

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSPLANTE OVARIANO AUTÓLOGO EM DIFERENTES  
SÍTIOS ANATÔMICOS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**Michelly Fernandes de Macedo**

Médica Veterinária

**JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL**

**Julho de 2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSPLANTE OVARIANO AUTÓLOGO EM DIFERENTES  
SÍTIOS ANATÔMICOS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**Michelly Fernandes de Macedo**

**Orientador:** Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

**JABOTICABAL-SÃO PAULO-BRASIL**

**Julho de 2011**

M141t Macedo, Michelly Fernandes de  
Transplante ovariano autólogo em diferentes sítios anatômicos de  
ratas ovariectomizadas / Michelly Fernandes de Macedo. --  
Jaboticabal, 2011  
xxi, 102 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Raimundo Alves Barrêto Júnior, Ricardo  
Souza Vasconcellos, Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima,  
Juliana Corrêa Borges Silva

Bibliografia

1. Composição corporal. 2. Ovário-Rata. 3. Transplante. 4. Útero.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619..617..599.323

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. email:  
michellymedvet@hotmail.com.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MICHELLY FERNANDES DE MACEDO** – é filha de Osvaldo Pinheiro de Macedo e Vanderluce Fernandes de Macedo, e nasceu em 04 de abril de 1982, na cidade de Natal, RN. Tem origens humildes nas regiões do Seridó e Agreste Potiguar, onde até os dias atuais vivem seus parentes. É Médica Veterinária formada pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA (antiga Escola Superior de Agricultura de Mossoró - ESAM), em julho de 2005. Nesta ocasião, foi aluna laureada com melhor desempenho acadêmico dentre todos os formandos da UFRSA daquele ano. Em agosto de 2007 recebeu o título de Mestre em Cirurgia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” após desenvolvimento e defesa da dissertação de mestrado intitulada “Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas” sob a orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente. No mesmo mês e ano, ingressou no curso de doutorado do mesmo programa de pós-graduação para desenvolver sua tese. Em maio de 2008 foi aprovada em processo seletivo para professor substituto da UFRSA, onde lecionou, até maio de 2010, as disciplinas de Fisiologia Animal e Diagnóstico por Imagem. Durante a vida acadêmica desempenhou trabalhos nas mais diversas áreas. Foi monitora de Fisiologia e bolsista de PIBIC durante a graduação, fez estágios em fazendas de gado leiteiro e suinocultura, clínicas veterinárias particulares e Universidades de todo o país, buscando preferencialmente os setores de Cirurgia e Obstetrícia. E em 2011, se submete à avaliação de seus respeitosos mestres para obter o título de Doutor em Cirurgia Veterinária, ao defender o trabalho de tese intitulado “Transplante ovariano autólogo em diferentes sítios anatômicos de ratas ovariectomizadas”.

## *O Homem de Bem*

*O verdadeiro homem de bem é aquele que pratica a lei de justiça, de amor e de caridade em sua maior pureza. Se interroga a consciência sobre seus próprios atos, pergunta a si mesmo se não violou essa lei; se não fez o mal e se fez todo o bem que podia; se negligenciou voluntariamente uma ocasião de ser útil; se ninguém tem o que reclamar dele; enfim, se fez a outrem tudo o que quereria que se fizesse para com ele.*

*Tem fé em Deus, na sua bondade, na sua justiça e na sua sabedoria divina. Sabe que nada acontece sem a sua permissão e submete-se, em todas as coisas, à sua vontade.*

*Tem fé no futuro; por isso coloca os bens espirituais acima dos bens temporais.*

*Sabe que todas as alternativas da vida, todas as dores, todas as decepções são provas ou expiações, e as aceita sem lamentações.*

*O homem de bem que tem o sentimento de caridade e de amor ao próximo faz o bem pelo bem, sem esperar retorno, retribui o mal com o bem, toma a defesa do fraco contra o forte e sempre sacrifica seus interesses à justiça.*

*Encontra satisfação nos benefícios que distribui, nos serviços que presta, nas alegrias que proporciona aos seus semelhantes, nas lágrimas que seca, nas consolações que leva aos aflitos. Seu primeiro impulso é o de pensar nos outros antes de si, acudir aos interesses dos outros antes de procurar os seus. O egoísta, ao contrário, calcula os ganhos e as perdas de toda ação generosa.*

*É bom, humano e benevolente para com todos, sem distinção de raças nem de crenças, pois vê irmãos em todos os homens.*

*Respeita nos outros todas as convicções sinceras e não amaldiçoa quem não pensa como ele.*

*Em todos os momentos, a caridade é o seu guia; tendo como certo que aquele que prejudica os outros com palavras maldosas, que agride os sentimentos de alguém com seu orgulho e seu desdém, que não recua perante a ideia de causar um sofrimento, uma contrariedade, ainda que ligeira, quando poderia evitá-la, falta ao dever do amor ao próximo e não merece a clemência do Senhor.*

*Não tem nem ódio, nem rancor, nem desejos de vingança; a exemplo de Jesus, perdoa e esquece as ofensas e apenas se recorda dos benefícios, pois sabe que será perdoado conforme perdoou.*

*É indulgente para com as fraquezas dos outros, porque sabe que ele mesmo precisa de indulgência, e se recorda das palavras do Cristo: Que aquele que estiver sem pecado lhe atire a primeira pedra.*

*Não se satisfaz em procurar defeitos nos outros, nem colocá-los em evidência. Se a necessidade o obriga a fazer isso, procura sempre o bem que possa atenuar o mal.*

*Estuda suas próprias imperfeições e trabalha sem cessar para combatê-las. Emprega todos os seus esforços para poder dizer no dia seguinte que há nele algo de melhor do que no dia anterior.*

*Não exalta a si mesmo nem seus talentos à custa de outrem, ao contrário, aproveita todas as ocasiões para ressaltar as qualidades dos outros.*

*Não se envaidece de sua riqueza, nem de suas vantagens pessoais, pois sabe que tudo o que lhe foi dado pode ser retirado.*

*Usa, sem exagero, dos bens que lhe são concedidos, pois sabe que se trata de um depósito do qual deverá prestar contas, e que o emprego, que resultaria mais prejudicial para si mesmo, seria o de fazê-los servir à satisfação de suas paixões.*

*Se, na ordem social, alguns homens estão sob seu mando ou dependem dele, trata-os com bondade e benevolência, pois são seus semelhantes perante Deus; usa da sua autoridade para erguer-lhes o moral, e não para esmagá-los com seu orgulho; evita tudo o que poderia dificultar-lhes a posição subalterna.*

*O subordinado, por sua vez, compreende os deveres de sua posição e se empenha em cumpri-los conscientemente.*

*Finalmente, o homem de bem respeita todos os direitos que as leis da Natureza dão aos seus semelhantes, como gosta que os seus sejam respeitados.*

*Esta não é a relação completa de todas as qualidades que distinguem o homem de bem, mas quem quer que se esforce para possuí-las está no caminho que conduz a todas as outras.*

***O Evangelho Segundo o Espiritismo, Allan Kardec  
Capítulo XVII, Sede Perfeitos, O Homem de Bem.***

## *Dedico*

*Aos meus pais Osvaldo e Vanda,  
Por terem me proporcionado o dom da vida através desta encarnação.  
Pela dedicação, parceria, conquistas e trabalho árduo diário para que eu  
pudesse me tornar quem hoje eu sou:  
Uma filha muito orgulhosa de tê-los como pais.  
Tentarei ser digna desse amor e de nossas origens por toda a minha existência.*

*Ao meu irmão Júnior,  
Pelo amor fraterno e sereno de sempre,  
Serás sempre meu exemplo de mansidão e índole pacífica.*

*Ao meu marido Marcelo,  
Destinado pelos Seres Superiores e escolhido por mim,  
Para ser minha terna companhia ao transcorrer de existências.  
Agradecerei sempre à espiritualidade,  
pela oportunidade que me foi fornecida de tê-lo em minha vida,  
dedicando-me tanto amor, lealdade e conjunção de pensamentos.*

*A conquista que hoje me titula, não é minha...  
É, com toda certeza, nossa!*

## *AGRADECIMENTOS*

*À espiritualidade e meus anjos protetores, por me acompanharem sempre, intuindo, protegendo, cuidando de mim e daqueles que amo. Obrigada pela concessão da vida e reencarnação. Hoje posso observar as conquistas e derrotas que tive e, ainda terei, com mais serenidade, graças aos ensinamentos que pude receber com tanto amor a partir dos espíritos amigos encarnados e desencarnados. Agradeço a sabedoria, a saúde física, mental e espiritual, o alimento do corpo e da alma, e principalmente, por ter muito mais a agradecer do que a pedir.*

*A todos os familiares e às minhas origens, que me trouxeram sempre tantos exemplos de hombridade, humildade, amizade e esforço mútuos. Nunca me esquecerei de onde vim porque tenho orgulho em dizer que minhas origens são pobres sim, em dinheiro, bens materiais e luxo; porém, são riquíssimas em sentimentos como amor, respeito, união, resignação e dignidade. Sentimentos estes, que infelizmente, muitos têm a graça de conhecer, mas poucos têm sabedoria para saber reconhecer e valorizar. Posso estar longe... Separada por milhares de quilômetros das pessoas que mais amo... E isso me dói muito na maioria das vezes que paro pra pensar... Mas tenham a certeza de que carrego princípios e ética que vocês me ensinaram a ter e mostrar àqueles que hoje são do meu convívio. Toda consciência de partilha que aprendi a ter, vendo-os dividir desde o pão de cada dia até os sofrimentos que a miséria impõe, hoje posso externar, participando-lhes que existe muito de vocês neste trabalho e a conquista que virá a partir dele é, e será sempre, nossa.*

*Ao amigo, cúmplice, colega de trabalho e marido, **Marcelo Barbosa Bezerra**, agradeço-te por me ajudar a concluir mais um de nossos planos. Sei que a felicidade que sinto hoje também é sua, pois existe muito de você neste trabalho. Ao longo de quatro anos refletimos juntos sobre cada fase deste trabalho e agora podemos ver o quão grandioso ele é. Devo-te não só um muito obrigado por isso, mas a retribuição científica que será eterna por toda contribuição que deu a mim, profissionalmente falando, e a esta tese. Agradeço também a compreensão nos momentos de estresse, ausência e incertezas que tive que dividir com você. O caminho que tenho a percorrer ainda é longo e totalmente indefinido, talvez tenhamos que conviver mais alguns anos com a indesejável distância física e isso me desanima. Mas, ao mesmo tempo, fico feliz e otimista em percorrer essa estrada, porque sei que no horizonte, e até além dele, você vai estar sempre me esperando com um forte abraço e beijo carinhoso. Desejo ardentemente, que não demore e, que o caminho não seja tão longo, para que possamos o quanto antes e enfim, ficar a sós e juntos de verdade. Hoje, temos nas mãos mais um sonho realizado e vamos comemorar, mas a grande celebração da minha vida é comemorar a sua existência e a nossa união.*

*Ao orientador e amigo, **Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente**, obrigada primeiramente pelo exemplo de figura humana que és. Sempre admirei pessoas com inteligência, sabedoria, serenidade e sobriedade, mas o senhor vai muito além disso. Nunca conseguirei transmiti-lo em palavras, sejam elas escritas ou faladas, o quanto o admiro e quero bem, nem tampouco, retribuir tudo que já me proporcionou. Sei que tenho muita sorte por tê-lo como orientador científico pela qualidade técnica que todos nós já conhecemos, porém o que me deixa realmente envaidecida e orgulhosa, não é o título que estais me ajudando a conquistar, mas o fato de saber que hoje posso considerá-lo também como um grande amigo e a certeza de que este sentimento é recíproco.*

*À Prof<sup>a</sup>. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, agradeço pelo carinho e colaboração ofertados desde a fase experimental até o momento da conclusão deste trabalho. Obrigada pelo sorriso franco, otimismo e força, que muitas vezes transformaram um dia cheio de problemas e preocupações, em momentos de alegria e leveza, bons de serem recordados. Agradeço por lutar sempre para que nossas pesquisas fossem realizadas com qualidade mesmo à custa de muitas contrariedades e desgostos profissionais.*

*Oiê! Para àquela que é madrinha, amiga, colega de laboratório e uma irmã que escolhi depois de nascer, **Juliana Corrêa Borges Silva**, ou simplesmente Jú. Não tenho como agradecer toda a amizade, companheirismo, abraços apertados, beijos estalados no rosto, noites divertidíssimas com muita “Imagem e Ação”, e terapias de grupo que fizemos só nós duas. Inúmeras vezes fizemos isso sem tirar os olhos do microscópio... Ah, se aquele Nikon falasse! Muito obrigada pelos conselhos pessoais e profissionais, considerações sobre este trabalho e prontidão em me ajudar seja a hora que for. Não sei se mereço, mas Deus foi muito bom comigo ao colocar pessoas como você e o Márcio no meu ciclo de convivência.*

*Àquele que é amigo, padrinho, mestre e cunhado, **Prof. Raimundo Alves Barrêto Júnior**, obrigada pela presença constante, solicitude, amizade e colaboração que tem dado e ainda dará à minha vida profissional. Ter sido sua ex-aluna e hoje possuir sua amizade muito me honra.*

*Ao **Prof. Ricardo Souza Vasconcellos**, agradeço por ser um dos “gurus” desta tese e ter se colocado sempre à disposição para dirimir minhas dúvidas e abrir portas para que eu pudesse realizar uma das partes mais importantes do meu trabalho. Minha eterna gratidão por viabilizar a qualidade das minhas análises e colaborar agora com as correções.*

*Ao Prof. César Roberto Éesper, obrigada pelas considerações que agora agregam valor à minha tese. Agradeço pelo respeito, amizade e carinho que sempre dedicou a mim e a todos os irmãos nordestinos que já passaram e ainda passarão pelo Departamento de Reprodução Animal. Espero que os bons momentos, de trabalho e descontração com “piadas na salinha do café” estejam sempre vivos na sua memória, assim como estão na minha.*

*Ao Prof. Dalton José Carneiro, por ter cedido as instalações do seu laboratório para que eu pudesse desempenhar meu trabalho e, a todos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, por toda ajuda e paciência na análise de composição corporal, e em especial ao Thiago M.T. Nascimento, pelos ensinamentos, correções de metodologia e principalmente, por ter dividido tanto éter comigo, meu muito obrigado.*

*Aqueles que auxiliaram diretamente no meu experimento de doutorado, Marcelo Barbosa Bezerra, Felipe Farias Pereira da Câmara Barros, Márcia Cristina Matos, Edson de Aguiar, Maria Helena Coelho Cruz, Anelise Perez, Carla Cristina D’Amato, Thiago Matias Torres do Nascimento, Fabiano César Sá, Ricardo Souza Vasconcellos, Andréia Freitas de Oliveira e Nayara Almeida do Carmo, o meu muito obrigado por toda ajuda durante a execução deste trabalho. Espero poder retribuir à altura todo o auxílio que me deram.*

*Aquele que não é uma impressora, mas é multifuncional algumas vezes, Felipe Farias Pereira da Câmara Barros, obrigada meu amigo por ter continuado, mesmo sozinho, a tocar nossa linha de pesquisa e por ser nosso elo direto com Jaboticabal. Agradeço de coração pela ajuda no meu experimento, alegria, amizade e milhares de caronas que me deu. Que a nossa parceria continue sendo sempre assim e que renda muitos frutos, ou melhor, artigos.*

