelecidos para esta espécie foram mantidos após o enxerto de tecido ovariano e que houve atividade hormonal adequada. Considerou-se que a morfologia uterina estava diminuída quando a vascularização na camada serosa do útero não era facilmente visualizada e o diâmetro dos cornos uterinos apresentava-se menor que o normal para a espécie; e consequentemente observou-se uma morfologia aumentada quando a vascularização uterina era facilmente observada e o diâmetro dos cornos estava maior que o fisiológico para a espécie em questão.

Todos os animais foram submetidos ao estudo da citologia vaginal para descrição da fase do ciclo estral, após a colheita da peça cirúrgica (enxerto sob a cápsula renal). Os resultados obtidos para cada fase do ciclo estral em função do tempo de enxertia estão expostos na figura 4.

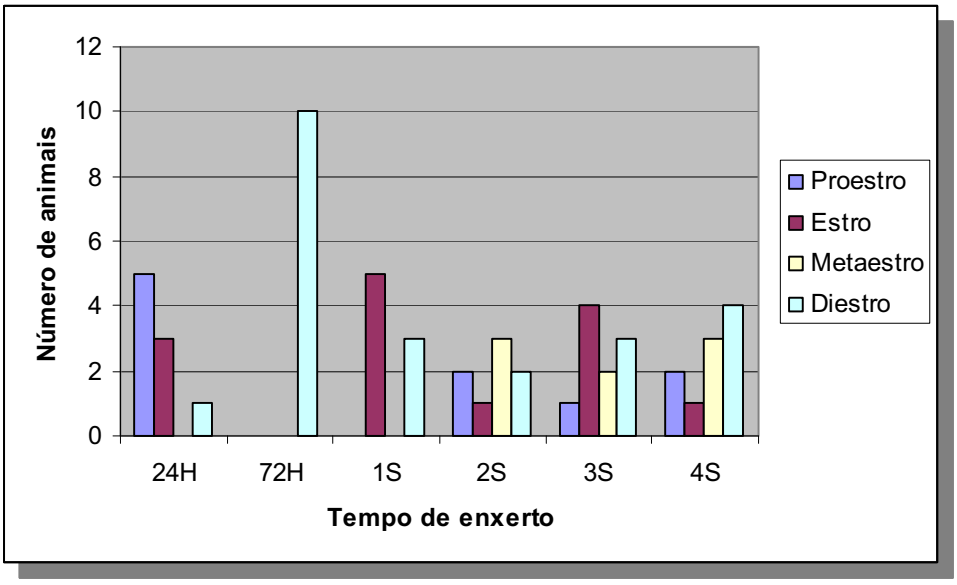

Figura 4 - Histograma da fase do ciclo estral em função do tempo de enxerto ovariano em ratas.

Os esfregaços foram avaliados a fresco, sem coloração, e conduzidos sob aumento de 40X, para observação das características celulares, de acordo com o ciclo ovariano, tomando por base os estudos publicados por COOPER et al. (1993) em cobaias, e por LONG & EVANS (1922) em ratas. Esses autores observaram que a relação entre o estrogênio ovariano e a citologia vaginal, em ratas, é representada por um ciclo ovariano com duração média de quatro dias, dividido em três fases distintas: a. diestro - caracteriza-se por concentrações baixas de estrogênio e esfregaços vaginais com predomínio de leucócitos e algumas células epiteliais corneificadas em permeio; esta fase é considerada como pré-ovulatória; b. proestro - há um aumento da concentração do estradiol, e no esfregaço vaginal, predominam células polimorfonucleadas, dispersadas ou acumuladas; esta é a fase em que ocorre a ovulação; c. estro - há queda dos níveis de estradiol e predomínio de células epiteliais, escamosas corneificadas; esta é a fase pós-ovulatória.

A citologia vaginal realizada às 24 horas revelou que havia uma distribuição variável entre as diferentes fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro). Às 72 horas, observou-se que todos os animais encontravam-se em diestro. Considerando-se que a duração do ciclo estral da rata seja de quatro a cinco dias, e que neste período apenas alguns animais demonstraram neovascularização do enxerto, ou seja, ainda não estando concluído o período de isquemia – reperfusão, o organismo ainda não havia detectado atividade hormonal cíclica proveniente do tecido recém-enxertado. Contudo, a partir de uma semana todos os animais demonstraram neovascularização ao exame histopatológico, o que justifica o padrão de citologia vaginal encontrado, com distribuição variável entre as fases do ciclo estral semelhante àquele observado às 24 horas.

Todos os animais apresentaram completa cicatrização de pele, subcutâneo e musculatura abdominal após uma semana de procedimento cirúrgico e os achados morfológicos revelaram que houve um retorno rápido e espontâneo à ciclicidade após enxerto do fragmento ovariano sob a cápsula renal.

4.3. Análise histopatológica

4.3.1. Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais

Procedendo-se a leitura das lâminas dos ovários enxertados sob a cápsula renal os folículos pré-antrais foram classificados em primordial (Figura 5.A e 6.A), transição (Figura 5.A, 5.B e 6.A), primário (Figura 5.C) e secundário (Figura 5.D e 6.A).

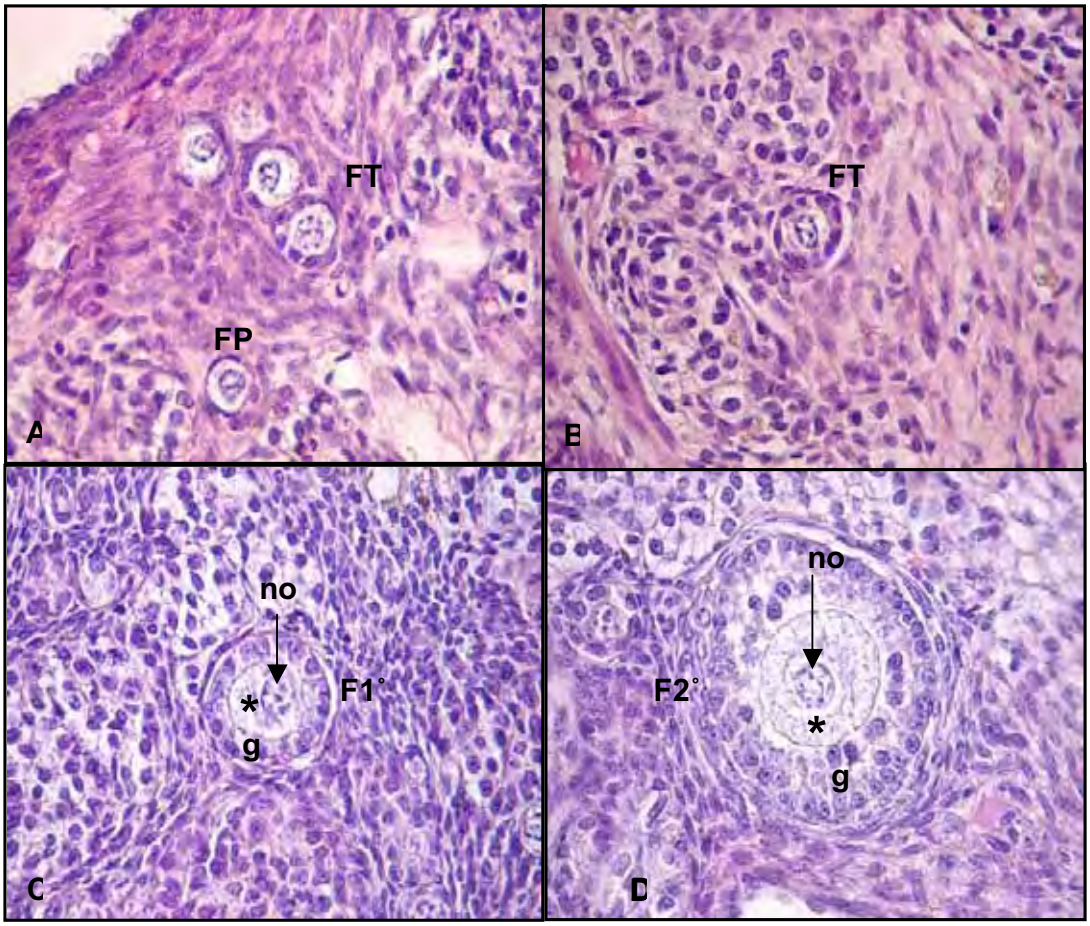

Figura 5 - Fotomicrografia de ovário de rata (região cortical): **A**. Folículo primordial (FP) e folículos de transição (FT); **B**. Folículos de transição (FT); **C**. Folículo primário; **D**. Folículo secundário. Núcleo do oócito (no), oócito (*) e células da granulosa (g). HE, 40x.