*Ao amigo e fiel colaborador deste trabalho, **Edson de Aguiar**, o meu muitíssimo obrigado por ter se dedicado ao meu trabalho como se ele fosse seu. Agradeço por ter me proporcionado a tranquilidade necessária para poder trabalhar enquanto meus animais estavam sendo bem cuidados por você. Também não posso esquecer o bom café e as conversas sadias que tivemos, sempre repondo as energias nos intervalos das análises. Obrigada inclusive, por aguentar tantos gritos como “Ô Edson! Onde é que está isso? Ou aquilo?” além da presteza e paciência que sempre teve com todos nós.*

*Às minhas companheiras de república temporária (**Mayhara Martins Cordeiro Barbosa, Josi Cerveira e Iara Maluf Tomazella**) agradeço pela generosa acolhida, amizade, conversas, companhia, bolos, tortas, comidinhas deliciosas e é claro, obrigada pelo chimarrão Josi. Obrigada minha prima (“doidinha dos pão”) e queridas amigas por terem tornado minha estada em Jaboticabal menos solitária e muito prazerosa.*

*À minha grande amiga que é o “Ó do borogodó!”, **Paula Andressa Pennacchi Savi**, obrigada por ter me proporcionado uma das amizades mais sinceras, ternas e valiosas que tenho. Estou certa de que você é um dos meus anjos da guarda encarnado. Agradeço pela acolhida tão carinhosa em sua casa, por todas as conversas sobre os mais diversos assuntos, auxílio espiritual e companhia alegre. E como não podia deixar de citar, obrigada por essa afinidade imensa que temos... As mímicas não me deixam mentir...*

*À amiga **Eveline dos Santos Zanetti**, agradeço por todo carinho e dedicação que teve por mim. És uma das pessoas que conheço com total integridade e retidão de caráter. És linda em personalidade tanto quando o é externamente, além de doce, companheira e pura de coração. Só tenho uma forma de dizer obrigada e sei que você vai gostar: um xêro pra você!*

*Aos companheiros do Laboratório ORGIA (Juliana Corrêa Borges Silva, Paula Andressa Pennacchi Savi, Felipe Farias Pereira da Câmara Barros, Tathiana Ferguson Motheo, Luciana Cristina Padilha, Maria Emília Franco Oliveira, Maricy Apparicio Ferreira, Eliandra Antonia Pires, Giuliano Queiroz Mostachio, Pedro Paulo Maia Teixeira, Ana Paula Perini, Letícia Zoccolaro de Oliveira, Aline Costa de Lucio), agradeço principalmente pelo bom-humor, amizade sincera, carinho e receptividade que tiveram comigo desde a primeira vez que estive na UNESP. Obrigada também pela troca de experiências, empréstimo de material de laboratório, noites de sushi no RjoMar, companhia nos fins de semana que tive que passar no laboratório, e é claro, às milhares de caronas que me deram.*

*Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Reprodução Animal, Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida, Isabel Aparecida Penharol Natarelli e Edson de Aguiar, obrigada pela acolhida sempre fraterna que me deram e por toda a ajuda e auxílio que prestaram durante minha passagem por Jaboticabal.*

*Aos grandes amigos a amigas de Mossoró, Alexandro Leite e Luciane Barreto, Everardo Praça e Benedita Praça, Raimundo A. Barrêto Júnior e Anaemília Diniz, Faviano Ricelli e Paula Viviane, Benito Soto Blanco e Sílvia, Isabella Barros, Letse Fernandes, Isadora Karolina Sousa, Regina Valéria da C. Dias, Valéria Veras de Paula, Kilder D. Filgueira, Jean Berg A. Silva e Lidiane, Luiz Augusto V. Cordeiro e Priscila Bertevello, Fernando G. Albuquerque e Jesane Alves, Moacir F. Oliveira, Sidney M. Sakamoto e Luciene Xavier, Wirton P. Costa e Anaclêa Melo, Paulino Bernardes e Hilma Macedo, o meu muito obrigado por todos os anos de amizade e apoio que sempre me deram. Saibam que um dos grandes motivos que me fazem gostar de Mossoró, é saber que vocês estarão sempre prontos para fornecer tudo de melhor que só os bons amigos podem e sabem fazer.*

*Aos amigos Max Resende & Adriana Almeida, que estão longe fisicamente, mas muito próximos quando lembro diariamente de vocês. Espero que a nossa irmandade continue sendo como sempre foi: verdadeira, leal e forte. A chegada do pequeno Gabriel é somente uma dentre as milhares de graças divinas que vocês merecem e terão.*

*Aos amigos, professores, funcionários, colegas e colaboradores do nosso trabalho, que fazem a UFRSA, o meu muito obrigado pela formação profissional e de caráter que pude adquirir com os bons de coração que fazem esta instituição.*

*À UNESP e a cidade de Jaboticabal, que me acolheu e proporcionou os melhores anos de minha vida. Sentirei muita saudade dos anos felizes que vivi.*

*A todos os que fazem parte da grande família do Centro Espírita Universal (CEU), principalmente ao grupo da sexta-feira sobre estudos do Evangelho: Ferroni & Nercy, Felipe, Vanderley & Beth, Clorivaldo Júnior, Ângela, Rosinha, Luizão e Danilo, muito obrigada pela amizade, discussões sadias e profundas, exemplos de vida e carinho que tem por mim. Agradecerei sempre ao nosso Pai Maior pela concessão da existência junto a pessoas que me fizeram evoluir, desejar viver com alegria, e estar sempre pronta para dar muito amor ao próximo. Confesso que muitas vezes, enquanto morava aí, pensei em desistir de tudo e voltar para junto dos meus. Hoje quando estou longe de Jaboticabal, continuo sentindo vontade de retornar para junto dos meus, só que desta vez, os meus, são os irmãos de jornada que tive a honra de conhecer e conviver nesta cidade. Boa parte de toda a imensa saudade que sinto hoje quando lembro de Jaboticabal, se deve a vocês.*

*Aos amigos distantes fisicamente, mas que estão sempre em meu coração e pensamento, Jussara Benvidio Neri, Márcia Viviane Alves Saraiva, Mariana Machado Matos, Igôr Gurgel Ibiapina, Wesclley Batista dos Santos, 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 e edificante durante os cinco anos de nossa graduação e por torcerem pelo meu sucesso.*

*Aos **animais** agradeço o gosto e orgulho pela profissão que abracei. De minha parte resta apenas a admiração, devotamento e respeito eternos por toda a contribuição dada por vocês à minha vida profissional.*

*Ao **CNPq**, pela concessão da minha bolsa de doutorado.*

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

*Perdoem-me aqueles que eu, por ventura, esqueci de citar, mas recebam com muito amor e respeito meus sinceros agradecimentos.*

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xvi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xvii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xviii
<b>RESUMO</b>	xx
<b>SUMMARY</b>	xxi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	03
2.1. Definição e Classificação	03
2.2. Histórico	04
2.3. O ovário – Estrutura e função	05
2.4. Aplicações e limitações dos transplantes gonadais	06
2.5. A atividade ovariana e seus efeitos na composição corporal	10
2.6. O útero frente à produção hormonal ovariana	12
2.7. Ciclo estral em roedores	15
2.8. Estado da arte	17
<b>3. OBJETIVOS</b>	22
3.1. Geral	22
3.2. Específicos	22
<b>4. HIPÓTESES</b>	23
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
5.1. Animais e manejo	24
5.2. Grupos e tratamentos	25
5.3. Instrumental cirúrgico	26
5.4. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	26
5.5. Colpocitologia vaginal em meio líquido	29
5.6. Histopatologia do útero e ovários	30
5.7. Análise química da carcaça	35
5.8. Análise estatística	40
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
6.1. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	41
6.2. Acompanhamento do ciclo estral	46
6.3. Peso corpóreo e análise química da carcaça	52
6.4. Avaliação histomorfométrica do útero	58
6.5. Avaliação histomorfométrica dos tecidos ovarianos	63
<b>7. CONCLUSÕES</b>	70
<b>8. IMPLICAÇÕES</b>	71
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	72
<b>APÊNDICE</b>	101

**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
Ece	Estrogênio conjugado equino
EE	Extrato Etéreo
EG	Epitélio Glandular
End	Estroma Endometrial
ESup	Epitélio Superficial
ETot	Espessura Total
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FOP	Falência Ovariana Prematura
FOPA	Folículos Pré-Antrais
HE	Hematoxilina-Eosina
IP	Intraperitoneal
Mio	Miométrio
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
MM	Material Mineral
MS	Matéria Seca
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
PCI	Pré-Condicionamento Isquêmico
PB	Proteína Bruta
PTH	Paratormônio
Ral	Raloxifeno
SC	Subcutâneo (a)
TBE	Tribromoetanol
TM	Tricrômico de Masson
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ratas utilizadas no experimento (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	25
<b>Tabela 2</b> - Média e desvio-padrão para duração dos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia bilateral seguida ou não dos transplantes autólogos para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais em ratas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	44
<b>Tabela 3</b> - Média e desvio-padrão para duração das fases do ciclo estral em horas de ratas não-transplantadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	47
<b>Tabela 4</b> - Média e desvio-padrão do retorno ao estro em dias de ratas submetidas aos transplantes autólogos ovarianos para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	50
<b>Tabela 5</b> - Média e desvio-padrão do peso corpóreo em gramas de ratas antes e 180 dias depois do início do experimento (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	52
<b>Tabela 6</b> - Média e desvio-padrão dos percentuais (%) de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína (PB) expressos na matéria natural de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas após análise química da carcaça (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	54
<b>Tabela 7</b> - Média e desvio-padrão para espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio superficial (ESup), estroma endometrial (End), miométrio (Mio) e espessura total do útero (ETot) de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	58
<b>Tabela 8</b> - Média e desvio-padrão do número de glândulas endometriais de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	61
<b>Tabela 9</b> - Comparação das porcentagens (%) de folículos normais no tecido ovariano de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e submetidas ao transplante autólogo por seis meses (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).	63

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Esquema das amostras em gotas individuais, organizadas por grupo, na placa de Petri, coletadas por colpocitologia vaginal em meio líquido para posterior observação em microscópio óptico, sem coloração, ou contraste de fase, e determinação da fase do ciclo estral.	30
<b>Figura 2</b> - Esquema de corte transversal do corpo do útero de ratas. Observar a divisão do corte histológico em quadrantes para obtenção de quatro valores ( $P_1$ , $P_2$ , $P_3$ e $P_4$ ) para cada uma das mensurações: altura do epitélio superficial ( $E_{Sup}$ ), espessuras do estroma endometrial (End), miométrio (Mio) e total ( $E_{Tot}$ ). As setas duplas ( $\leftrightarrow$ ) indicam onde começa e termina cada camada uterina mensurada. O detalhe ampliado da imagem demonstra como mensurar corretamente a altura do epitélio superficial.	34
<b>Figura 3</b> - Imagens ilustrativas de algumas etapas da análise de composição corporal. (A) Cinzas de coloração clara no interior de um cadinho após queima da amostra em mufla; (B) Tubo plástico cônico (Falcon <sup>®</sup> ) demonstrando sobrenadante da solução após a centrifugação da amostra; (C) Balões volumétricos e funis contendo filtros antes da filtração do sobrenadante; (D) Balões volumétricos contendo éter e amostras filtradas durante recuperação no Aparelho de Soxhlet; (E) Amostras dentro do dessecador após 16 horas em estufa de circulação forçada; (F) Última pesagem do balão volumétrico para posterior determinação de extrato etéreo na amostra.	39

## LISTA DE FIGURAS

## Página

- Figura 4** - Fotomicrografia das fases do ciclo estral observadas após coleta por colpocitologia vaginal em meio líquido de ratas submetidas ao transplante autólogo ovariano. A. Proestro com inúmeras células epiteliais arredondadas e nucleadas (basais e parabasais); animal do grupo transplantado para região de confluência dos vasos femorais; B. Estro com presença de células queratinizadas em maior proporção; animal do grupo transplantado para tecido subcutâneo; C. Metaestro demonstrado pela redução significativa na quantidade de células queratinizadas, início da infiltração leucocitária e surgimento de algumas células epiteliais; animal do grupo transplantado para região subcapsular do rim; D. Diestro com pequena proporção de células epiteliais e queratinizadas e maior quantidade de células leucocitárias; animal do grupo transplantado para bolsa ovárica. Microscopia óptica, sem contraste de fase, sem coloração. Barra: 100µm. 46
- Figura 5** - Fotomicrografia de útero de rata (terço médio). Fase proliferativa no controle não-ovariectomizado (A) e com transplante no subcutâneo (B); Fase secretória no transplante da cápsula renal (C); transplante na bolsa ovárica (D) e transplante nos vasos femorais (E); F. Atrofia uterina, controle ovariectomizado. Notar epitélio superficial (\*), glândulas endometriais (G), secreção no interior das glândulas ou lume uterino (►), estroma endometrial (End) e miométrio (Mio). Microscopia óptica, sem contraste de fase, Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 100µm. 62
- Figura 6** - Fotomicrografia dos folículos contidos nos tecidos ovarianos transplantados em ratas. (A) Fol. primordial, transplante no tecido subcutâneo, 40x; (B) Fol. primário, transplante nos vasos femorais, 20x; (C) Fol. Secundário, transplante no tecido subcutâneo, 20x; (D) Fol. Antral Inicial, transplante na cápsula renal, 10x; (E) Fol. Antral, transplante na bolsa ovárica, 10x; (F) Fol. Pré-Ovulatório, transplante nos vasos femorais, 10x. Notar vascularização (\*), folículos ovarianos (Fol.►), tecido conjuntivo (TC), parênquima renal (PR), fio cirúrgico (FC). Microscopia óptica, sem contraste de fase, Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 100µm. 69

## **TRANSPLANTE OVARIANO AUTÓLOGO EM DIFERENTES SÍTIOS ANATÔMICOS DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**RESUMO** - O transplante autólogo ovariano tem despertado um crescente interesse científico devido à sua relevante contribuição em estudos reprodutivos básicos ou aplicados de animais e humanos. A presente tese foi conduzida com o objetivo de investigar de que forma o transplante autólogo ovariano nos diferentes sítios anatômicos preconizados poderia influenciar diversos aspectos orgânicos de ratas ovariectomizadas. Para tanto, 54 ratas Wistar, foram subdivididas em seis grupos, sendo dois controles de animais não-ovariectomizados e ovariectomizados (respectivamente, grupos A e B), e quatro submetidos à ovariectomia bilateral seguida do transplante autólogo ovariano para região subcapsular do rim (grupo C), tecido subcutâneo (grupo D), bolsa ovárica (grupo E) e próximo aos vasos femorais (grupo F). Foram avaliados e comparados nos grupos e tratamentos estabelecidos, aspectos cirúrgicos, anestésicos, reprodutivos, bem como, a composição corporal dos animais. De um modo geral, os sítios anatômicos forneceram condições adequadas ao desenvolvimento e crescimento folicular, com retorno ao ciclo estral após 17-19 dias em média de transplante, sendo ainda eficazes na manutenção da histomorfometria uterina e composição corporal dos animais transplantados, à exceção do grupo F. Nos grupos C, D e E, o percentual de matéria mineral foi maior que o observado nos demais, enquanto que os teores de matéria seca, extrato etéreo e proteína bruta desses grupos foram semelhantes aos do grupo A. E por fim, nos grupos C e D, foram estimadas as maiores populações foliculares dentre os animais transplantados. Concluiu-se que o transplante autólogo ovariano quando realizado para a região subcapsular do rim, tecido subcutâneo e bolsa ovárica, foi eficiente na manutenção das funções avaliadas neste estudo inclusive, demonstrando em algumas situações, resultados semelhantes ou até melhores que aqueles observados nos animais não-ovariectomizados.