E os folículos antrais foram classificados em antral inicial (Figura 6.B), antral (Figura 6.C) e pré-ovulatório (Figura 6.D).

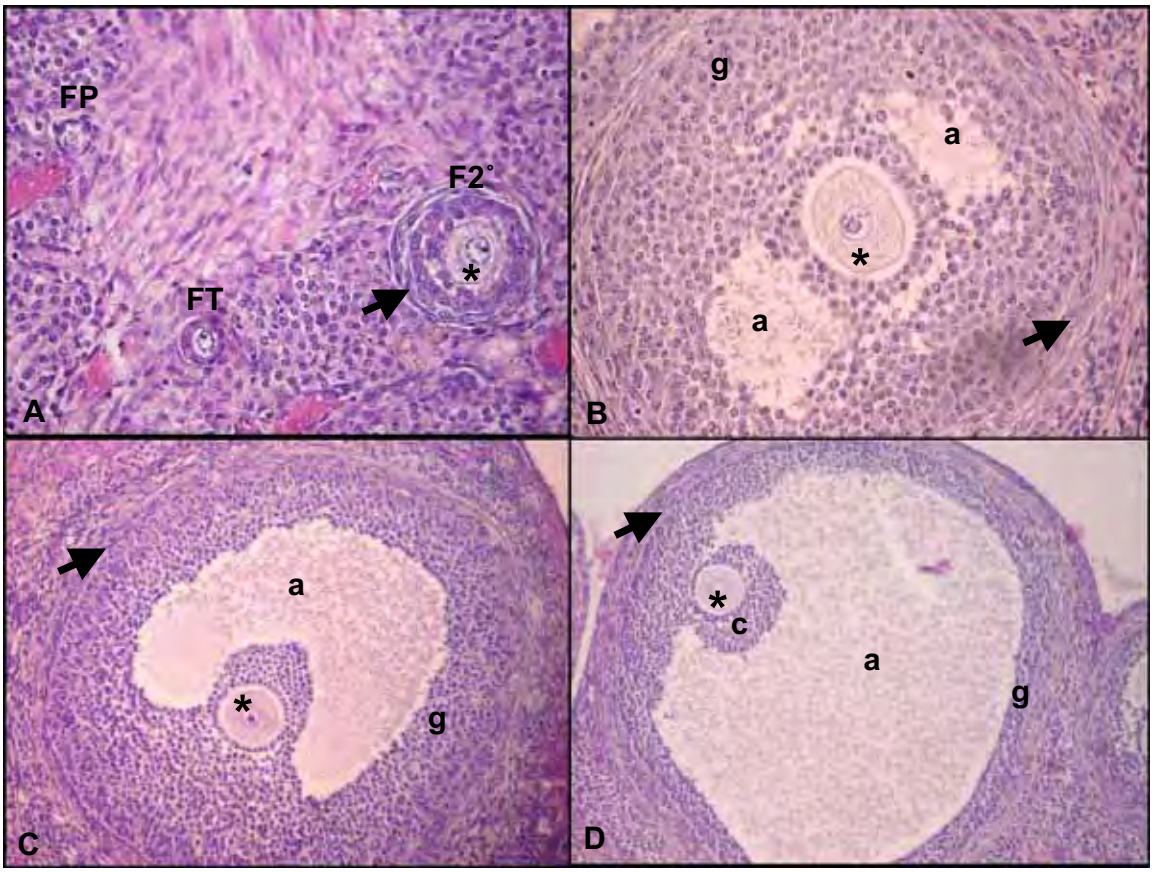

Figura 6 - Fotomicrografia de ovário de rata (região cortical): **A**. Folículos pré-antrais: primordial (FP), de transição (FT), e secundário (F2˚). HE, 20x; **B**. Folículo antral inicial com duas pequenas cavidades antrais em formação. HE, 20x; **C**. Folículo antral contendo um único antro. HE, 20x; **D**. Folículo pré-ovulatório com antro repleto de fluido folicular e células do *cumulus oophorus* circundando o oócito. HE, 10x. Células da Teca (seta preta), oócito (*), antro (a), células da granulosa (g), células do *cumulus oophorus* (c).

Essas duas classificações seguiram os padrões morfológicos estabelecidos por PEDERSEN & PETERS (1968) e foram realizadas tanto nos fragmentos ovarianos enxertados quanto naqueles ovários inteiros removidos após ovariosalpingectomia.

Morfologicamente, não foram constatadas diferenças entre àqueles folículos presentes no ovário de rata enxertado sob a cápsula renal e no órgão *in situ*. Este fato comprovou que o rim além de permitir um desenvolvimento folicular satisfatório, não restringe o processo de crescimento folicular, principalmente das categorias antrais, que acabam por ocupar uma área considerável de parênquima.

As características morfológicas para classificação qualitativa dos folículos em atrésicos (picnose nuclear das células da granulosa e sinais de degeneração do oócito, como condensação de sua cromatina), estabelecidas por ISRAELY et al. (2003), foram adequadas ao sistema de avaliação histopatológica adotado neste estudo, permitindo a visualização de folículos em diferentes graus de atresia. Porém, este tipo de caracterização não foi objeto desse estudo.

Os folículos que não apresentaram quaisquer sinais de atresia foram classificados em normais dentre as categorias estabelecidas por PEDERSEN & PETERS (1968). Todas as características preconizadas por esses autores foram observadas durante o processo de avaliação preconizado nesse estudo, indicando que não houve alteração morfológica dos folículos em desenvolvimento no enxerto.

4.3.2. Morfometria dos folículos pré-antrais e antrais

Com o objetivo de conhecer se o desenvolvimento folicular das ratas foi comprometido pela execução da técnica de auto-enxerto realizada sob a cápsula renal foram aferidos 100 unidades dos folículos primordiais, transição, primário, secundário e antral inicial, além de todos os folículos antrais (n=70) e pré-ovulatórios (n=22) contabilizados, obtendo-se a média e os valores máximos e mínimos dos parâmetros aferidos (µm) (Tabelas 5 e 6).

Os resultados desta análise morfométrica revelaram uma progressão de todos os diâmetros aferidos em conformidade com o estágio de desenvolvimento folicular. A avaliação do parâmetro núcleo do oócito demonstrou diferença estatística a partir da categoria de folículo secundário. Enquanto que, para os

parâmetros do oócito e folículo, as diferenças foram observadas a partir do folículo primário.

Os resultados obtidos a partir dessa avaliação não puderam ser comparados aos da literatura devido à escassez de informações publicadas a respeito da morfometria folicular em ratas, podendo-se apenas inferir que não há restrições ao desenvolvimento e crescimento foliculares quando o tecido ovariano é enxertado heterotopicamente sob a cápsula renal.

Tabela 5 - Média e limites mínimo e máximo dos diâmetros (µm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos pré-antrais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

Parâmetro	Diâmetro (µm)			
	Primordial	**Transição**	**Primário**	**Secundário**
Núcleo do Oócito	11,29[a] (7,2-14,4)	11,00 [a] (8,4-14,4)	12,29 [a] (8,4-19,2)	19,02 [b] (10,8-26,4)
Oócito	16,09 [a] (12-22,8)	17,65 [a] (12-31,2)	24,34[b] (15,6-42)	45,19[c] (24-72)
Folículo	25,69 [a] (15,6-38,4)	31,71[a] (21,6-54)	51,77 [b] (30-90)	129,25 [c] (56,4-276)
n =	100	100	100	100

a, b, c, d: letras diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes, ANOVA, Kruskal-Wallis ($p<0,05$).