**Palavras-Chave:** composição corporal, ovário, ratas, transplante, útero.

## **AUTOLOGOUS OVARIAN TRANSPLANTATION IN DIFFERENT ANATOMICAL SITES OF OVARECTOMIZED RATS**

**SUMMARY** - The ovarian autologous transplantation has attracted an increasing scientific interest due its contribution in basic or applied reproductive studies in animals and humans. This thesis was conducted to investigate how the autologous ovarian transplantation in different anatomical sites could influence various organic aspects of ovariectomized rats. Thus, 54 Wistar rats were divided into six groups, two controls of non-ovariectomized animals and ovariectomized (respectively, groups A and B), and four submitted to bilateral ovariectomy and ovarian autologous transplantation for under kidney capsule (group C), subcutaneous tissue (group D), *bursa ovarica* (group E) and nearing femoral vessels (group F). In the groups and treatments were evaluated and compared, surgical aspects, anesthetics, reproductive, as well as, the body composition of animals. In general, the anatomical sites provided good conditions for development and growth follicular with return to estrus 17-19 days after transplantation, providing the maintenance of uterine histomorphometry and body composition of animals transplanted, except in the group F. In groups C, D and E, the percentage of mineral matter (ash) was higher than that observed in the others, while the dry matter, ether extract and crude protein of these groups were similar to the group A. Finally, in groups C and D, were estimated the largest follicular populations of transplanted animals. In conclusion, the autologous ovarian transplantation, when performed for under kidney capsule, subcutaneous tissue and *bursa ovarica*, was effective to maintenance of functions evaluated in this study, demonstrated even in some situations, results similar to or better than those observed in animals not ovariectomized.

**Keywords:** body composition, ovary, rats, transplantation, uterus.

## 1. INTRODUÇÃO

O transplante de órgãos não reprodutivos vem sendo praticado com taxas variáveis de sucesso em todo o mundo há muitas décadas (BEDAIWY et al., 2008). Os transplantes oferecem diversas aplicações e perspectivas, tanto em humanos quanto em animais, objetivando-se sempre a melhor função de determinado órgão com repercussão na melhor qualidade de vida daqueles submetidos a este procedimento independentemente do tecido transplantado.

Os indivíduos submetidos aos transplantes são conduzidos a tratamentos imunossupressivos pelo resto de suas vidas a fim de se evitar a rejeição do órgão transplantado. Entretanto, o transplante de órgãos reprodutivos, principalmente gônadas, pode ser tanto transplante autólogo quanto heterólogo. O transplante autólogo ou autotransplante é um processo em que determinado tecido ou órgão retorna para o mesmo indivíduo que serviu como doador, não havendo, portanto, necessidade de tratamento imunossupressivo. Nesta modalidade estão inseridos os principais tipos de transplantes de órgãos reprodutivos. O transplante heterólogo, por sua vez, corresponde ao transplante de órgãos e tecidos entre indivíduos diferentes. Este processo já está bem estabelecido para muitos órgãos sólidos como rins, pâncreas, fígado, coração, pulmões e medula óssea (BEDAIWY et al., 2008).

Tratando especificamente do transplante autólogo ovariano, podemos afirmar que o sucesso desta técnica depende diretamente da posição anatômica escolhida para receber o tecido ovariano transplantado, e isto irá possibilitar maior ou menor recuperação tecidual, bem como, dos folículos nele contidos. Neste contexto, algumas pesquisas vêm sendo realizadas com intuito de conhecer qual posição anatômica oferece melhor desenvolvimento ao tecido transplantado (ISRAELY et al., 2003; YANG et al., 2006; MACEDO, 2007a). Porém, não existem investigações sobre como esta técnica, e sua consequente produção de hormônios, pode vir a influenciar na composição corporal, histoarquitetura do útero e ovários de animais transplantados, nem tampouco, se os órgãos receptores sofrem lesões e qual a extensão delas após alguns meses.

Devido ao potencial retorno da função hormonal, o transplante de tecido ovariano poderia atuar como forma de reposição estrogênica e desempenhar alguns papéis fundamentais na manutenção do estado de saúde geral, como por exemplo, na prevenção do surgimento de diversas desordens orgânicas associadas à depleção hormonal estrogênica (conhecida em humanos como síndrome metabólica pós-menopausa), como auxílio na regulação da homeostase de lipídios e carboidratos e, conseqüentemente, manutenção da composição corporal normal. Entretanto, ainda não existem estudos que abordem ou esclareçam essas questões quando são utilizadas técnicas de transplante ovariano, sendo esta a principal justificativa para o desenvolvimento desta investigação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão serão abordadas as principais contribuições da utilização do transplante autólogo ovariano a partir de modelos experimentais e suas possíveis implicações na reprodução animal e humana.

### 2.1. Definição e Classificação

Transplantar deriva do latim tardio “*trānsplantāre*” ou latim moderno “*translatio*” e significa transferir ou transportar (SILVA & MONTAGNER, 2009; CUNHA, 2010). Essa técnica envolve a transferência de um órgão funcional ou parte dele, de um indivíduo para ele mesmo ou outro, com ou sem reestabelecimento da continuidade vascular. Assim sendo, os transplantes são classificados levando-se em consideração alguns critérios. Num desses, a classificação é feita a partir da espécie receptora como: autotransplante, quando doador(a) e receptor(a) são o mesmo indivíduo; isotransplante, se o transplante ocorre entre indivíduos geneticamente idênticos; alotransplante, quando o(a) receptor(a) é outro indivíduo da mesma espécie e o xenotransplante, para doador(a) de uma espécie e receptor de outra. A outra forma de classificação diz respeito à localização do tecido transplantando sendo ortotópico quando o tecido é transplantado para um local próximo à posição anatômica de origem ou, heterotópico, se este for transferido a um sítio receptor anatomicamente distante do original (KRONH, 1977).

O transplante autólogo ovariano consiste, especificamente, na transferência do ovário íntegro ou de seus fragmentos corticais por meios cirúrgicos. A técnica em questão pode ser útil quando se deseja restaurar ou amplificar a fertilidade de um indivíduo, além de servir como modelo de investigação do desenvolvimento folicular a partir dos estádios primordiais (CECCONI, 2002; ANDRADE et al., 2004; DONNEZ et al., 2006; MACEDO et al., 2007b).

## 2.2. Histórico

Os primeiros relatos foram de MORRIS (1895) e KNAUER (1896), que visavam o rejuvenescimento mediante a manutenção das concentrações hormonais após o climatério.

A partir da década de 40, com o advento das pílulas de reposição hormonal, houve 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).

Em 1956, foi demonstrado que o autotransplante de tecido ovariano de camundongas mantém sua viabilidade mesmo com procedimentos prévios de congelação e descongelação (PARKES, 1956). Outros estudos nesta mesma década estimaram que mais de 90% dos oócitos são destruídos por esses processos de congelação e descongelação antes do autotransplante no tecido subcutâneo, mas que um pequeno número de folículos primordiais sobreviveu e retomou o seu desenvolvimento (DEANESLY, 1954; GREEN et al., 1956; DEANESLY, 1957). Posteriormente foi demonstrado que o transplante ortotópico de ovário em camundongas conserva a habilidade desse tecido em produzir oócitos viáveis, muito embora os animais que receberam o tecido após congelação e descongelação apresentassem menor fertilidade quando comparados com aqueles que receberam o tecido a fresco (PARROTT, 1958; PARROTT & PARKES, 1960).

As primeiras gestações foram obtidas com sucesso em camundongos após o transplante de fragmentos ovarianos estocados a  $-79^{\circ}\text{C}$ , tendo glicerol como crioprotetor (PARROTT, 1960). Ainda na década de 60, o autotransplante com anastomose vascular (ligando-se os vasos do pedículo ovariano à região da artéria carótida e veia jugular) foi realizado em ovelhas para um acesso mais facilitado às porções venosa e arterial da circulação ovariana. Com esta técnica,

os pesquisadores conseguiram por angiografia, coletas de material para histologia e análise do efluente venoso ovariano compreender de forma mais aprofundada a fisiologia reprodutiva, traçando inclusive o perfil de secreção de alguns hormônios como, por exemplo, a progesterona (GODING, 1966).

O transplante ovariano continuou ocupando lugar de destaque apenas em investigações experimentais até ser utilizado na prática da medicina reprodutiva humana pela primeira vez em 1977 (KROHN, 1977), mas foi novamente deixado em segundo plano após o advento da fecundação *in vitro* (FIV) (BIGGERS, 1982).

Entretanto, a restauração da fertilidade em ratos após o transplante do ovário inteiro congelado foi descrita pela primeira vez somente há alguns anos (WANG et al., 2002). Ainda não foi observada diferença estatística na viabilidade folicular ou taxas de folículos primordiais normais entre ovários expostos ou não aos crioprotetores, também não houve qualquer diferença para estes parâmetros entre protocolos de vitrificação utilizando diferentes soluções de crioprotetores (dimetilsufóxido, formamida e propilenoglicol) (COURBIERE et al., 2005).

Nos últimos anos, houve muito progresso científico na área dos transplantes gonadais e outros órgãos reprodutivos (tuba uterina e útero). Esses avanços serão mais bem abordados no último item desta revisão de literatura.

### **2.3. O ovário – Estrutura e função**

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

A produção de gametas femininos funcionais é essencial para a propagação de todas as espécies vertebradas. O crescimento e desenvolvimento de oócitos contidos nos folículos ovarianos têm fascinado a ciência há séculos, e pesquisadores têm realizado estudos bastante concisos sobre o papel das células foliculares (células da granulosa e teca) na promoção da oogênese e posterior disposição do oócito no oviduto para ovulação. O desafio para o futuro está na identificação dos fatores que interferem nesse processo e conhecimento dos mecanismos intra-ovarianos que permitem essa comunicação bidirecional entre o oócito e as demais células que compõem o folículo (MATZUK et al., 2002).

Um dos fatores que vem estimulando esses estudos está no conhecimento já difundido entre os estudiosos no assunto de que em mamíferos, a reserva de folículos primordiais estabiliza-se na vida fetal ou logo após o nascimento dependendo da espécie; e que 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 da fêmea (99%) (HIRSHFIELD, 1988). Por esses motivos, seria de grande benefício se estes folículos, destinados a tornarem-se atrésicos, pudessem ser recuperados antes de sua degeneração (SAHA et al., 2000) e, já que essa reserva nunca será repostada ao longo da vida da fêmea, é que algumas linhas de pesquisa, buscando o crescimento e desenvolvimento desses folículos até sua fase antral, têm sido incansáveis (OKTAY et al., 1995). É neste contexto que os trabalhos na área de transplantes gonadais estão despertando o interesse científico.

#### **2.4. Aplicações e limitações dos transplantes gonadais**

A coordenação da formação folicular e o início da ativação dos folículos primordiais em roedores após o nascimento, 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 possível inibição proveniente da zona mais central da região medular do ovário (FORTUNE et al., 2000). Ainda de acordo com os mesmos autores, 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. Um fato que contraria essa hipótese é aquele que ocorre quando fragmentos corticais de ovários bovinos ou babuínos são transplantados *in ovo* (geralmente na membrana cório-alantóide - CAM), e a ativação espontânea dos folículos não é observada.

O transplante do ovário preserva a função desta gônada e minimiza os efeitos indesejáveis do climatério precoce em mulheres ovariectomizadas (STIFF et al., 1997). Isto se deve ao fato do ovário de mamíferos, quando transplantado para sítio ectópico, tornar-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 podem ser necessárias, frequentemente obscurecem o objetivo original de alguns trabalhos (WOOD, 1982).

Teoricamente, existem cinco caminhos possíveis à maturação oocitária: o auto, o alo ou o xenotransplante, a maturação *in vitro* (MIV), e a transferência nuclear. Cada uma dessas técnicas tem suas utilidades e limitações. Com relação ao transplante autólogo 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 transplante, 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

infeciosos ou o risco de alteração do genoma do receptor, como ocorre no xenotransplante. No entanto, a limitação do transplante autólogo, que também deve ser extensível às demais técnicas de transplante, está relacionada à necessidade de constante monitoramento do paciente (AUBARD, 2003).

Pode-se ainda transplantar o ovário para o tecido subcutâneo do antebraço (OKTAY et al., 2004) sendo nesse último caso, necessária a FIV para obter-se gestação e nascimento, configurando assim, limitação ao uso dessa técnica. Além disso, o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vitro* ainda é desafio a ser vencido, sendo seu principal objetivo 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 MIV e FIV (CECCONI, 2002).

Outras diferentes aplicações dos transplantes ovarianos podem ser citadas, dentre elas temos a manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer com os ovários, ou parte deles, criopreservados para serem transplantados em sua posição anatômica original após sessões de quimio ou radioterapia, para o posterior nascimento de crianças saudáveis (DONNEZ et al., 2004).

A recente evolução no tratamento do câncer oferece não só nova perspectiva de sobrevivência, mas também a melhoria da qualidade de vida. Mulheres em tratamento de câncer normalmente são desaconselhadas a engravidar ou se submetem a interrupção do tratamento médico caso estejam grávidas. Ainda hoje, existe uma falta de consciência ou desinformação quanto às opções de preservação do potencial de fertilidade dessas pacientes. Publicações recentes referem nascimentos a partir do transplante de tecido ovariano de mulheres acometidas pelo câncer (MORISHITA et al., 1994; DONNEZ et al., 2004; MEIROW et al., 2005a; SILBER & GOSDEN, 2007). Se aliarmos esses fatos à relevância clínica do tema, poderemos finalmente conseguir conciliar o tratamento médico de algumas enfermidades, a manutenção da fertilidade e das condições orgânicas desses indivíduos.

A perda ou dano de órgãos reprodutivos podem ocorrer por falência ovariana prematura (FOP), exposição à radioterapia e/ou quimioterapia, neoplasias do trato genital ou sistêmica que resultem em remoção ou perda da função desses órgãos; além disso, o ovário é susceptível a danos permanentes provocados por uma variedade de fármacos e tratamentos médicos (BEDAIWY et al., 2008).

A principal preocupação relacionada aos transplantes de tecido ovariano avasculares está na qualidade dos oócitos e longevidade do transplante, uma vez que esse tecido sofre isquemia até que ocorra a neovascularização. Por esta razão, o transplante do ovário junto ao seu pedículo vascular vem sendo proposto (JEREMIAS et al., 2002). Uma complexa cascata de eventos denominada “injúria de reperfusão”, causada pela hipotermia tecidual pré-transplante, isquemia, reaquecimento e reperfusão, está associada com danos ao órgão transplantado. Estas lesões podem ser diminuídas pela isquemia fria que preserva o tecido a baixas temperaturas com tampão de proteção. Isso ajudaria a prevenir o retardo na função ou falência precoce do tecido transplantado (BOOM et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002).

Apesar do crescente interesse em estudos que utilizam técnicas de transplante ovariano com reanastomose vascular (WRANNING et al., 2010), a comparação cirúrgica de técnicas avasculares é normalmente conduzida em experimentos por questões de praticidade e facilidade de execução, além dos resultados satisfatórios obtidos por alguns autores (CALLEJO et al., 2002; KODAMA et al., 2010). A maior parte dos trabalhos que tratam dessa questão, se detém a determinar a viabilidade dos tecidos transplantados e suas células (OKTAY et al., 2001) sem, contudo, detalhar a metodologia cirúrgica, nem tampouco seus aspectos, que uma vez descritos e estabelecidos como válidos, podem ser relevantes para viabilizar uma técnica e extinguir quaisquer dúvidas sobre suas possíveis aplicações.