Tabela 6 - Média e limites mínimo e máximo dos diâmetros (µm) nuclear oocitário, oocitário e folicular nas diferentes categorias de folículos antrais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

Parâmetro	Diâmetro (µm)		
	Antral Inicial	Antral	Pré-Ovulatório
Núcleo do Oócito	21,31[b] (14,4-28,8)	21,39[b,c] (16,8-26,4)	29,55[c] (26-32,5)
Oócito	52,80[c,d] (36-72)	61,23[d] (38,4-93,6)	85,39[d] (65-104)
Folículo	176,93[c] (98,4-492)	356,52[d] (156-783,6)	1122,73[d] (679,25-1446,2)
n =	100	70	22

Idem legenda tabela 5.

4.3.3. Avaliação quantitativa e qualitativa dos folículos pré-antrais e antrais

Os dados obtidos a partir da contagem dos folículos normais (Tabela 7) e atrésicos (Tabela 8) encontrados nos ovários enxertados sob a cápsula renal foram convertidos em proporções de folículos em função do tempo de enxerto.

Pode-se observar analisando os dados referentes a esta avaliação que as alterações nas proporções de folículos normais e atrésicos em função dos diferentes tempos de pós-cirúrgico foram:

24 – 72 h: A maioria das variáveis foliculares estudadas não mostrou alterações significativas neste período devido ao curto espaço de tempo decorrido após o procedimento de enxertia. Nesse período, a nutrição dos folículos provavelmente ainda ocorre pela utilização de suas reservas intracelulares, permanecendo assim até que a reperfusão seja iniciada (D'ACAMPORA et al., 2004). Nesta situação, as categorias foliculares mais afetadas são aquelas de maior exigência em nutrientes, ou seja, a de folículos antrais. Dentre esses, a subcategoria mais numerosa, neste período, foi a de folículos antrais iniciais. Por este motivo, houve uma maior demanda de nutrientes por esse grupo de folículos sem o suprimento

sanguíneo necessário ao seu estágio de desenvolvimento, fazendo com eles fossem os mais afetados.

Tabela 7 - Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos normais em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

Tempo de enxerto	Folículo						
	Primord.	**Trans.**	**Primár.**	**Secund.**	**A.Inicial**	**Antral**	**Pré-ovulat.**
24 H	29,8 ^{a}	55,0 ^{a}	9,1 ^{a}	4,7 ^{a}	1,2 ^{a}	0,2 ^{a}	0 ^{a}
72 H	31,1 ^{a}	52,6 ^{a}	11,0 ^{a}	4,3 ^{a}	0,5 ^{b}	0,5 ^{a,c}	0 ^{a}
1 S	11,0 ^{b}	55,7 ^{a,b}	20,1 ^{b}	5,6 ^{a,b}	1,7 ^{a}	2,2 ^{b,d}	0,6 ^{b,c}
2 S	15,9 ^{c}	58,7 ^{b}	14,8 ^{c}	5,4 ^{a}	3,3 ^{c}	1,1 ^{c}	0,3 ^{b}
3 S	12,9 ^{b}	38,7 ^{c}	20,8 ^{b}	7,2 ^{b,c}	5,6 ^{d}	3,3 ^{d,e}	0,8 ^{c}
4 S	17,9 ^{c}	35,7 ^{c}	17,3 ^{d}	7,5 ^{c}	9,8 ^{e}	3,8 ^{e}	1,0 ^{c}

24H: grupo que teve o enxerto removido após 24 horas; 72H: após 72 horas; 1S: após uma semana; 2S: após dois semanas; 3S: após três semanas e 4S: após quatro semanas.
a, b, c, d, e: letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes pelo Teste κ^2 ($p<0,05$).

Tabela 8 - Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos atrésicos em função do tempo de enxerto (FCAV, Câmpus de Jaboticabal – UNESP / 2007).

Tempo de enxerto	Folículo						
	Primord.	**Trans.**	**Primár.**	**Secund.**	**A.Inicial**	**Antral**	**Pré-ovulat.**
24 H	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}
72 H	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}
1 S	0^{a}	$1,6^{b,c}$	$1,4^{b}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}
2 S	0^{a}	$0,4^{c}$	$0,3^{c}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}
3 S	$2,7^{b}$	$2,2^{b}$	$5,4^{d}$	$0,3^{b}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}
4 S	$1,6^{c}$	$1,0^{a}$	$3,6^{e}$	$0,8^{c}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}

Idem legenda tabela 7.

No período de 24 a 72 horas houve um pequeno aumento de 5% no percentual da área total ocupada por folículos no parênquima ovariano que fora enxertado, provavelmente devido às pequenas alterações observadas nas categorias foliculares.

72 h - Uma semana: Ao final deste período todas as amostras revelaram neovascularização ao exame histopatológico, passando do estágio de isquemia à reperfusão. Foi possível demonstrar em estudos anteriores que houve degeneração de folículos primordiais devido à isquemia (NISOLLE et al., 2000). Os achados deste estudo corroboram com esta informação, pois houve diminuição apenas desta categoria folicular no período de 72 horas a uma semana. Folículos atrésicos de transição e primários, que não existiam no período anterior, surgiram neste intervalo de tempo, sugerindo que estes sejam os tipos foliculares mais sensíveis às variações sofridas no período de isquemia-reperfusão.

O aumento na proporção de folículos primário, antrais iniciais, antrais e pré-ovulatório indicam reinício da atividade ovariana. Isso pode ser justificado pelos resultados obtidos da citologia vaginal, onde às 72 horas todos os animais encontravam-se em diestro, indicando a influência de progestágenos, e uma semana depois, alguns animais (62%) apresentavam citologia vaginal compatível com estro. Sabe-se que as células da granulosa e tecais, presentes em maior número na parede dos folículos antrais, estão envolvidas na produção de substâncias estrogênicas, a partir do colesterol, que quando liberadas na corrente sanguínea conduzem à manifestação de estro (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Baseado nessas informações pode-se inferir que a retomada da atividade ovariana ocorreu após a neovascularização que influenciou o desenvolvimento e crescimento dos folículos antrais, e estes por sua vez, liberaram estrógenos na corrente sanguínea, levando à manifestação do estro nesses animais. Assim, o crescimento desses folículos ocasionou o aumento de 412% na área total ocupada por folículos no parênquima ovariano que foi enxertado sob a cápsula renal.

Uma semana – Duas semanas: A maior proporção de primordiais neste período pode ser devido à enxertia de um maior número desses folículos no ato do procedimento cirúrgico, já que não houve como contabilizar com exatidão o número de folículos contido no fragmento cortical ovariano selecionado e enxertado no momento da cirurgia.

O aumento na proporção de antrais iniciais acompanhado pelo declínio na proporção de primários, normais e atrésicos, indicaram o desenvolvimento de folículos pré-antrais a antrais.

No período em questão, houve uma diminuição na área total ocupada por folículos no parênquima ovariano enxertado em 37%, e uma queda na proporção de folículos antrais, fenômenos estes observados apenas neste período. Isso sugeriu algum grau de sofrimento do tecido enxertado e dos folículos em estágios mais adiantados de desenvolvimento, provavelmente em decorrência do tempo a que esses tecidos foram submetidos à anóxia ou hipóxia, o que pode ter ocasionado o surgimento dessas lesões quando estes foram reoxigenados (ANDRADE et al., 2004). Esse aparente paradoxo pode ser explicado pela formação de radicais livres de oxigênio a partir das primeiras moléculas de oxigênio que chegam ao tecido após o restabelecimento do fluxo sanguíneo (BOGLIOLO et al., 1993).