## **2.5. A atividade ovariana e seus efeitos na composição corporal**

A deficiência de estrogênio causada pela perda da função ovariana está relacionada com o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas (dislipidemia, resistência à insulina e diabetes tipo II) e distúrbios comportamentais como mudanças de humor e diminuição da memória (RASGON & JARVIK, 2004; KAAJA, 2008; WEBER & MAPSTONE, 2009). Estes resultados sugerem que doenças neurodegenerativas ou perda de memória devem ser consideradas como resultado de uma síndrome metabólica e que as mulheres na pós-menopausa são mais vulneráveis a estas doenças que aquelas jovens. Por esses e outros motivos, a perda da função gonadal tem sido considerada como fator determinante para as consequências deletérias que o envelhecimento provoca sobre a função cerebral (ALONSO et al., 2010). Assim, alguns dados clínicos já demonstraram o efeito benéfico na memória e habilidades cognitivas de mulheres na pós-menopausa usando terapia de reposição hormonal (SIMPKINS et al., 1994).

Outras investigações, dessa vez realizadas em roedores, demonstraram que a proteção contra a lesão cerebral isquêmica desaparece após a ovariectomia (SIMPKINS et al., 1997) e que pode ser restaurada pela reposição de estrogênio (PELLIGRINO et al., 1998). Contrariamente, estudos anteriores demonstraram que o tratamento com estradiol não impediu a perda de memória associada ao envelhecimento (ALONSO et al., 2006), porém a sensibilidade à insulina foi melhorada. Dois anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores comprovou que o tratamento com estradiol foi eficiente o bastante para melhorar alguns aspectos da homeostase neuronal afetada pelo envelhecimento (ALONSO et al., 2008).

Os benefícios da terapia estrogênica na prevenção e tratamento dos efeitos do envelhecimento, alterações fisiológicas e doenças neurodegenerativas podem advir da ação neuroprotetora e possíveis benefícios desses hormônios sobre a função cognitiva, principalmente aquelas relacionadas às propriedades antioxidantes dos estrogênios (GARCIA-SEGURA et al., 2001; OGE et al., 2003).

Já está comprovado também que o estrógeno pode exercer efeitos complexos sobre aprendizagem e memória em ratos, que revelam claro declínio com o envelhecimento similar ao dos seres humanos, constituindo modelo animal apropriado para estudar os efeitos dos estrogênios e fitoestrogênios sobre o envelhecimento (ALONSO et al., 2010).

Porém, a ausência da atividade ovariana pode acarretar ainda vários outros distúrbios orgânicos. Em animais adultos, as alterações ósseas após a ovariectomia (OSH) são semelhantes às encontradas em mulheres após a menopausa ou após a gonadectomia, em que a densidade mineral óssea decresce rapidamente devido à hipoestrogenemia, resultando em deterioração da microarquitetura óssea e, conseqüentemente, aumento no risco de fraturas em razão do desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea (SCHMIDT et al., 2006).

Sabe-se que os estrógenos podem atuar sobre o metabolismo e a remodelação óssea por mecanismos indiretos, afetando a concentração dos hormônios calcitropicos, e por mecanismos diretos, atuando sobre receptores específicos nas células ósseas. O estrógeno diminui a sensibilidade óssea ao paratormônio (PTH), aumenta a atividade da hidroxilase renal e a absorção intestinal de cálcio. Em diferentes estudos, cadelas adultas submetidas à ovariectomia ou OSH apresentaram maior número de espaços de reabsorção óssea por  $\text{mm}^2$  quando comparadas a cadelas não-ovariectomizadas (SCHMIDT et al., 2006).

As radiografias convencionais não são suficientes para detectar mudanças menores que 30% na mineralização óssea; para isso, são necessários métodos mais acurados como, por exemplo, a densitometria óssea (GARTON et al., 1994), ou a análise química da carcaça, onde as cinzas representariam todo o conteúdo inorgânico ou mineral do organismo.

Existem ainda outros relatos sobre os efeitos dos andrógenos no metabolismo (YANASE et al., 2008; SAAD & GOOREN, 2009; GENTILE et al., 2010), e já se sabe que a deficiência de estrogênio está diretamente relacionada

ao controle da homeostase energética no sexo feminino (SIMPSON et al., 2005), e também está envolvida nas alterações de distribuição da gordura corporal, mobilização de ácidos graxos e capacidade de absorção da glicose pelos diferentes tecidos (TOTH et al., 2000; JONES et al., 2007).

A ovariectomia em ratas conduz a alterações no consumo de energia, bem como, na proporção entre massa corporal e gordura (RICHARD et al., 1987; SIMPSON et al., 2005; HERTRAMPF et al., 2007), além de provocar resistência à insulina nos animais; em contrapartida, a reposição estrogênica antagoniza positivamente todos esses efeitos (BAILEY & AHMED-SOROUR, 1980).

Dentre os métodos disponíveis para determinação da composição corporal em roedores, a análise química da carcaça pode ser considerada como a forma mais precisa para avaliação das frações de água, gordura, proteína e cinzas (DONATO JR et al., 2006; FRANCO, 2009; ROGERO et al., 2010), nos permitindo inferir sobre a real constituição orgânica dos indivíduos e analisar diversos aspectos fisiológicos, metabólicos e clínicos dos animais avaliados.

Entretanto, ainda não se conhece qual a influência da produção hormonal oriunda dos tecidos ovarianos transplantados sobre a composição corporal, quando comparada a animais não-ovariectomizados e ovariectomizados.

## **2.6. O útero frente à produção hormonal ovariana**

Durante o ciclo estral, o útero das fêmeas domésticas é submetido a variado número de transformações morfológicas sob a influência do estrógeno e da progesterona. A atividade cíclica feminina manifesta-se macro e microscopicamente, assim como comportamentalmente. Esses vários estágios morfológicos, funcionais e comportamentais estão diretamente relacionados ao ciclo estral (BANKS, 1991).

É sabido que, durante o ciclo estral de ratas, bem como em outros animais, são observadas fases de atuação do estrógeno (proestro e estro) e da

progesterona (metaestro e diestro) (WITZ et al., 1999; BOUCHER et al., 2000; PIVA et al., 2001).

Diversos estudos foram realizados com objetivo de testar o efeito de várias substâncias hormonais sobre o útero de modelos experimentais ovariectomizados. Dentre esses podemos citar aqueles que testaram a tibolona (PANTALEÃO et al., 2009), medroxiprogesterona (MENDONÇA et al., 2004; 2006), estrogênio conjugado equino (Ece) (MORAES et al., 2006), raloxifeno (Ral) (MORAES et al., 2006), L-tiroxina (OLIVEIRA et al., 2005), propiltiouracil (SILVA et al., 2004), dentre outros. Porém, a literatura vigente ainda não divulgou estudo que observasse que consequências o transplante ovariano poderia impor ao útero de fêmeas previamente ovariectomizadas.

Os estrogênios são esteróides sintetizados a partir do colesterol e exercem ação proliferativa sobre o endométrio, tanto no estroma quanto nos epitélios de revestimento e glandular (AZEVEDO, 2002). Por esta razão, estes hormônios podem levar à proliferação das células endometriais e desenvolvimento gradual de hiperplasia, hiperplasia atípica e câncer endometrial (PERSSON, 2000), bem como aumentar o risco para câncer de mama, por estarem associados com a proliferação e promoção de tumores responsivos aos estrogênios (HANKINSON et al., 1998).

O aumento do peso uterino em ratas castradas submetidas a tratamento com isoflavonas tem sido bem documentado, e é dependente da dose utilizada (ISHIMI et al., 2000; PICHERIT et al., 2001; UESUGI et al., 2001). Estes autores avaliaram diferentes doses de genisteína e observaram que esta substância previne a perda de massa óssea em ratas ovariectomizadas e tratadas, com ou sem efeito uterotrópico, a depender da dose utilizada. Também já se demonstrou aumento do peso uterino e efeitos diretos sobre a uretra de ratas ovariectomizadas submetidas à administração precoce do extrato de isoflavona, devido à promoção da atividade estrogênica. Quando essa administração é realizada tardiamente, as consequências decorrentes da ovariectomia nesses órgãos não são revertidas (SANTOS et al., 2010). Entretanto, a avaliação das

glândulas endometriais em animais que receberam transplante ovariano ainda não foi verificada.

Em roedores, a produção de secreção uterina a partir das glândulas endometriais é necessária para o estabelecimento da receptividade uterina e futura implantação do concepto. A adenogênese uterina é o processo pelo qual ocorre o desenvolvimento das glândulas endometriais. Nos seres humanos, esse processo começa no feto, continua após o nascimento, e é completado durante a puberdade. Entretanto, em ovinos, suínos e roedores este evento ocorre essencialmente pós-parto. Normalmente, a adenogênese endometrial envolve diferenciação e germinação do epitélio glandular a partir do epitélio superficial, seguida por invaginação, extensa proliferação tubular e formação de ramificações por todo o estroma uterino (GRAY et al., 2001).

Em roedores, vários fatores, incluindo o fator inibidor de leucemia e calcitonina, são produzidos exclusivamente pelas glândulas uterinas (STEWART & CULLINAN, 1997; CARSON et al., 2000) mesmo que estas não sejam tão ramificadas quanto nos demais mamíferos (GRAY et al., 2001). Durante o período pré-implantação do embrião nesses roedores, as glândulas endometriais sintetizam e secretam diversas proteínas necessárias ao estabelecimento de receptividade uterina e implantação do embrião (STEWART & CULLINAN, 1997; CARSON et al., 2000), e se a gravidez se estabelece, as glândulas endometriais são ablacionadas por decidualização do estroma em resposta à implantação do concepto. Atualmente, não existem informações disponíveis sobre a regeneração das glândulas endometriais após o parto durante a involução uterina nos roedores (GRAY et al., 2001).

A duração da gestação é de 20 dias em camundongos e 21 dias nos ratos. A fusão parcial do ducto paramesonéfrico ocorre por volta dos 15-16 dias de gestação e produz um útero bicornuado. Ao nascimento, o útero das ratas e camundongas não possui glândulas endometriais, sendo constituído apenas de epitélio simples sobre mesênquima indiferenciado. Após cinco dias de nascimento, a invaginação epitelial aparece representando a formação do epitélio glandular

(EG) ramificado (BRODY & CUNHA, 1989). A gênese das glândulas endometriais não é observada até os 7 dias de nascimento em camundongos e dos 9 aos 16 dias em ratos (BRANHAM et al., 1985) e resulta do desenvolvimento de glândulas endometriais simples, diferente do que ocorre nos ungulados.

Segundo SILVA et al. (2004), o desenvolvimento das glândulas endometriais baseia-se na análise do seu produto de secreção obedecendo à seguinte classificação: *grau 1* – secreção fraca na forma de grânulos no citoplasma das células com distribuição multifocal e ausente no lume; *grau 2* – secreção fraca coalescente presente no citoplasma e ápice das células, às vezes com extrusão para o lume; *grau 3* – forte secreção granular ou coalescente no citoplasma das células e glicocálix, porém ausente no lume; e *grau 4* – forte secreção granular ou coalescente no citoplasma das células, no glicocálix e no lume.

## **2.7. Ciclo estral em roedores**

Nos estudos realizados sobre transplante autólogo ovariano, a rata, bem como outros roedores, são os animais mais utilizados para comparação de resultados morfológicos. Além disso, esta espécie apresenta-se como animal de fácil manuseio, obtenção e manutenção.

Apresenta ciclo estral curto, completando-se em torno de quatro a cinco dias, ideal para estudar a recuperação da função ovariana, em curto período de avaliação (GUYTON & HALL, 1997).

A avaliação das mudanças estruturais nas células do epitélio vaginal é empregada como método não invasivo para documentar o ciclo reprodutivo em animais de laboratório e, fornece ainda, um indicador confiável sobre o estado funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (GOLDMAN et al., 2007).

Alguns anos após a descoberta de STOCKARD & PAPANICOLAOU, publicada em 1917, sobre as mudanças rítmicas na aparência das células epiteliais da mucosa vaginal de cobaias, LONG & EVANS publicaram em 1922,

um trabalho considerado marco que caracterizou o ciclo estral de ratas, sendo este último utilizado até os dias atuais como estudo padrão. Segundo estes e outros autores (MANDL, 1951; COOPER et al., 1993; MARCONDES et al., 2002), a caracterização de cada uma das fases (proestro, estro, metaestro e diestro) é baseada na proporção entre três tipos celulares observados na citologia vaginal: células epiteliais (basais e parabasais), queratinizadas ou superficiais (nucleadas ou anucleadas) e leucócitos.

O padrão estabelecido primeiramente por LONG & EVANS em 1922, comprovado e citado por diversas investigações posteriores, descreve que para um ciclo normal de quatro dias, o proestro é identificado pela presença de células epiteliais nucleadas que se aglomeram em círculos, mantendo uma aparência granular ao microscópio óptico. Ocasionalmente, estas células podem formar cordões celulares. Esta fase dura geralmente 24 horas, sendo seguida pelo estro, identificado rotineiramente devido a presença de grande número de células superficiais (queratinizadas ou de descamação) inicialmente nucleadas que dobram sobre seu próprio eixo adotando um formato semelhante a pequenas agulhas, estas podem apresentar ainda um formato mais arredondado com bordas irregulares. O predomínio das células queratinizadas também dura 24 horas, no ciclo de 4 dias, ou pode ocorrer durante 48 horas consecutivas num ciclo de 5 dias. Células epiteliais ainda não queratinizadas (denominadas por alguns autores como células “pavimento”) poderão, alternativamente, estar presentes durante o período que precede a infiltração leucocitária. O metaestro consiste no período de transição entre o final do estro e fase inicial do primeiro dia do diestro (diestro 1 ou inicial). Esta fase do ciclo é caracterizada por uma combinação de leucócitos, células queratinizadas e epiteliais arredondadas (basais ou parabasais). Estas células geralmente persistem durante os dois primeiros dias do diestro, sendo observadas juntamente com leucócitos em concentração bastante variável no esfregaço ou lavado vaginal. O segundo dia do diestro (diestro 2 ou final) pode demonstrar pequena quantidade de células epiteliais nucleadas (organizadas em alguns cordões celulares), que anunciam a chegada do proestro um dia depois.

Algumas ratas com um ciclo regular de 5 dias podem apresentar três dias consecutivos de diestro, ao invés dos dois dias, mencionados anteriormente.

Alguns procedimentos são utilizados para avaliação das células vaginais. Amostras podem ou não ser fixadas com várias formulações à base de etanol, com ou sem a necessidade de pré-secagem antes da coloração. Diversos tipos de corantes são preconizados (azul de metileno, azul de toluidina, hematoxilina, eosina, panótico, colorações de *Giemsa*, tricrômica de *Shorr* ou *Papanicolaou*) porém, é interessante observar que os mais pesados são normalmente evitados, pois sofrem precipitação, e as lâminas são lavadas em solução isenta de sais após a coloração. As observações sem coloração podem ser utilizadas sem prejuízos à avaliação citológica e pesquisadores vem adotando esta metodologia por questões de praticidade e rapidez de análise (MARCONDES et al., 2002; GOLDMAN et al., 2007).

Diversos autores (REITER et al., 1981; TAMARKIN et al., 1985; SANTOS et al., 2003) já relataram a influência da glândula pineal sobre a fisiologia reprodutiva e ciclicidade de mamíferos, inclusive roedores. Essa influência, esta relacionada à síntese e liberação de uma substância antigonadotrófica, chamada melatonina (TAMARKIN et al., 1985; SANTOS et al., 2003). Esta substância tem sua síntese estimulada no escuro e, ocorre menor secreção, quando os animais são expostos à luz. Esta liberação de melatonina pode ser controlada experimentalmente a partir da determinação dos tempos de claro ou escuro aos quais os animais serão submetidos, sincronizando assim, o ciclo estral e suas fases (REITER, 1991; 1993; WEAVER et al., 1993; TEIXEIRA et al., 2002; SANTOS et al., 2003).

## **2.8. Estado da arte**

O transplante de tecido ovariano surgiu há mais de um século como alternativa ao cultivo *in vitro* de folículos, dada a necessidade do desenvolvimento de um sistema de cultivo que promovesse o crescimento dos folículos pré-antrais (FOPA) a um estágio no qual possam ser maturados e fecundados *in vitro*,

permitindo a obtenção de uma grande população de oócitos homogêneos, evitando que se tornem atrésicos (McCAFFERY et al., 2000; SAHA et al., 2000).

Entretanto, apesar dos recentes avanços nesta área, 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 transplante, 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).

Paralelamente, a técnica de maturação folicular *in vitro* vem sendo objeto de diversos estudos. Contudo, 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) ou provenientes de folículos secundários (GUPTA et al., 2008; MAGALHÃES, et al., 2010).

O transplante de tecido ovariano visa, além do cultivo, a manutenção da função endócrina e restauração da capacidade reprodutiva (PETROIANU et al., 2004a), podendo também ser utilizado para restaurar a fertilidade de fêmeas com infertilidade adquirida (CAMPBELL et al., 2000).

Estudos experimentais foram executados com o objetivo de conhecer a técnica cirúrgica mais adequada e eficiente para realização do transplante, bem como, quais locais do organismo permitem um melhor desenvolvimento do tecido transplantado, sem que aquele escolhido para atuar como receptor, seja prejudicado em suas funções (GUNASENA et al., 1997a; ALBERTI et al., 2002; ISRAELY et al., 2003; CESCHIN et al., 2004; D'ACAMPORA et al., 2004; PETROIANU et al., 2004b; BRITO et al., 2005; HANSSEN et al., 2005; LEE et al., 2005; WOLNER- SCHMIDT et al., 2005; PETROIANU et al., 2006; YANG et al., 2006; MACEDO, 2007a).

Dentre os trabalhos acima, poucos obtiveram insucesso em seus resultados como, por exemplo, o que foi realizado com transplante de ovário íntegro no

omento maior (bolsa omental) de ratas, resultando em morte do tecido transplantado, sugerindo que o transplante de fragmentos ovarianos seja mais adequado pela facilidade de revascularização (BRITO et al., 2005).

Entretanto, a maioria dos estudos realizados obteve êxito. Por exemplo, naqueles em que o tecido ovariano foi transplantado heterotopicamente para o antebraço (WOLNER-HANSEN 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 bolsa ovárica sem anastomose vascular em ratas (GUNASENA et al., 1997a; PETROIANU et al., 2004b; 2006).

O caso mais recente de nascimento em humanos utilizando a técnica de transplante autólogo e ortotópico ovariano foi relatado por um grupo de pesquisadores da Dinamarca. Uma mulher deu à luz a duas crianças saudáveis após transplante à tuba uterina de fragmentos de tecido ovariano submetidos à congelação antes de um tratamento quimioterápico contra o câncer e posterior descongelação. O primeiro nascimento ocorreu após FIV e o segundo por concepção natural. Isto sugeriu que há uma boa chance de restauração da fertilidade natural após o transplante de tecido ovariano e que a criopreservação e o procedimento de transplante em si não prejudicam a função ovariana normal (ERNST et al., 2010). Anteriormente, oito nascimentos em humanos já haviam sido relatados como resultados de transplante de córtex ovariano após congelação e descongelação de fragmentos (DONNEZ et al., 2004; MEIROW et al., 2005b; DEMEESTERE et al., 2007; ANDERSEN et al., 2008; SILBER et al., 2008; SÀNCHEZ-SERRANO et al., 2010).

A localização anatômica escolhida para receber o transplante 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 o insucesso da técnica pode ser devido à injúria sofrida pelo tecido transplantado,

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.

Em observações desta proponente durante o seu mestrado, verificou-se que os tecidos ovarianos, quando transplantados sob a cápsula renal de ratas apresentam estabilização do suprimento sanguíneo após uma semana de pós-cirúrgico (MACEDO, 2007a).

Embora os transplantes 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 transplante 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 a 70% no tamanho do transplante 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).

Transplantes 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 em receptora (CARROL et al., 1990; WATERHOUSE et al., 2004). A cápsula renal promove ainda uma maior taxa de recuperação folicular quando comparada ao tecido subcutâneo; provavelmente, devido ao vasto suprimento vascular, que facilita o estabelecimento do transplante 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).

Existe relato de nascimento em animais, derivado de transplante localizado no tecido subcutâneo, ocorrido em macaco, resultante também de embriões que foram transferidos para mães substitutas (LEE et al., 2004). Um embrião humano de quatro células foi produzido por injeção intracitoplasmática espermática num oócito coletado de um tecido ovariano transplantado subcutaneamente na parede abdominal. Entretanto, este embrião não se desenvolveu até o nascimento após ser implantado no útero da paciente (OKTAY et al., 2004).

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

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

✓ Verificar de que forma o transplante autólogo ovariano nos diferentes sítios anatômicos preconizados pode vir a influenciar diversos aspectos orgânicos de ratas ovariectomizadas.

#### **3.2. Específicos**

✓ Descrever a técnica cirúrgica para realização do transplante autólogo ovariano em diferentes sítios anatômicos;

✓ Determinar a viabilidade do protocolo anestésico com tribromoetanol para execução das cirurgias;

✓ Acompanhar por meio de colpocitologia vaginal o retorno ao ciclo estral dos animais transplantados;

✓ Observar histopatologicamente após seis meses qual o grau de interação entre os tecidos receptor e transplantado;

✓ Avaliar histopatologicamente o útero e o respectivo estágio endometrial dos animais transplantados e não-transplantados após seis meses;

✓ Comparar a composição corporal dos animais transplantados e daqueles pertencentes aos grupos controle;

✓ Analisar quantitativa e qualitativamente os folículos presentes nos ovários íntegros e transplantados para os diferentes locais propostos.

#### 4. HIPÓTESES

- ✓ Todas as técnicas propostas para realização do transplante autólogo ovariano são viáveis e reproduzíveis experimentalmente sem complicações;
- ✓ O retorno da atividade hormonal ovariana e ciclicidade dos animais podem ser observados através da colpocitologia vaginal.
- ✓ A técnica de transplante autólogo ovariano permite desenvolvimento folicular satisfatório sem danos aos tecidos escolhidos para exercer a função de sítio anatômico receptor.
- ✓ A avaliação histomorfométrica do útero dos animais transplantados é semelhante àquela observada nos animais não-ovariectomizados.
- ✓ A composição corporal dos animais transplantados é semelhante àquela observada nos animais não-ovariectomizados.
- ✓ A população folicular dos animais com transplante na região de confluência dos vasos femorais é a maior dentre aqueles transplantados.

## 5. 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 016320-07.

### 5.1. Animais e manejo

Foram utilizadas 54 ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultas, pesando entre 200-300g, procedentes do Biotério da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba. Os animais foram mantidos durante a fase experimental, no Biotério do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, 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 ao local de manutenção, os animais foram submetidos à quarentena, e mantidos durante todo o experimento numa população máxima de três animais por caixa (49x34x16cm), tendo livre acesso à água e ração comercial (apropriada para a espécie<sup>1</sup>), girassol fornecido semanalmente, sob ciclo claro-escuro de 12:12 horas, controlados por temporizador analógico<sup>2</sup>.

Duas vezes por semana era realizada a limpeza das caixas, substituição da maravalha e o reabastecimento de água e ração nos comedouros. Nestes momentos, os animais foram avaliados quanto ao seu estado de saúde geral e quaisquer intercorrências observadas, eram devidamente registradas. Durante os 180 dias de experimento, todos os animais foram submetidos individualmente à

---

<sup>1</sup> Labina Animais de Laboratório, Nestlé Purina PetCare Company, Paulínia-SP.

<sup>2</sup> Temporizador Analógico, Decorlux TE-1163, Curitiba-PR.

pesagem. Aproveitava-se o instante da troca de caixas para viabilizar este procedimento de mensuração do peso e posterior anotação dos resultados.

## 5.2. Grupos e tratamentos

Os animais foram subdivididos aleatoriamente em seis grupos experimentais conforme tabela a seguir. Desses, dois grupos constituíram os controles, um de animais não-ovariectomizados (grupo A) e outro de ovariectomizados (grupo B).

Os demais foram compostos por animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida do procedimento de transplante autólogo, sob a cápsula renal (grupo C), tecido subcutâneo (grupo D), bolsa ovárica (grupo E) e região de confluência dos grandes vasos femorais (grupo F), conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ratas utilizadas no experimento (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

<b>GRUPOS</b>	<b>TRATAMENTOS</b>
A (n=09)	Não-ovariectomizados
B (n=09)	Ovariectomizados
C (n=09)	Ovariectomizados com transplante sob a cápsula renal
D (n=09)	Ovariectomizados com transplante no tecido subcutâneo
E (n=09)	Ovariectomizados com transplante na bolsa ovárica
F (n=09)	Ovariectomizados com transplante nos vasos femorais

n: número de animais por grupo.

### 5.3. Instrumental cirúrgico

Para realização dos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia bilateral e transplante autólogo ovariano, foram utilizados instrumentais cirúrgicos apropriados à microcirurgia, incluindo tesouras, pinças (hemostáticas, para tecidos, de dissecação e de campo), cabos para lâmina de bisturi, e material auxiliar (apêndice A).

### 5.4. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

Em roedores não são necessários jejum hídrico e alimentar. Os animais receberam tribromoetanol (TBE)<sup>3</sup> 2,5% (0,025g/mL), diluído em solução fisiológica e administrado via intraperitoneal (IP), na dose de 250mg de TBE/kg. As dosagens foram ajustadas individualmente, quando necessário, durante o procedimento cirúrgico para manutenção do plano anestésico desejado (estabilidade das frequências cardíaca e respiratória, bem como, ausência de resposta ao estímulo doloroso, permitindo a realização da técnica cirúrgica).

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, realizou antissepsia com clorexidina 2%<sup>4</sup>, seguida pela colocação de panos de campo. Todos os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral por incisão sublombas direita e esquerda de aproximadamente 1cm, sempre caudal à última costela, com lâmina de bisturi n°23 em cabo n°4. Após identificação dos órgãos internos, o pedículo ovariano foi delicadamente tracionado, procedendo-se, em seguida, a ligadura deste por meio

---

<sup>3</sup> 2, 2, 2-tribromoethanol, Sigma–Aldrich, St Louis, MO.

<sup>4</sup> Riohex, Digluconato de clorexidina 2%, Solução Tópica Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto-SP.

de sutura com fio absorvível (catgut simples 4-0 agulhado<sup>5</sup>) e posterior secção com tesoura imediatamente posterior à ligadura executada. As estruturas recém-ligadas foram cuidadosamente inspecionadas, quanto a possíveis hemorragias e reposicionadas no abdômen.

O ovário esquerdo removido, durante esta ovariectomia, foi seccionado, resultando em vários fragmentos corticais de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>, tomando-se sempre a precaução de não selecionar aqueles que contivessem folículos antrais visíveis. Os fragmentos foram imersos em solução fisiológica estéril (0,9%NaCl) contida numa placa de Petri<sup>6</sup> até o momento do transplante. Os ovários direitos foram identificados separadamente e encaminhados para controle histopatológico.

Todos os procedimentos para inserção dos transplantes foram realizados após a ovariectomia bilateral e foi padronizada a inserção de três fragmentos para cada um dos sítios receptores.

O procedimento de inserção do transplante sob a cápsula renal foi realizado no rim esquerdo, pois este está posicionado anatomicamente mais caudal que o seu contralateral e, portanto de acesso cirúrgico mais facilitado. Após isolamento e tracionamento cuidadoso, o rim esquerdo foi apoiado entre os dedos polegar e indicador, procedendo-se pequena secção em sua cápsula com auxílio da pinça de íris denteada. Os fragmentos previamente selecionados e seccionados procedentes do ovário esquerdo deste animal foram inseridos cuidadosamente através da secção realizada, alocando-os na região desejada (pólo cranial do rim). A pinça foi removida promovendo-se hemostasia criteriosa com auxílio das compressas de gaze hidrófila estéril<sup>7</sup> por compressão local, evitando assim posteriores aderências a este órgão. Não havendo sangramentos, o rim foi devolvido à sua posição anatômica de origem.

O procedimento de inserção do transplante no tecido subcutâneo teve como local padronizado a linha imediatamente ventral ao local da sutura da musculatura abdominal esquerda para facilitar a visualização e identificação de possíveis

---

<sup>5</sup> Catgut Simples 4-0, Brasuture, São Sebastião da Grama-SP.

<sup>6</sup> Placa de Petri, vidro, 100x15mm, CRAL, Cotia-SP.

<sup>7</sup> Compressa de gaze hidrófila estéril, 11 F, CREMER, Blumenau-SC.

migrações do tecido transplantado. Os fragmentos foram posicionados neste local preconizado sem fixação cirúrgica.

Para o procedimento de transplante na bolsa ovárica esquerda, promoveu-se a abertura cuidadosa dessa estrutura com auxílio da tesoura de íris, dissecou-se o ovário esquerdo, que foi fragmentado em seguida, conforme metodologia descrita anteriormente. Os fragmentos selecionados foram inseridos na bolsa ovárica realizando posteriormente uma sutura de fechamento desta com fio inabsorvível monofilamento de nylon 6-0 agulhado<sup>8</sup>.

Por fim, o procedimento de transplante na região de confluência dos grandes vasos femorais foi realizado após pequena incisão realizada sobre a face interna da coxa esquerda, promovendo-se dissecação e divulsão dos planos musculares, localização da estrutura desejada (confluência dos aspectos venosos e arteriais dessa região) e sutura dos fragmentos previamente selecionados à camada mais externa desses vasos (serosa) com fio inabsorvível monofilamento de nylon 6-0 agulhado. Assim como este, todos os procedimentos aqui descritos foram finalizados pela rafia (pontos simples separados) dos demais planos cirúrgicos com fio inabsorvível (monofilamento nylon 5-0 agulhado<sup>9</sup>).

Ao final do procedimento cirúrgico foi preenchida uma ficha de controle com os seguintes parâmetros: período de latência anestésica após administração intraperitoneal do tribromoetanol, período de ação, analgesia no transcirúrgico, possíveis complicações, tempo para recuperação anestésica, facilidade para execução das ovariectomias e inserção dos transplantes, adequação do instrumental cirúrgico aos procedimentos realizados, complicações pré, trans e pós-cirúrgicas, além do tempo total de cirurgia.

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

---

<sup>8</sup> Nylon Preto Monofilamento 6-0, Brasuture, São Sebastião da Grama-SP.

<sup>9</sup> Nylon Preto Monofilamento 5-0, Brasuture, São Sebastião de Grama – SP.

infecção. Os animais receberam medicação anti-inflamatória<sup>10</sup>, na dosagem de 2mg/kg por via intramuscular (IM) a cada 12 horas, durante 3 dias.