Duas – Três semanas: Para este período, os resultados demonstram uma estabilização do suprimento sanguíneo, e consequentemente do desenvolvimento folicular. Esse fato ficou evidente ao perceber-se que houve uma diminuição na proporção de folículos primordiais e de transição, acompanhado por um aumento significativo de todas as demais categorias foliculares. Outro fato interessante é que houve aumento na proporção de folículos atrésicos para todas as categorias de pré-antrais, sugerindo uma degeneração folicular em função do desenvolvimento dos folículos a estágios antrais; que também ocorre no ovário *in situ* (HIRSHFIELD, 1988).

Conforme o esperado, a área total ocupada por folículos no parênquima ovariano enxertado voltou a aumentar (123%), após a estabilização da nutrição para o tecido enxertado, garantida pela boa interação estabelecida entre o enxerto e o sítio receptor.

Três – Quatro semanas: O comportamento do tecido ovariano enxertado observado neste período foi semelhante áquele visto no período de uma a duas semanas, sugerindo uma ciclicidade de eventos intra-ovarianos.

Provavelmente houve uma melhoria no suprimento sanguíneo deste período em detrimento do anterior, reduzindo a competição por nutrientes, pois as proporções de folículos pré-antrais atrésicos foi menor. Neste período o aumento da área total ocupada por folículos no parênquima ovariano enxertado foi de 24%.

Normalmente, há uma redução de 30-70% no tamanho do enxerto durante os primeiros dias após o transplante (KIM et al., 2001). Índices semelhantes (37%) foram observados neste estudo apenas no período de uma a duas semanas.

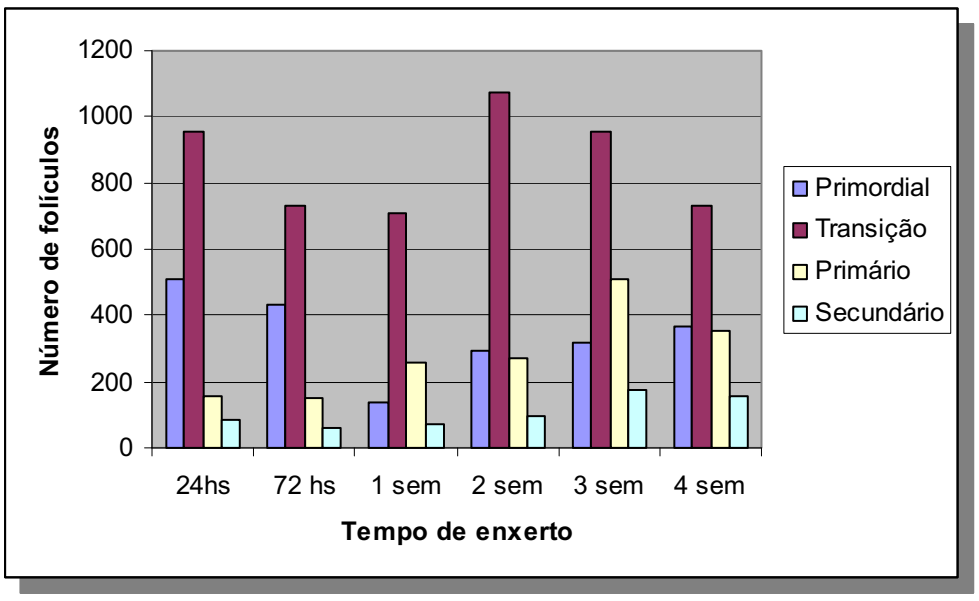

Figura 7 - Histograma do número total de folículos pré-antrais em função do tempo de enxerto ovariano em ratas.

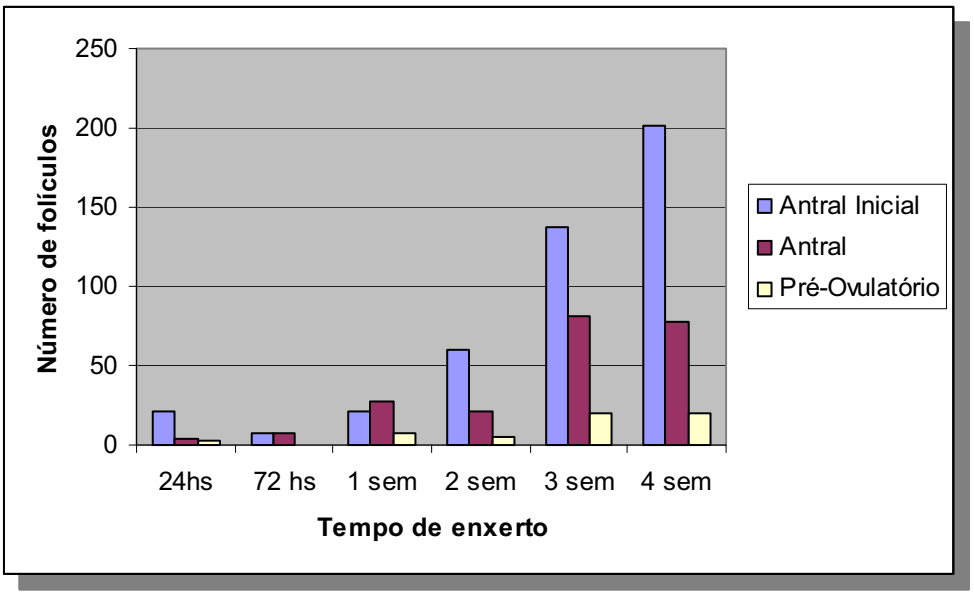

Figura 8 - Histograma do número total de folículos antrais em função do tempo de enxerto ovariano em ratas.

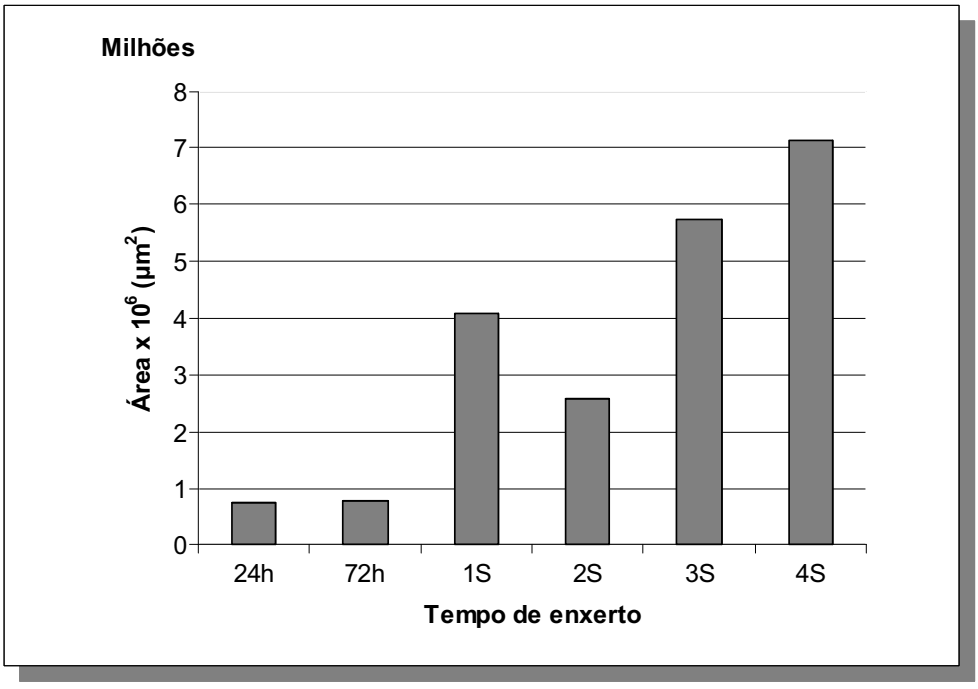

Figura 9 - Histograma da área total ocupada por folículos no parênquima do tecido enxertado (μm^2) em função do tempo de enxerto.