Após estes procedimentos, os animais foram mantidos em experimento e sob observação diária durante 180 dias para avaliação de outros parâmetros.

### **5.5. Colpocitologia vaginal em meio líquido**

Transcorridos 7 (sete) dias dos procedimentos de ovariectomia e transplante, iniciou-se o acompanhamento indireto do retorno à atividade hormonal dos animais pela realização de colpocitologia vaginal em meio líquido a cada 12 horas. Para obtenção das amostras, foi realizada a contenção física dos animais seguida pela introdução de 200µL de solução fisiológica estéril (0,9%NaCl), a temperatura ambiente, na vagina dos modelos experimentais com auxílio de uma micropipeta de volume ajustável. O mesmo volume foi retirado e reintroduzido pelo menos três vezes para que o lavado vaginal resultasse no maior número de células possível. A ponteira foi introduzida apenas na parte inicial da vagina para que não provocasse lesões locais ou qualquer desconforto aos modelos experimentais. Para cada animal, devidamente identificado, foi obtida uma amostra, que era coletada e posteriormente inserida em microtubos<sup>11</sup>. No Laboratório de Reprodução Animal, as amostras foram retiradas dos microtubos e inseridas com arranjo pré-definido (figura 1), em forma de gota numa placa de Petri estéril até o momento das análises sem coloração ou contraste de fase em microscópio óptico com aumento de 20x. É importante ressaltar que foram utilizados uma ponteira e um microtubo para cada amostra, e os grupos eram analisados em placas diferentes.

Os tipos celulares reconhecidos em nossas avaliações seguiram o padrão determinado em estudos anteriores (LONG & EVANS, 1922; MANDL, 1951;

---

<sup>10</sup> Azium Solução, dexametasona intramuscular ou intravenoso, FR. 10mL, Schering-Plough Coopers, São Paulo-SP.

<sup>11</sup> Microtubo tipo Eppendorf, 200µL, CRAL, Cotia-SP.

COOPER et al., 1993; MARCONDES et al., 2002). A proporção entre essas células foi utilizada para determinação das fases do ciclo estral.

Após identificação do retorno à ciclicidade, procedeu-se a avaliação de três ciclos estrais completos. Para o controle experimental, antes dos procedimentos cirúrgicos todos os animais também foram submetidos à colpocitologia, analisando-se na ocasião, a ocorrência de dois ciclos estrais completos.

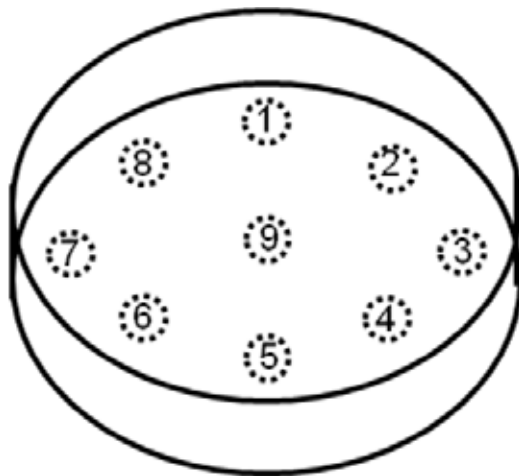


Figura 1 - Esquema das amostras em gotas individuais, organizadas por grupo, na placa de Petri, coletadas por colpocitologia vaginal em meio líquido para posterior observação em microscópio óptico, sem coloração, ou contraste de fase, e determinação da fase do ciclo estral.

## 5.6. Histopatologia do útero e ovários

Transcorridos os 180 dias de avaliação promoveu-se a eutanásia dos animais. Em seguida, tanto os ovários das fêmeas não-ovariectomizadas (grupo A), quanto os tecidos ovarianos transplantados dos locais especificados no delineamento experimental, foram removidos em bloco junto ao tecido receptor subjacente e imersos em solução de Bouin por 24 horas, identificados por grupo e animal e remetidos para posterior processamento histológico de rotina.

Para os tecidos ovarianos, os cortes foram realizados à espessura de 5 $\mu$ m de forma semi-seriada, com corte montado em lâmina a cada 60 $\mu$ m. As lâminas foram alternadamente coradas com Hematoxilina-Eosina<sup>12</sup> (HE) e Tricrômico de

<sup>12</sup> Hematoxilina Harris-Eosina Amarelada, Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

Masson (TM)<sup>13</sup> conforme BEHMER et al. (1976). Os ovários dos animais ovariectomizados no início do experimento (grupo B) foram submetidos ao mesmo procedimento histológico descrito acima.

Os folículos observados tanto nos ovários inteiros quanto nos fragmentos de tecido ovariano removidos após os 180 dias de transplante foram morfológicamente classificados segundo PEDERSEN & PETERS (1968). Esta classificação está baseada no tipo e número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito. Os pré-antrais são subdivididos em primordiais, de transição, primários e secundários. Os primordiais contêm oócito circundado por uma camada parcial ou completa de células pavimentosas da granulosa; os intermediários ou de transição, são formados por uma camada de células da granulosa com células pavimentosas e cúbicas; os primários demonstram uma camada simples de células da granulosa cúbicas e os secundários, possuem mais de uma camada de células da granulosa cúbicas sem antro visível. Os folículos antrais são classificados em antrais iniciais, antrais e pré-ovulatórios. Em todos eles estão evidentes e bem diferenciadas as camadas de células da granulosa e da teca. Os antrais iniciais possuem uma, ou mais, pequenas áreas de fluido folicular (antro); os antrais mostram uma única e grande cavidade antral enquanto os pré-ovulatórios, contêm um alo ou camada de células do *cumulus* circundando o oócito.

Folículos foram considerados atrésicos quando havia picnose nuclear nas células da granulosa ou o oócito apresentava sinais de degeneração (ISRAELY et al., 2003). Utilizaram-se também como critérios a descontinuidade da lâmina basal com fibras de tecido conectivo ao redor, condensação de heterocromatina, descontinuidade focal no oolema, irregularidades no perfil nuclear, grupos de gotas lipídicas ou pequenos vacúolos (CAMBONI et al., 2005).

Os folículos ovarianos visualizados foram contabilizados e devidamente classificados quando evidenciavam o núcleo do oócito. A análise morfométrica foi

---

<sup>13</sup> Fucsina Ácida- Ácido Fosfomolibdico-Azul de Metileno, Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

feita com auxílio de ocular micrométrica, e objetivas de 10x, 20x, e 40x, a depender do tamanho do folículo. A morfometria dos folículos ovarianos classificados como 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):

$$N_t = \frac{N_o \times S_t \times t_s}{S_o \times d_o}$$

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 ( $\mu\text{m}$ );  $S_o$  = número total de secções observadas; e  $d_o$  = 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.

Coletaram-se amostras da região do corpo uterino de todos os animais, que foram imersas também em solução de Bouin para posterior procedimento de desidratação e diafanização. A inclusão deste material em Histosec<sup>14</sup>® foi executada para permitir a observação nas lâminas histológicas de cortes transversais dos cornos uterinos. Na sequência, os blocos foram cortados à espessura de 5 $\mu\text{m}$  e os cortes obtidos, corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A investigação histopatológica incluiu a análise histomorfométrica das camadas uterinas (endométrio, miométrio e perimétrio), descrição do grau de desenvolvimento glandular endometrial, caracterização das fases endometriais

<sup>14</sup> Histosec® pastillas (sem DMSO), Merck, Darmstadt, Germany.

(atrófica ou afuncional, proliferativa e secretória), obedecendo a parâmetros descritos por SILVA et al. (2004), além da quantificação de glândulas endometriais. Para avaliação histomorfométrica do útero, um corte histológico foi selecionado aleatoriamente e dividido em quatro quadrantes. Em cada um desses, mensurações foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica em objetiva de 10x em pontos equidistantes, totalizando quatro repetições para cada parâmetro avaliado (altura do epitélio superficial, espessura do estroma endometrial, espessura do miométrio e espessura total do útero). A figura 2 esquematiza como eram realizadas essas mensurações.

Os tecidos ovarianos transplantados foram avaliados quanto à vascularização, luteinização e sinais de rejeição (presença de tecido conjuntivo, ausência de tecido ovariano funcional e presença de células leucocitárias); bem como com relação às características específicas dos folículos, mencionadas anteriormente, como morfologia, morfometria e estimativa da população. Os órgãos receptores, por sua vez, foram avaliados quanto às possíveis alterações funcionais e estruturais ocorridas após os seis meses de transplante.

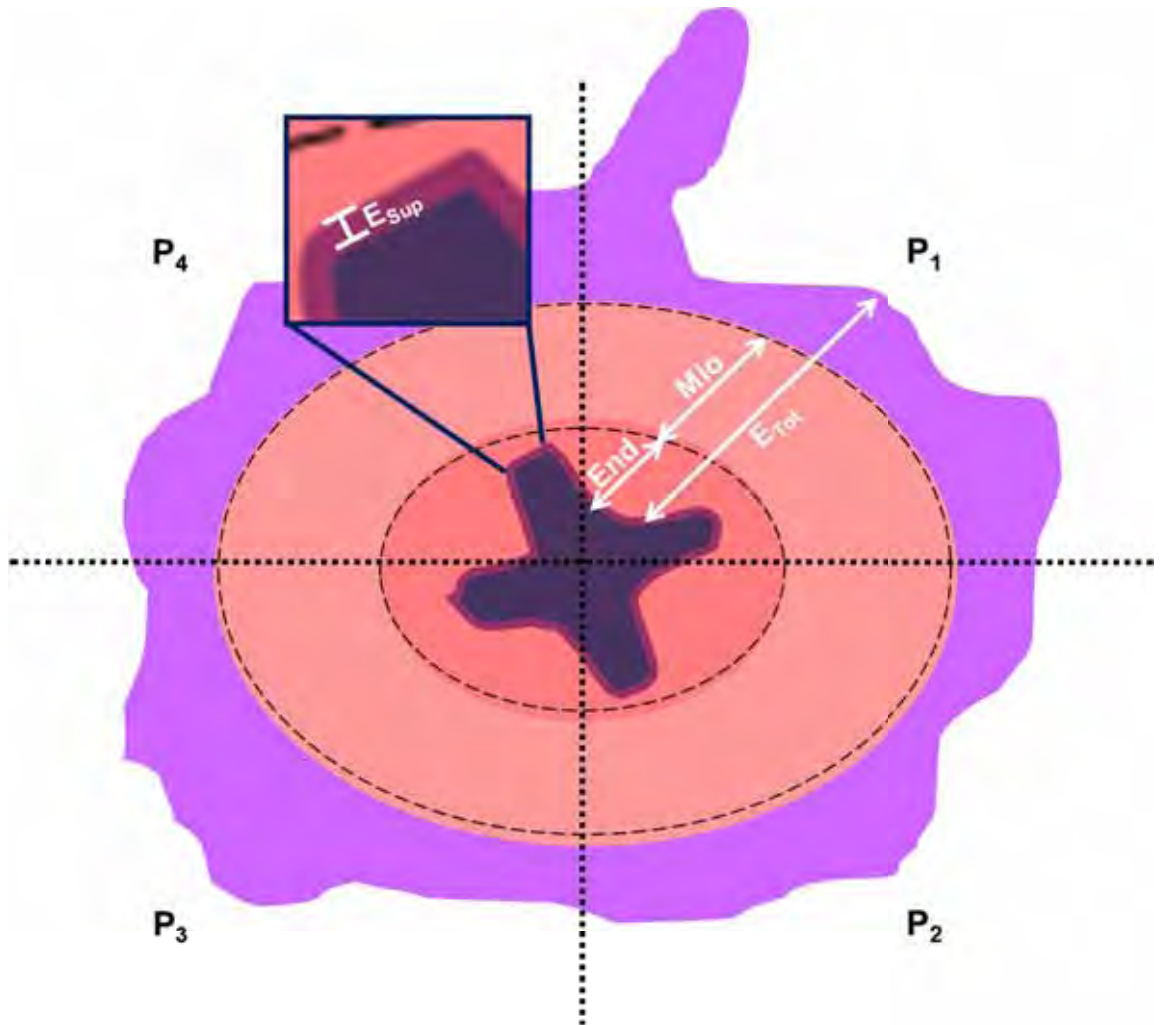


Figura 2 - Esquema de corte transversal do corpo do útero de ratas. Observar a divisão do corte histológico em quadrantes para obtenção de quatro valores (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> e P<sub>4</sub>) para cada uma das mensurações: altura do epitélio superficial (E<sub>Sup</sub>), espessuras do estroma endometrial (End), miométrio (Mio) e total (E<sub>Tot</sub>). As setas duplas (↔) indicam onde começa e termina cada camada uterina mensurada. O detalhe ampliado da imagem demonstra como mensurar corretamente a altura do epitélio superficial.

### 5.7. Análise química da carcaça

A metodologia descrita neste item foi adaptada a partir dos métodos preconizados por SILVA & QUEIROZ (2006) para determinação de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB) em alimentos.

Após a coleta de material para avaliação histopatológica, todos os modelos experimentais eutanasiados foram alocados separadamente (embalagens plásticas duplas), identificados (grupo e animal) e congelados até que fosse realizado o processamento.

Aleatoriamente, 4 (quatro) animais de cada grupo foram selecionados para análise química da carcaça em que foram avaliados os seguintes parâmetros: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína bruta (PB). Todas as avaliações foram feitas em duplicata adotando-se uma variação menor que 5% entre as repetições.

Matéria seca - devido ao alto teor de umidade das amostras foram realizados dois procedimentos para obtenção do valor de matéria seca: matéria pré-seca ou parcialmente seca e matéria seca propriamente dita. A função da primeira é facilitar o acondicionamento e posterior análise pela redução do volume total da amostra, já que esta proporciona a redução, apenas parcial, da umidade. E a outra, extrai completamente a umidade da amostra, permitindo assim, a obtenção do real valor da matéria seca da amostra (%). Para realização da matéria pré-seca ou parcialmente seca, as amostras trituradas e previamente homogeneizadas em moinho de carne foram acondicionadas de forma individual e uniforme em recipientes de alumínio, também previamente pesados (tara). Essas amostras foram pesadas em balança analítica (precisão de quatro casas decimais) e colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C durante 6 dias. Durante este período, as amostras foram homogeneizadas a cada 8 horas a fim de obter uma maior superfície exposta à secagem. Após os seis dias, as amostras foram retiradas da estufa, e novamente pesadas após o equilíbrio entre as temperaturas

das amostras e do ambiente. Assim, os dados foram inseridos na fórmula para cálculo:

$$\%matéria\ seca\ parcial = \frac{(\text{peso da amostra seca} - \text{tara recipiente})}{(\text{peso da amostra úmida} - \text{tara recipiente})} \times 100$$

Após este procedimento, as amostras foram submetidas à moagem final e homogeneização em moinho de bola e, acondicionadas para congelação e análises posteriores em recipientes plásticos devidamente identificados.