4.3.4. Suprimento vascular para o tecido enxertado

O suprimento vascular oferecido pelo sítio receptor escolhido (sob a cápsula renal) ao tecido enxertado (córtex ovariano) foi considerado igual àquele existente no ovário *in situ* de rata a partir de uma semana após a realização do enxerto. Anteriormente, o tecido ovariano enxertado foi submetido ao período denominado de isquemia – reperfusão, que neste estudo foi compreendido entre 24 horas e uma semana, diferindo dos resultados de ISRAELY et al. (2003), que afirmaram que este período em roedores oscila de 24 a 48 horas. Porém, esta divergência pode ser explicada por diferenças no protocolo escolhido para realização do enxerto; por exemplo, com relação à escolha dos locais para receber os enxertos, pois os tecidos subcutâneo e intramuscular, estudados por estes autores, possuem um tipo de vascularização diferente daquele encontrado sob a cápsula renal, bem como pelo tamanho do fragmento enxertado menor ($0,75mm^3$) que aquele adotado nesse estudo ($1mm^3$), o que pode ter ocasionado uma revascularização mais rápida do primeiro; além disso, as espécies estudadas foram diferentes podendo haver diferenças na concentração de fatores angiogênicos existentes no ovário da camundonga e da rata.

No grupo 24H nenhuma das amostras demonstrou neovascularização macroscopicamente visível nem tampouco, ao exame histopatológico. A neovascularização no enxerto foi macroscopicamente detectável em 78% (43/55) dos casos, sendo possível essa visualização em alguns animais do grupo 72H. Vasos sanguíneos foram visualizados histologicamente em algumas amostras deste grupo, porém esta neovascularização consolidou-se no grupo 1S, no qual todas as amostras avaliadas possuíam desde vênulas até artérias de médio calibre (Figura 10.A). Este mesmo padrão vascular foi observado em todas as amostras dos grupos 2S, 3S e 4S, e é histologicamente semelhante àquele encontrado no ovário *in situ* de rata (Figura 10.B).

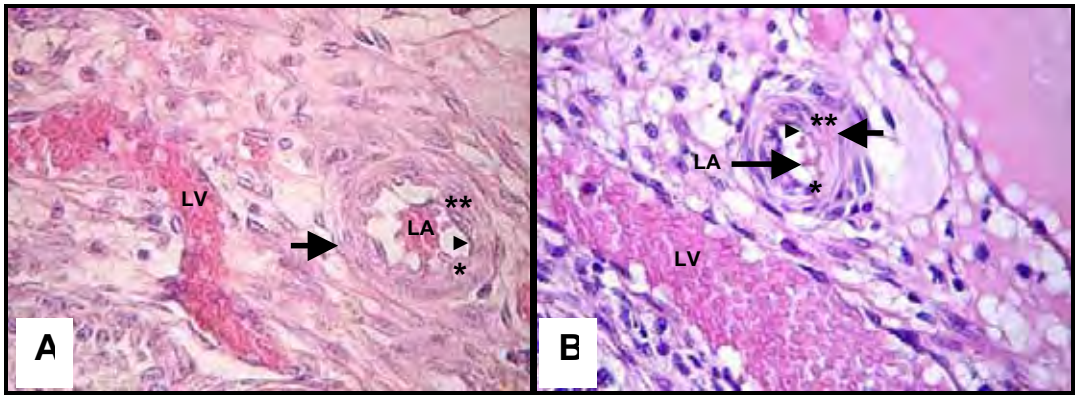

Figura 10 - Fotomicrografias de tecido ovariano **A**. enxertado sob a cápsula renal e obtido após uma semana (Grupo 1S). **B**. rata controle. Notar vênula e seu respectivo lúmen repleto de hemácias (LV); e artéria de médio calibre em corte transversal evidenciando lúmen (LA), membrana elástica interna (*), túnica íntima (▸), média (**) e adventícia (seta preta). HE, 40x.

4.3.5. Luteinização

No presente estudo, corpos lúteos puderam ser observados 72 horas após o procedimento cirúrgico de inserção do tecido ovariano sob a cápsula renal em 10% (1/10) dos animais. Uma semana após a realização do enxerto, 38% (3/8) dos animais evidenciaram corpos lúteos de diversos tamanhos ao exame histopatológico. E a partir de duas semanas todas as amostras continham essa estrutura (Figura 11). Resultados semelhantes foram observados por D'ACAMPORA et al., (2004). Isso pode ser explicado pela ciclicidade e estabilização do suprimento sanguíneo atingidas após uma semana, provavelmente devido ao desenvolvimento dos folículos que podem ter atingido o tamanho propício à ovulação (HURD, 1998).

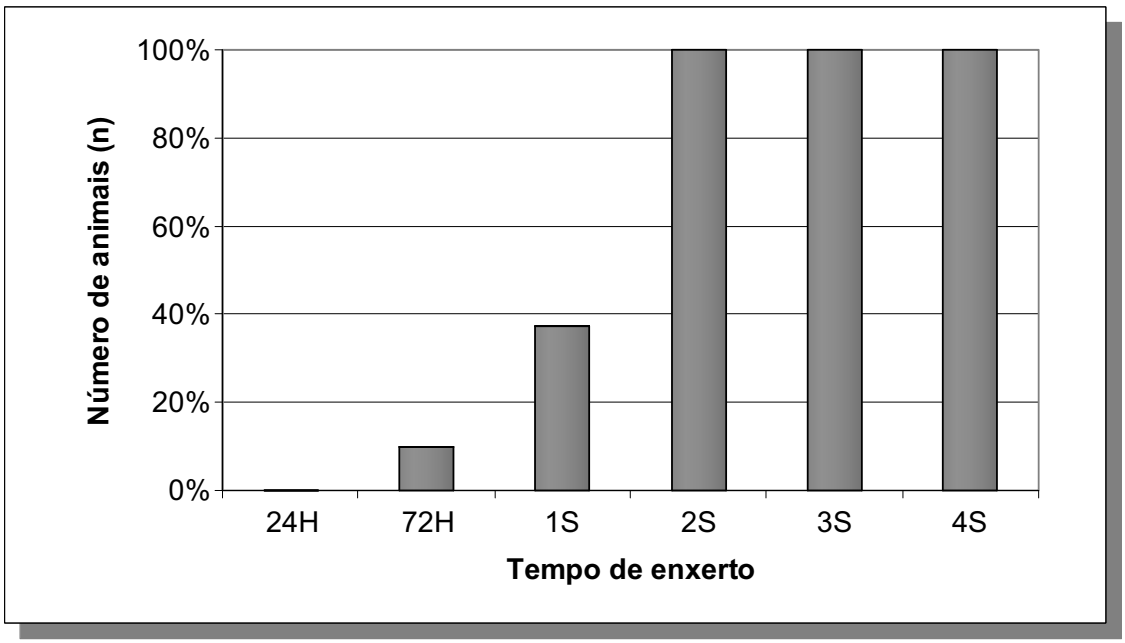

Figura 11 - Histograma da presença de corpo lúteo (%) em função do tempo em animais enxertados.

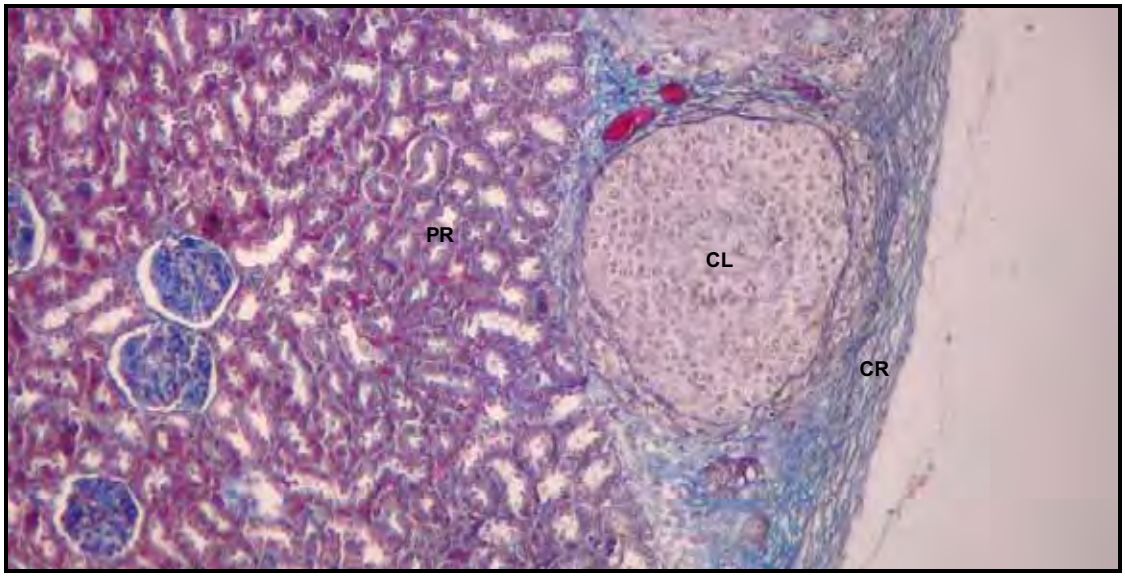

Figura 12 - Fotomicrografia de ovário enxertado sob a cápsula renal de rata após uma semana. Notar corpo lúteo (CL), cápsula renal (CR) e parênquima renal (PR). TM, 10x.

4.3.6. Parênquima renal

Não foram verificados danos ao parênquima renal em nenhum dos tempos de pós-cirúrgico avaliados (Figura 13). Houve uma interação satisfatória entre os tecidos, receptor e enxertado, visualizada macroscopicamente e comprovada ao exame histopatológico. Porém, alterações subcapsulares, como o acúmulo de hemácias, foram visualizadas macroscopicamente em alguns animais do grupo das 24 horas (Figura 14.A), e histopatologicamente até 72 horas depois (Figura 14.B), provavelmente em decorrência do procedimento cirúrgico ainda recente. Essas alterações desapareceram por completo, havendo uma proliferação das células presentes na cápsula renal com total separação entre os tecidos, após uma semana (Figura 14.C) assim permanecendo nos demais períodos avaliados (Figura 14.D); evidenciando que os tecidos recuperaram-se rapidamente dos procedimentos cirúrgicos a eles impostos, com preservação de suas respectivas funções.

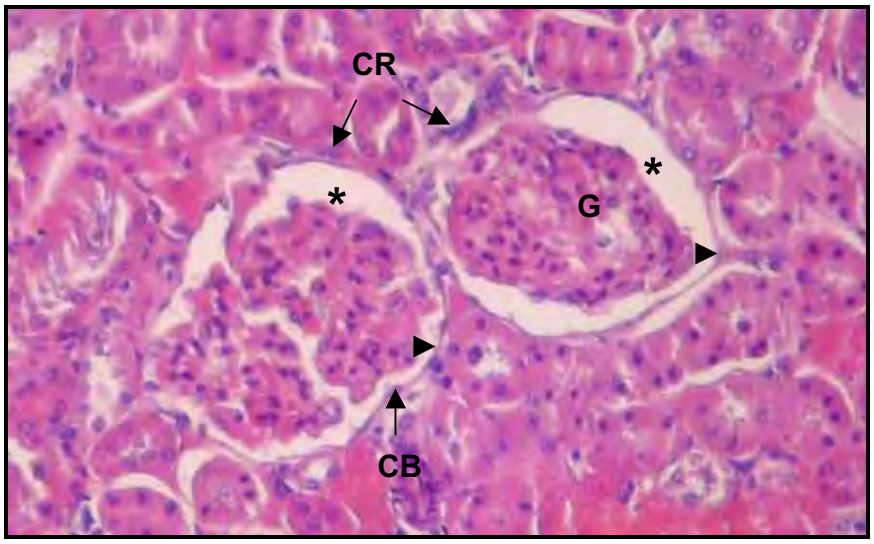

Figura 13 - Fotomicrografia da região cortical do parênquima renal de rata após quatro semanas de enxerto sob a cápsula renal. Dois corpúsculos renais (CR) são visualizados com folhetos interno (►) e externo da cápsula de Bowman (CB) e glomérulo (G). Notar espaço capsular (*). HE, 40x.

Pôde-se observar também que o tecido renal proporcionou ao fragmento ovariano enxertado, uma vascularização semelhante àquela existente no ovário *in situ* neste mesmo período (1S), resultando numa perda folicular que variou de zero a 5,4%. Esse valor foi inferior aos reportados em 1983 por FELICIO et al. (50%), e BAIRD et al. (1999) que obtiveram uma sobrevivência de apenas 35% dos folículos enxertados sob a cápsula renal. Isso indica que o rim proporciona o desenvolvimento adequado ao tecido enxertado e folículos nele contidos, sem sofrer lesões ou comprometer suas funções.

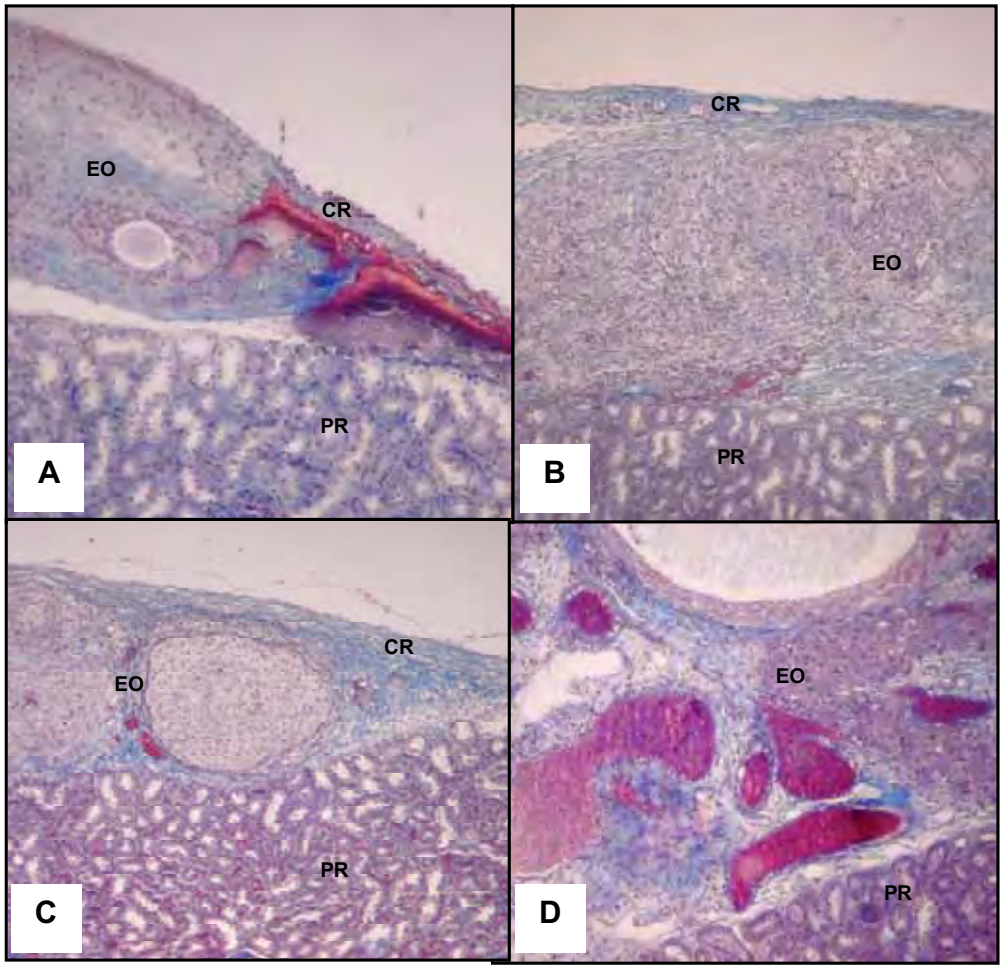

Figura 14 - Fotomicrografia da região cortical do parênquima renal de rata, **A**. após 24 horas, **B**. 72 horas, **C**. uma semana, TM, 10x, e **D**. quatro semanas de enxerto sob a cápsula renal, TM, 20x. Notar cápsula renal (CR), parênquima renal (PR), enxerto ovariano (EO).