O passo seguinte foi a avaliação da matéria seca. Para esta análise, cadinhos de porcelana foram previamente lavados, secos (estufa 105°C) e queimados em mufla (550°C). Antes de todos os procedimentos de pesagem, os cadinhos eram cuidadosamente acondicionados em dessecadores para impedir que estes tivessem contato com umidade e fossem refrigerados até o equilíbrio com a temperatura ambiente. Para pesar as amostras pré-secas, os cadinhos foram pesados (tara), devidamente identificados, e neles se adicionou aproximadamente 2,0g de amostra. Os cadinhos contendo as amostras foram levados à estufa 105°C por 16 horas. Após este período, os cadinhos foram retirados da estufa com auxílio de pinça apropriada, colocados em dessecadores, e então se realizou nova pesagem. Os dados obtidos foram inseridos na fórmula abaixo para cálculo da matéria seca.

$$\%matéria\ seca = \frac{(\text{peso da amostra seca} - \text{tara recipiente})}{(\text{peso da amostra pré-seca})} \times 100$$

Matéria mineral – com intuito de otimizar as avaliações, os cadinhos contendo as amostras já submetidas à matéria seca (105°C), foram aproveitados para análise da matéria mineral ou cinzas. Para tanto, após a última pesagem do método anterior, os cadinhos foram queimados em mufla a 550°C durante 3 horas, obtendo-se ao final uma cinza de coloração clara (Figura 3A). Novamente, os

cadinhos foram inseridos no dessecador e pesados. Os dados obtidos, inseridos na fórmula que segue, resultaram na porcentagem de matéria mineral da amostra.

$$\% \text{matéria mineral na MS} = \frac{(\text{peso da amostra pós-mufla} - \text{tara recipiente}) \times 100}{(\text{peso da amostra seca})}$$

Extrato etéreo por hidrólise ácida – esta análise foi realizada pelo método de extração de gordura por hidrólise ácida com recuperação em Aparelho de Soxhlet. Procedeu-se pesagem de aproximadamente 2,0g de amostra pré-seca em tubo plástico cônico com tampa de 50mL (tubo Falcon®). Nesses recipientes foram adicionados 2,0mL de álcool etílico P.A.<sup>15</sup> e homogeneizado seu conteúdo. Seguiu-se com a adição de 10,0mL de solução ácida (700mL de ácido sulfúrico<sup>16</sup>/300mL de água destilada) e nova homogeneização. As amostras foram levadas ao banho-maria a 80°C, homogeneizando as amostras a cada 15 minutos. Transcorridos 40 minutos, promoveu-se a retirada das amostras do banho-maria, acondicionando-as à temperatura ambiente para que esfriassem. Com as amostras frias, os tubos receberam mais 10mL de álcool etílico e foram homogeneizados. Seguidamente, receberam 25mL da mistura de éter (50% éter etílico<sup>17</sup>/50% éter de petróleo<sup>18</sup>) e foram homogeneizadas durante 1 minuto. Os tubos foram levados à centrífuga por 8 minutos a 800 rpm, tomando-se sempre o cuidado de abrir levemente os tubos para que a pressão em seu interior escapasse antes de submetê-los à centrífuga. Transcorridos os 8 minutos, os tubos eram retirados da centrífuga, e o sobrenadante da solução (Figura 3B) era retirado com auxílio da pipeta de Pasteur e passado em papel de filtro. Este filtro era colocado dentro de um funil que por sua vez estava acoplado a um balão volumétrico previamente pesado (tara) e identificado (Figura 3C). Este procedimento foi repetido por 3 (três) vezes e em seguida, os papéis de filtro

<sup>15</sup> Álcool Etílico Absoluto P.A., Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

<sup>16</sup> Ácido Sulfúrico P.A., Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

<sup>17</sup> Éter Etílico P.A., Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

<sup>18</sup> Éter de Petróleo P.A., Dinâmica Química Contemporânea, Diadema-SP.

foram lavados com solução de éter num volume de aproximadamente 10mL ou até que toda a gordura fosse visualmente removida do filtro. O éter contido nos balões foi recuperado no Aparelho de Soxhlet (Figura 3D). Posteriormente, os balões foram colocados em estufa com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 55°C, durante 16 horas, retirados, acondicionados em dessecadores (Figura 3E) e posteriormente pesados (Figura 3F). Os dados obtidos permitiram a obtenção da quantidade de gordura das amostras.

$$\%extrato\ etéreo = \frac{(\text{peso da amostra pós-estufa } 55^{\circ}\text{C} - \text{ tara recipiente})}{(\text{peso da amostra pré-seca})} \times 100$$

Proteína bruta – para esta avaliação utilizou-se um analisador de nitrogênio<sup>19</sup>. Neste aparelho 0,1g de cada amostra pré-seca foi individualmente pesada e embalada em papel alumínio. No programa de computador acoplado ao aparelho registram-se os pesos das amostras, sua identificação e respectivas posições no carrossel. Os valores obtidos de nitrogênio foram corrigidos para matéria seca e expressos em porcentagem.

---

<sup>19</sup> LECO, Modelo FP-258, Nitrogen Analyser, Leco Corporation, St. Joseph, Michigan, EUA.

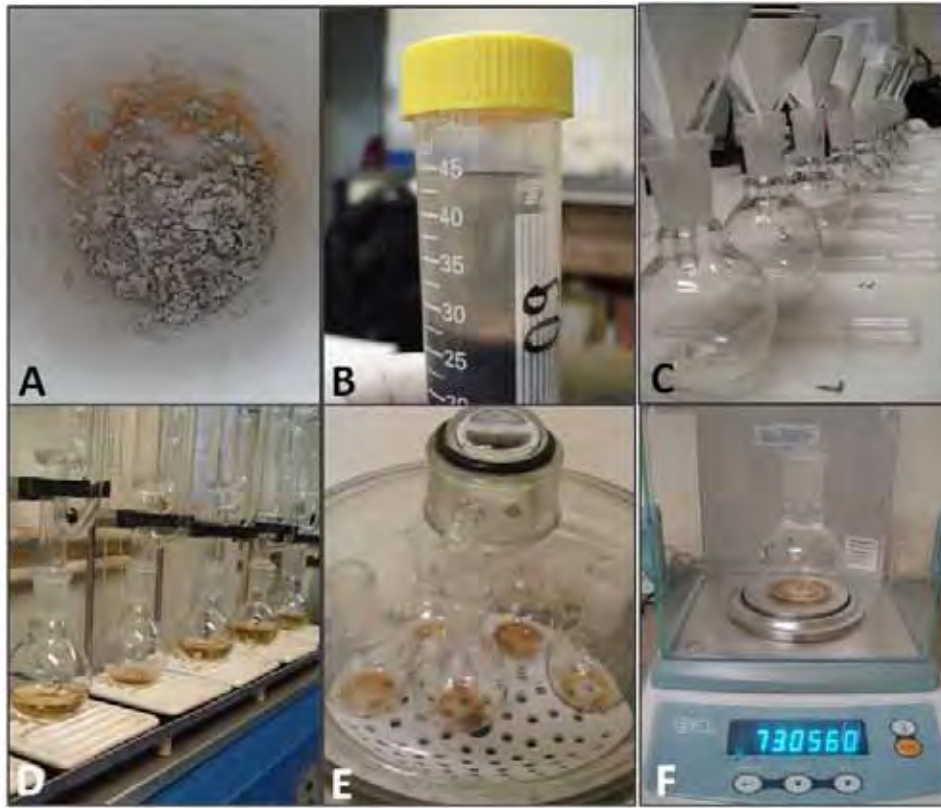


Figura 3 – Imagens ilustrativas de algumas etapas da análise de composição corporal. (A) Cinzas de coloração clara no interior de um cadinho após queima da amostra em mufla; (B) Tubo plástico cônico (Falcon®) demonstrando sobrenadante da solução após a centrifugação da amostra; (C) Balões volumétricos e funis contendo filtros antes da filtração do sobrenadante; (D) Balões volumétricos contendo éter e amostras filtradas durante recuperação no Aparelho de Soxhlet; (E) Amostras dentro do dessecador após 16 horas em estufa de circulação forçada; (F) Última pesagem do balão volumétrico para posterior determinação de extrato etéreo na amostra.

### **5.8. Análise estatística**

As informações qualitativas relativas ao procedimento cirúrgico e análise histopatológica dos tecidos foram expressas de forma descritiva. Os tempos de procedimentos cirúrgicos, dados de composição corporal e peso corpóreo foram analisados comparativamente por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A avaliação histomorfométrica do útero e a duração do ciclo estral foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). A proporção de folículos nas diferentes categorias foi comparada pelo qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expectativa de vida, na maioria das linhagens de ratos varia de 2,5 a 3 anos. Isto significa que animais com 24 meses podem corresponder a um indivíduo humano de 60 anos, devido ao metabolismo acelerado dos murinos (PANTALEÃO et al., 2009). Sendo assim, o período de avaliação deste trabalho realizado em ratas durante 180 dias, correspondeu há aproximadamente 15 anos na vida de uma mulher; tempo suficiente para avaliar como os transplantes atuaram sobre o trato reprodutivo e organismo desses modelos experimentais.

### 6.1. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

A manipulação de modelos experimentais em laboratório, ou biotério, muitas vezes envolve procedimentos que necessitam de sedação ou mesmo anestesia para que sejam executados com a devida segurança e bem-estar dos animais (PAIVA et al., 2005). Nos últimos anos, um hipnótico não comercializado no Brasil, o Avertin<sup>®</sup> (HART et al., 2001; HUTCHISON et al., 2008), passou a ser utilizado em procedimentos cirúrgicos e de rotina também em nossos laboratórios. Seu princípio ativo, o 2,2,2-tribromoetanol (TBE), adquirido sob a forma de cristais, pode ser diluído em álcool amil-terciário ou solução fisiológica 0,9% estéril antes da administração.

Em camundongos, é descrito um alto grau de variabilidade no tempo de indução e anestesia insuficiente com o uso do TBE em camundongos (GARDNER et al., 1995). Na presente investigação, observou-se tempo médio de latência de  $1,5 \pm 0,6$  minutos após administração IP do TBE, sendo este menor que os obtidos em outros trabalhos, onde o tempo de indução variou de 4,42 (LIEGGI et al., 2005a) até 5 (ZELLER et al., 1998) minutos.

Outros parâmetros como, por exemplo, a duração do plano anestésico obtido neste estudo foi de aproximadamente 30 minutos, sendo adequado à realização dos procedimentos cirúrgicos e compatíveis com a maioria dos relatos científicos, que observaram duração de anestesia oscilando entre 25 e 35 minutos (ZELLER

et al., 1998; LIEGGI et al., 2005a), podendo atingir até 55 minutos para que o primeiro reflexo interdigital seja percebido (ZELLER et al., 1998).

A analgesia obtida com a administração do TBE foi considerada adequada na totalidade dos procedimentos (54/54), permitindo a realização dos mesmos com tranquilidade e segurança necessários, oferecendo ainda a analgesia visceral requerida e bom relaxamento muscular, dados estes, que corroboraram a observação de outros autores (PAPAIOANNOU & FOX, 1993; ZELLER et al., 1998). A recuperação anestésica ocorreu após 32 minutos na maioria dos animais anestesiada pelo TBE. Outros relatos fizeram referência a um tempo de recuperação que variou de 21 a 35 minutos (ZELLER et al., 1998; LIEGGI et al., 2005a). Este tempo de recuperação, assim como a intensidade e duração da anestesia, de acordo com observações deste estudo, ocorreram devido à quantidade de anestésicos utilizados nas doses de indução-manutenção associada à eventual necessidade de sobredose no transcirúrgico.

Em ratos, utiliza-se o TBE como anestésico frequentemente na dose de 240-300mg/kg (ZELLER et al., 1998), via intraperitoneal (IP), porém existem investigações que relataram também o uso de 400-450mg/kg (ZELLER et al., 1998; LIEGGI et al., 2005a). Independente da dose utilizada, se tornou consenso ao longo dos anos na comunidade científica, que se houvesse necessidade de estocagem do TBE, esta deveria ser feita em garrafas de vidro coloração ambar, envoltas em papel alumínio e refrigeradas a 4°C por no máximo 6 meses (GOPALAN et al., 2005; REID & TESSAROLLO, 2009).

Em 2005 foi publicado um estudo em que se afirmou não existir qualquer relação entre modo de preparo da solução, condição e forma de estocagem. Segundo este trabalho, o principal fator que poderia vir a influenciar na toxicidade do TBE estava relacionado ao grau de pureza da substância, e que esta variava inclusive dentro do mesmo fornecedor e número de partida (LIEGGI et al., 2005b). Esta informação em específico poderia justificar a razão de não ter-se, neste estudo, constatado qualquer limitação ao uso do TBE, seja esta relacionada aos tempos de indução, manutenção, duração ou recuperação anestésicas, nem

tampouco se observou a ocorrência de óbitos nos modelos experimentais em decorrência de sua utilização, relatos estes que corroboraram os publicados por PAPAIOANNOU & FOX em 1993.

Autores ainda questionavam a segurança do TBE (TARIN & STRURDEE, 1972; ZELLER et al., 1998) outros porém, afirmavam que este anestésico era seguro caso a administração fosse única e seguissem os critérios de preparação, estocagem e administração citados anteriormente (REID et al., 1999; WEISS & ZIMMERMANN, 1999).

Nesta investigação, também não se pode afirmar que existam quaisquer efeitos adversos referentes à administração do TBE. Inclusive na ocasião da coleta de amostras para histopatológico, empregou-se a devida atenção para que qualquer sinal de necrose da parede abdominal, focos de necrose na superfície dos órgãos abdominais, peritonite e aderências no peritônio, fossem percebidos, baseando-se sempre em informações descritas como frequentes na literatura, e nenhum destes sinais foram encontrados.

Não se pode, entretanto, afirmar a partir dos moldes experimentais empregados, que a ausência desses efeitos adversos, foram em decorrência da única administração realizada do TBE, ou estes resultados estão em conformidade com os obtidos por LIEGGI et al. (2005b). Estes autores descreveram a existência de estudos realizados *in vivo* e *in vitro* que demonstram que alguns tipos de cristais, partículas, e até mesmo o talco das luvas cirúrgicas poderiam estimular a sobrevivência de macrófagos e assim contribuir para a inflamação e formação de granulomas (HAMILTON et al., 2000; 2001; WINKLER et al., 2001). Recentemente, um grupo de pesquisadores publicou um trabalho que trata sobre a prevenção de situações como peritonite e aderência de órgãos abdominais. Segundo estes autores, um dos métodos referidos na metodologia para prevenir essas alterações está relacionado ao uso de luvas livres de talco durante as cirurgias (LALOUNTAS et al., 2010).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão para duração dos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia bilateral seguida ou não dos transplantes autólogos para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais em ratas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

<b>GRUPO</b>	<b>Tempo Cirúrgico</b>
Grupo B (n=9)	26,55±8,76
Grupo C (n=9)	26,22±2,63
Grupo D (n=9)	26,00±2,87
Grupo E (n=9)	29,88±3,01
Grupo F (n=9)	27,11±3,33

n= número de animais. Parâmetros avaliados por ANOVA, Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

Quanto aos procedimentos cirúrgicos, não houve diferenças para o tempo médio ( $\pm$ desvio-padrão) das intervenções cirúrgicas (ovariectomia bilateral, processamento do córtex ovariano, transplante autólogo, diérese e sutura dos planos cirúrgicos) para realização dos transplantes na região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais. Os dados deste parâmetro constam da tabela 2.

São poucos os trabalhos que fazem referência ao tempo cirúrgico para procedimentos de transplantes. LIU et al. (2002) relataram que o transplante para a região da cápsula renal de camundongas foi realizado em aproximadamente 30 minutos; tempo este maior que o observado nesta investigação para o mesmo procedimento.