5. CONCLUSÕES

A análise conjunta dos achados desta investigação permitiu inferir as seguintes conclusões:

1. A técnica executada não promoveu alterações que comprometessem a viabilidade dos órgãos avaliados, havendo manutenção das funções desses e desenvolvimento folicular adequado.
2. O auto-enxerto de tecido ovariano sob a cápsula renal de ratas é exeqüível do ponto de vista cirúrgico.
3. O cultivo folicular *in vivo* pelo auto-enxerto de tecido ovariano sob a cápsula renal de ratas é uma técnica viável.

6. REFERÊNCIAS[6]

ALBERTI, L. R.; VASCONCELLOS, L. S.; BARBOSA, J. F.; PETROIANU, A. Implante autólogo ovariano no omento maior – Estudo Experimental. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, n. 24, v. 3, p. 187-192, 2002.

ANDRADE, E. R.; SILVA, L. D. M.; MORAES, M. O.; SENEDA, M. M.; TONIOLLI, R. Cultivo *in vivo* de folículos pré-antrais - Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 2, p. 67-72, 2004.

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

BAIRD, D. T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; HARKNESS, L. M.; GOSDEN, R. G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at – 196 ° C. **Endocrinology**, v. 140, p. 462-471, 1999.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976. 256 p.

BOGLIOLO, G. B. G.; PEREIRA, F. E. L.; VITELA, J. E. H.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. Degenerações. In: BRASILEIRO, G. F.; PEREIRA, F. E. L.; PITTELA, J. E. H.; BAMBIRRA, E. A.; BARBOSA, A. J. A. **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 51-59.

BRITO, N. M. B.; TORRES, I. O.; SILVEIRA, E. L.; SANTOS, L. L. T. Estudo da viabilidade do enxerto de ovário na bolsa omental de ratos utilizando Ciclosporina A. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 174- 179, 2005.

[6] ABNT NBR 6023, Ago / 2002.

CAMBONI, A.; MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M.; MACCHIARELLI, G.; DONNEZ, J.; NOTTOLA, S. A. Contribution of transmission electron microscopy to the study of human ovarian tissue integrity after enzymatic isolation, cryopreservation or xenografting. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. S104, suppl. 1, 2005.

CAMPBELL, B. K.; TELFER, E. E.; WEBB, R.; BAIRD, D. T. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 131-139, 2000.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFERT, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321–327, 1990.

CECCONI, S. Growth and differentiation of small ovarian follicles in mammals: problems and future perspectives. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 5, p. 431-445, 2002.

CESCHIN, A. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; THOMAZ, B. A. C.; TOTSUGUI, J. Avaliação hormonal indireta e estudo da preservação folicular em tecido ovariano autólogo transplantado para região inguinal em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 27-30, 2004.

CHA, K.Y.; KOO, J. J.; KO, J. J.; CHOI, D. H.; HAN, S. Y.; YOON, T. K. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 109-113, 1991.

CHRISTIE, B. A.; BJORLING, D. E. Rins. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. v. 2. São Paulo: Manole, 1998. p. 1698-1713.

COOPER, R. I.; GOLDMAN, J. M.; VANDENBERGH, J. G. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In: **Female Reproductive Toxicology, Methods in Toxicology**, v. 3, Part B, HEINDEL, J. J.; CHAPIN, R. E. (eds), Capítulo 4. San Diego: Academic Press, 1993. p. 45–55.

CORLETA, H. E.; CORLETA, O.; CAPP, E.; EDELWEISS, M. I. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 1, p. 16-19, 1998.

D'ACAMPORA, A. J.; TRAMONTE, R.; MANOEL, F. S.; SCHMIDT, R. R.; MULLER, C. T.; TOGNOLI E SILVA, H.; OLIVEIRA, A.; RAYMUNDI, S. D. Análise histológica da viabilidade do transplante autólogo de hemi-ovário em retroperitônio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 360-369, 2004.

DANDEKAR, P.V.; MARTIN, M.C.; GLASS, R.H. Maturation of immature oocytes by co-culture with granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 95–99, 1991.

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIREL, M. T.; GUERIN, J. F.; FRANCK, M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, v. 60, p. 999–1010, 2003.

DISSEN, G. A.; LARA, E. H.; FAHRENBACH, W. H.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**, v. 134, p. 1146-1154, 1994.

DISSEN, G. A.; HIRSHFIELD, A. N.; MALAMED, S.; OJEDA, S. R. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 136, p. 4681–4692, 1995.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The lancet**, v. 16, p. 1405–1410, 2004.

DONNEZ, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; JADOUL, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEMYLLE, D.; DOLMANS, M. M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 519-535, 2006.

EPPIG, J.J. & O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, p.197–207, 1996.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.; BERNARDI, M. M. In: Anestésicos intravenosos e outros parenterais. SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 114-124.

FELICIO, L. S.; NELSON, J. F.; GOSDEN, R. G.; FINCH, C. E. Restoration of ovulatory cycles by young ovarian grafts in aging mice: potentiation by long-term ovariectomy decreases with age. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 6076-6080, 1983.

FORTUNE, J. E.; CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; KITO, S. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 53-60, 2000.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 433-442, 1987.

GRAPHPAD INSTAT, GraphPad Software. Inc., Windows, 32 bits, 2003. v. 3.06.

GUNASENA, K. T.; LAKEY, J. R. T.; VILLINES, P. M.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 226-231, 1997.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: _____ . **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 69-82.

HIRSHFIELD, A. N.; REES MIDGLEY JR, A. Morphometric analysis of follicular development in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 597-605, 1978.

HIRSHFIELD, A. N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1181-1188, 1988.

HOLMBERG, D. Métodos cirúrgicos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. v. 1. São Paulo: Manole, 1998. p. 143-322.

HURD, W. Menopausa. In: BEREK, J. S.; ADASHI, E. Y.; HILLARD, P. A. **Novak – Tratado de Ginecologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 696-716.

INGRAM, D. C. Ovulation and atresia. In: WEIR, B. J; ROWLANDS, I. W. **The ovary**. 2. ed. New York: Academic Press, v. 1, cap. 6, p. 265-301, 1977.

ISRAELY, T.; DAFNI, H.; GRANOT, D.; NEVO, N.; TSAFRIRI, A.; NEEMAN, M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 2055-2064, 2003.

KIM, S. S.; RADFORD, J.; HARRIS, M.; VARLEY, J.; RUTHERFORD, A. J.; LIEBERMAN, B.; SHALET, S.; GOSDEN, R. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. **Human Reproduction**, v. 16, p. 2056-2060, 2001.

KNAUER, E. Einige versuche uber ovarientransplantation bei kaninchen. **Zentralblatt Gynäkologe**, v. 20, p. 524–528, 1896.

LAROUSSE ESCOLAR DA LÍNGUA PORTUGUESA. 1. ed. São Paulo: Larousse do Brasil, 2004. p. 288, p. 752.

LEE, D. M.; YEOMAN, R. R.; BATTAGLIA, D. E.; STOUFFER, R. L.; ZELINSKI-WOOTEN, B.; FANTON, J. W.; WOLF, D. P. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**, v. 428, p. 137–138, 2004.

LEE, C. H.; XUE, H.; SUTCLIFFE, M.; GOUT, P. W.; HUNTSMAN, D. G.; MILLER, D. M.; GILKS, C. B.; WANG, Y. Z. Establishment of subrenal capsule xenografts of primary human ovarian tumors in SCID mice: potential models. **Gynecologic Oncology**, v. 96, p. 48-55, 2005.

LINTERN-MOORE, S.; EVERITT, A. V. The effect of restricted food intake on the size and composition of the ovarian follicle population in the Wistar rat. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 688-691, 1978.

LIU, R. H.; SUN, Q. Y.; LI, Y. H.; JIAO, L. H.; WANG, W. H. Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. **Zygote**, v. 11, p. 299–305, 2003.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**, v. 6, p. 141-148, 1922.

McCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267-273, 2000.

MORRIS, R.T. The ovarian graft. **New York Medicine Journal**, v. 62, p. 436, 1895.

NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; QU, J.; MOTTA, P.; DONNEZ, J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 122-129, 2000.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 295-301, 1995.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicles stimulating hormone. **Human Reproduction**, v. 13, n. 5, p. 1133-1138, 1998.

OKTAY, K.; BUYUK, E.; VEECK, L.; ZANINOVIC, N.; XU, K.; TAKEUCHI, T.; OPSAHL, M.; ROSENWAKS, Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet**, v. 363, p. 837–840, 2004.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 555-557, 1968.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L. R.; VASCONCELLOS, L. S. Histoarquitetura, função endócrina e taxa de gravidez após auto-implante ovariano ortotópico íntegro e fatiado em coelha. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 2, p. 117-123, 2004a.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L. R.; VASCONCELLOS, L. S.; LEITE, J. M.; CASTRO, L. P. F. Avaliação endócrina e morfológica de transplante ovariano homógeno. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 3, p. 206-211, 2004b.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L. R.; VASCONCELOS, L. S. Avaliação pós-transplante de ovários íntegros e fatiados sem anastomose vascular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 447-452, 2006.

ROSIN, E.; DOW, S. W.; DALY, W. R.; PETERSEN, S. W.; PENWICK, R. C. Infecção das feridas cirúrgicas e uso de antibióticos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. v. 1. São Paulo: Manole, 1998. p. 105-118.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 27-39, 2000.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R. C.; GUERIN, J. F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 403-408, 2002.

SCHMIDT, K. L. T.; ANDERSEN, C. Y.; LOFT, A.; BYSKOV, A. G.; ERNST, E.; ANDERSEN, A. N. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. **Human Reproduction**, v. 20, p. 3539-3546, 2005.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L. In: Tranqüilizantes e relaxantes musculares de ação central. SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 140-149.

STIFF, P. J.; BAYER, R.; KERGER, C.; POTKUL, R. K.; MALHOTRA, D.; PEACE, D. J.; SMITH, D.; FISHER, S. G. High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent / relapsed ovarian cancer: a multivariate analysis of survival for 100 consecutively treated patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, p. 1309-1317, 1997.

WATERHOUSE, T.; COX, S. L.; SNOW, M.; JENKIN, G. H.; SHAW, J. Offspring produced from heterotopic ovarian allografts in male and female recipient mice. **Reproduction**, v. 127, p. 689–694, 2004.

WOLNER-HANSSEN, P.; HÄGGLUND, L.; PLOMAN, F.; RAMIREZ, A.; MANTHORPE, R.; THURING, A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4 ½ years after autologous stem cell transplantation. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 84, p. 695-698, 2005.

WOOD, C. Ovarian transplantation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 89, n. 8, p. 595-597, 1982.

YANG, H. Y.; COX, S. L.; JENKIN, G.; FINDLAY, J.; TROUNSON, A.; SHAW, J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, p. 851-859, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A: INSTRUMENTAL CIRÚRGICO

Instrumental cirúrgico utilizado para realização dos procedimentos de ovariosalpingectomia e inserção de fragmento de tecido ovariano sob a cápsula renal de ratas.

- Especial e Auxiliar:
• Pinça de Allis para tecidos 15 cm
• Pinça de campo Backhaus 10 cm
• Gancho Hartmann para ovário-histerectomia (OSH)
• Pinça de dissecção 10 cm
• Pinça para íris 10 cm
• Pinça para íris (denteada) 10 cm
- Diérese:
• Cabo para lâmina de bisturi n˚4
• Tesoura para íris com ponta reta 11,5 cm
• Tesoura para íris com ponta curva 11,5 cm
• Pinça de dissecção 12 cm
• Pinça de dissecção (denteada) 14 cm
• Tesoura para suturas de Spencer
- Hemostasia:
• Pinça hemostática mosquito de Halsted com ponta reta 12 cm
• Pinça hemostática mosquito de Halsted com ponta curva 12 cm
- Síntese:
• Pinça de dissecção 10 cm
• Pinça de dissecção 12 cm
• Pinça de dissecção (denteada) 12 cm
• Porta-agulha Mathieu 14 cm
• Porta-agulha Mayo-Hegar 15 cm

Apêndice B: FICHA I

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

DATA DA REALIZAÇÃO DA CIRURGIA ___/___/___
DATA DA RETIRADA DO ENXERTO ___/___/___
GRUPO ___
ANIMAL ___

1. PROTOCOLO ANESTÉSICO:
   _____

2. GRAU DE ANALGESIA OBTIDO:
   RUIM REGULAR BOM EXCELENTE

3. LATÊNCIA ANESTÉSICA:_____

4. A OVARIECTOMIA FOI DE FÁCIL EXECUÇÃO?
   SIM NÃO TEMPO: _____

5. A INSERÇÃO DO ENXERTO FOI DE FÁCIL EXECUÇÃO?
   SIM NÃO TEMPO: _____

6. TEMPO TRANSCIRÚRGICO: _____

7. O INSTRUMENTAL UTILIZADO FOI ADEQUADO AOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS EXECUTADOS?
   SIM NÃO

OUTROS COMENTÁRIOS:
_____
_____

8. COMPLICAÇÕES TRANSCIRÚRGICAS:

   DISTÚRBIOS HEMORRÁGICOS
   NECESSIDADE DE SOBREDOSE ANESTÉSICA
   DOR NO TRANSCIRÚRGICO
   ALTERAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS

Apêndice C: FICHA II

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

DATA DA REALIZAÇÃO DO ENXERTO ___/___/___
DATA DA RETIRADA DO ENXERTO ___/___/___
GRUPO ___
ANIMAL ___

1. FOI FÁCIL LOCALIZAR O TECIDO ENXERTADO?
   SIM NÃO

2. HOUVE MIGRAÇÃO DO ENXERTO?
   SIM NÃO

3. EXISTE NEOVASCULARIZAÇÃO APARENTE?
   SIM NÃO

4. HÁ SINAIS DE INFECÇÃO?
   SIM NÃO

5. HOUVE ALTERAÇÃO APARENTE NA FUNÇÃO DO ÓRGÃO OU TECIDO QUE RECEBEU O ENXERTO?
   SIM NÃO

6. HÁ SINAIS DE ENCAPSULAMENTO DO TECIDO ENXERTADO?
   SIM NÃO

7. HÁ SINAIS DE REJEIÇÃO OU MORTE DO TECIDO ENXERTADO?
   SIM NÃO

8. QUAL O ASPECTO MACROSCÓPICO DO ÚTERO?
   DIMINUÍDO NORMAL AUMENTADO

9. FASE DO CICLO ESTRAL: _____

Apêndice D: FICHA III

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

DATA DA REALIZAÇÃO DO ENXERTO ___/___/___
DATA DA RETIRADA DO ENXERTO ___/___/___
GRUPO ___
ANIMAL ___

1. EXISTE NEOVASCULARIZAÇÃO?
   SIM NÃO

2. EXISTEM SINAIS DE INFLAMAÇÃO?
   SIM NÃO

3. EXISTEM SINAIS DE INFECÇÃO?
   SIM NÃO

4. EXISTE TECIDO CICATRICIAL OU CONJUNTIVO?
   SIM NÃO

5. EXISTEM FOLÍCULOS VIÁVEIS?
   - 5.1. PRIMORDIAIS SIM NÃO CONTAGEM:
   - 5.2. PRIMÁRIOS SIM NÃO CONTAGEM:
   - 5.3. SECUNDÁRIOS SIM NÃO CONTAGEM:
   - 5.4. TERCIÁRIOS SIM NÃO CONTAGEM:
   - 5.5. PRÉ-OVULATÓRIOS SIM NÃO CONTAGEM:

6. EXISTEM FOLÍCULOS EM ATRESIA?
   SIM NÃO CONTAGEM:

7. DIÂMETROS:
   - 7.1. NÚCLEO DO OÓCITO
   - 7.2. OÓCITO
   - 7.3. FOLÍCULO

8. EXISTEM CORPOS LÚTEOS?
   SIM NÃO