Trabalhos anteriores realizados pela mesma equipe (MACEDO, 2007a) resultaram num tempo médio transcirúrgico de 24 minutos para inserção de um fragmento ovariano sob a região subcapsular do rim, sendo um mínimo de 11 e o máximo de 42 minutos, demonstrando que a curva de aprendizado foi estabelecida ao longo do experimento. Os resultados atuais para inserção de três fragmentos ovarianos em quatro sítios receptores diferentes, com tempos que variaram de 26 a 29 minutos, indicam que a curva de aprendizado para estes

procedimentos foi rigorosamente seguida em experimentos de treinamento prévios.

A importância da curva de aprendizado para redução do tempo cirúrgico, diminuição da perda sanguínea do paciente, menor dor pós-operatória, risco diminuído para complicações trans e pós-cirúrgicas, além do aperfeiçoamento em modelos experimentais antes da implementação de técnicas semelhantes em humanos, já foi reforçada anteriormente por outros pesquisadores (RACHO EL-AKOURI et al., 2002; WRANNING et al., 2008; 2010).

Não houve registro de quaisquer complicações ou limitações trans e pós-cirúrgicas que impedissem a realização dos procedimentos. O instrumental cirúrgico escolhido foi considerado adequado e ofereceu maior precisão aos movimentos e manobras cirúrgicas, características necessárias à execução das técnicas sem injúrias ou lesões aos órgãos manipulados.

Todos os procedimentos realizados nesta investigação foram considerados exequíveis dentro das condições experimentais preconizadas; sendo as técnicas dos transplantes ortotópico para a bolsa ovárica e heterotópico para o tecido subcutâneo, aquelas que exigiram maior e menor precisão e habilidade para correta execução, respectivamente.

Dois animais morreram de causa não relacionada ao procedimento cirúrgico durante os 180 dias de experimento, sendo um deles pertencente ao grupo A e o outro ao grupo C. Portanto, o número de animais desses grupos passou a ser 8 (oito) nas avaliações realizadas após essas mortes.

## 6.2. Acompanhamento do ciclo estral

O padrão determinado anteriormente por outros autores (LONG & EVANS, 1922; MANDL, 1951; COOPER et al., 1993; MARCONDES et al., 2002) permitiu uma avaliação acurada das fases do ciclo estral tanto dos animais utilizados para controle quanto daqueles transplantados. As fases do ciclo estral e suas respectivas características estão demonstradas na figura 4.

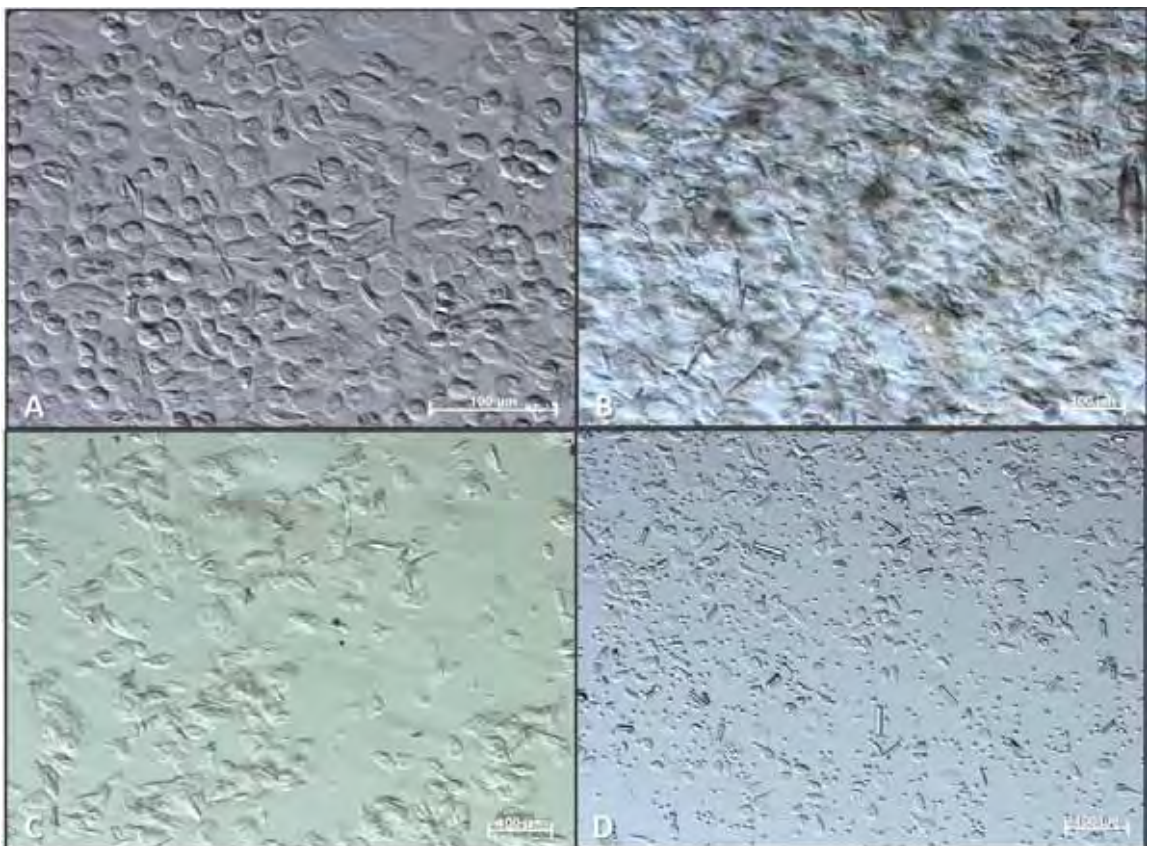


Figura 4 - Fotomicrografia das fases do ciclo estral observadas após coleta por colpocitologia vaginal em meio líquido de ratas submetidas ao transplante autólogo ovariano. A. Proestro com inúmeras células epiteliais arredondadas e nucleadas (basais e parabasais); animal do grupo transplantado para região de confluência dos vasos femorais; B. Estro com presença de células queratinizadas em maior proporção; animal do grupo transplantado para tecido subcutâneo; C. Metaestro demonstrado pela redução significativa na quantidade de células queratinizadas, início da infiltração leucocitária e surgimento de algumas células epiteliais; animal do grupo transplantado para região subcapsular do rim; D. Diestro com pequena proporção de células epiteliais e queratinizadas e maior quantidade de células leucocitárias; animal do grupo transplantado para bolsa ovárica. Microscopia óptica, sem contraste de fase, sem coloração. Barra: 100µm.

O volume de solução salina (200 $\mu$ L) utilizado para colpocitologia neste estudo, também seguiu a recomendação (0,2-0,25mL) de outros autores (GOLDMAN et al., 2007) e foi considerado adequado, permitindo a coleta de material suficiente para análise, sem a inconveniente necessidade de diluição e eventual presença de dois focos de células devido à concentração da amostra coletada, relatado por MARCONDES et al. (2002), que utilizaram volume menor de solução salina (10-20 $\mu$ L) para executar o mesmo procedimento.

Os animais passaram a permitir o procedimento de coleta com maior tranquilidade após terceiro dia ou sexta coleta. MARCONDES et al. (2002) referiram período menor de adaptação, com facilidade de manipulação para execução da colpocitologia após o primeiro ou segundo dia de coleta, com intervalo de 24 horas entre elas.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão para duração das fases do ciclo estral em horas de ratas não-transplantadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

FASE DO CICLO	Duração das fases do ciclo estral (h)	
	Não-transplantadas	Transplantadas
Proestro	39,42 $\pm$ 15,80 <sup>a</sup>	40,96 $\pm$ 21,72 <sup>a</sup>
Estro	22,69 $\pm$ 7,33 <sup>a</sup>	48,33 $\pm$ 24,93 <sup>b</sup>
Metaestro	3,21 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>	4,50 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>
Diestro	34,28 $\pm$ 16,08 <sup>a</sup>	19,28 $\pm$ 15,88 <sup>b</sup>

a, b, c, d: letras diferentes na mesma linha indicam valores diferentes, ANOVA, Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ).

A observação do ciclo estral, realizada como controle experimental, antes dos procedimentos cirúrgicos de ovariectomia bilateral e transplante autólogo resultou numa duração total de 4 (quatro) dias, sendo o proestro e diestro as fases mais longas com 39 e 34 horas respectivamente, seguidas do estro, com 22 horas de duração e metaestro, que foi a fase mais curta tendo pouco mais de 3 (três) horas. Estes tempos são, em parte, compatíveis com dados descritos por LONG & EVANS (1922) em seu estudo pioneiro, à exceção do proestro, que segundo este

autores dura em média 24 horas, e do diestro, que deveria ter a duração de 48 horas.

Após os procedimentos de transplante, a duração do ciclo estral passou a ser de aproximadamente 5 (cinco) dias completos, para todos os animais transplantados, sendo desta vez, o estro a fase mais longa com 48 horas, em seguida o proestro com duração de 40 horas, diestro reduzido para 19 horas e metaestro com 4 horas. DAMOUS et al. (2009) também observaram predominância do estro em relação às demais fases do ciclo estral quando transplantaram o ovário íntegro no retroperitônio próximo à artéria ilíaca comum.

Num ciclo regular de 5 dias completos, LONG & EVANS (1922) descreveram que um estro de até 48 horas é normal, porém esperava-se para este tipo de ciclo, que o diestro perdurasse por 3 dias e o proestro 24 horas. O estro e diestro sofreram as maiores modificações quanto ao fator tempo, com aumento e redução, respectivamente, em suas durações quando comparado ao ciclo do animal não-transplantado. O proestro e metaestro não sofreram alterações quando comparados aos dados obtidos antes dos transplantes.

Ao tomar como base apenas os resultados do presente estudo, pode-se afirmar que as alterações se restringiram ao prolongamento do estro e redução do diestro, já que para as demais fases, não houve alteração quando se comparam os dados obtidos antes e após os procedimentos de transplante. Porém, se a comparação for entre a duração das fases do ciclo estral obtida neste estudo com aquela observada em outros trabalhos (LONG & EVANS, 1922; COOPER et al., 1993) se percebeu que existem diferenças mesmo antes da execução dos transplantes. Estas podem ser atribuídas a metodologia diferente, com ciclo de luz maior que o adotado neste experimento, além dos fatores relacionados ao clima distinto, que poderia favorecer maior fotoperíodo e a prevalência de fases mais longas, como o proestro.

O diestro mais curto e o estro mais longo podem ser justificados quando se observam cuidadosamente os dados referentes à população folicular que constam na tabela 9. Nos grupos transplantados, houve uma proporção de folículos antrais

maior que a observada nos ovários utilizados como controle. É possível inferir, que essa maior proporção de folículos antrais, promoveu maior atividade estrogênica e por consequência maior duração de fases caracteristicamente estrogênicas como o proestro e estro, em detrimento das demais. Os dados referentes à duração do ciclo estral constam da tabela 3.

O retorno do ciclo estral ocorreu em todos os animais (17/17) dos grupos que receberam o transplante na região subcapsular do rim e tecido subcutâneo, em 88,88% (8/9) dos animais transplantados na bolsa ovárica e em 55,55% (5/9) daqueles com transplante na região de confluência dos vasos femorais.

A partir de exames colpocitológicos, outros autores fizeram referência sobre o percentual de animais que retornaram ao estro após procedimentos de transplante ovariano. LIU et al. (2002) relataram que todos os animais submetidos ao transplante na cápsula renal apresentaram sinais de atividade estrogênica, resultados que corroboram os obtidos nesta investigação. CORLETA et al. (1998) afirmaram que 87,5% dos animais submetidos ao transplante no tecido subcutâneo retornaram ao estro, sendo este índice inferior ao obtido neste estudo.

Com resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, AUBARD et al. (1998), referiram que 100% dos animais submetidos ao transplante ortotópico retornaram ao estro. DAMOUS et al. (2009) também descreveram uma taxa de 100% de retorno ao estro para ratas submetidas ao transplante ovariano no retroperitônio, próximo à artéria ilíaca comum. O referido trabalho foi utilizado para comparação de resultados porque efetuou o transplante ovariano em ratas sem anastomose vascular, numa região próxima a um grande vaso, sendo este tratamento, semelhante ao realizado neste trabalho que, em um dos grupos, transplantou o tecido ovariano na região de confluência dos vasos femorais (grupo F).

Dos resultados obtidos nesta tese, a taxa de retorno ao estro dos animais do grupo F foi o mais discrepante quando os comparados aos descritos na literatura para transplantes ovarianos em roedores. Porém, algumas questões como o condicionamento isquêmico (PCI) utilizado por DAMOUS et al. (2009) devem ser considerados, pois influenciaram direta e positivamente no retorno ao ciclo

estral dos animais transplantados se comparados aos que não foram submetidos ao PCI.

O condicionamento isquêmico consiste basicamente numa manobra cirúrgica em que são empregados ciclos curtos de isquemia sucedidos por reperfusão (YELLON et al., 1998; ATTKISS et al., 1999; WEBSTER, 2005). Esta técnica comprovadamente protege tecidos submetidos a períodos longos de isquemia (FACUNDO, 2007), como os que ocorrem nos transplantes.

Tabela 4 - Média e desvio-padrão do retorno ao estro em dias de ratas submetidas aos transplantes autólogos ovarianos para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

<b>GRUPO</b>	<b>Retorno ao estro (dias)</b>
Grupo C (n=8)	18,87±1,72
Grupo D (n=9)	17,88±3,14
Grupo E (n=8)	18,12±2,16
Grupo F (n=5)	19,80±6,72

n= número de animais transplantados que manifestaram retorno ao estro. Parâmetros avaliados por ANOVA, Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

O primeiro estro ocorreu em média 17-19 dias depois dos procedimentos de transplante conforme dados da tabela 4. Não houve diferença entre os grupos transplantados quanto a este parâmetro. Os relatos que constam da literatura não corroboram estes resultados, pois o tempo para os primeiros sinais de retorno ao ciclo estral foi sempre menor.

LIU et al. (2002), relataram período de 11 dias para retorno ao ciclo estral quando o transplante foi realizado para a cápsula renal. Em outra investigação, autores referiram retorno ao ciclo estral 15 dias depois do transplante ovariano ortotópico em camundongas (GUNASENA et al., 1997b). Porém, estes pesquisadores realizaram ambos os procedimentos em camundongas submetidas a um regime de claro e escuro com 14:10 horas, maior que o empregado neste estudo, o que pode ter induzido um fotoperíodo maior e consequente aumento da

atividade estrogênica. Além desses fatores, se pode atribuir este retorno mais rápido da função ovariana em decorrência do metabolismo da camundonga que é mais acelerado que o da rata.

CALLEJO et al. (1999) verificaram que houve retorno ao ciclo estral em ratas, 10 dias após os procedimentos de transplante no tecido subcutâneo próximo ao plexo vascular inguinal. Estes dados diferiram dos deste estudo e, esta distinção pode ser justificada por um dos achados da avaliação histopatológica. Observou-se que nas imediações do fio cirúrgico, utilizado para fixar os tecidos na região de confluência dos vasos femorais, havia uma quantidade significativa de tecido conjuntivo frouxo onde deveria existir apenas tecido ovariano.

O fato de ter sido utilizado o monofilamento de nylon ultrapassando o fragmento de tecido ovariano pode ter provocado uma lesão seguida de resposta tecidual, diminuindo a quantidade de tecido ovariano disponível para produção hormonal e conseqüentemente, reduzindo a manifestação de retorno ao estro na avaliação colpocitológica. Esta hipótese ganha respaldo quando observamos que CALLEJO et al. (1999) utilizaram poliglactina (Vicryl<sup>®</sup>), ao invés do monofilamento de nylon, para fixar periféricamente os fragmentos de tecido ovariano na mesma região, reduzindo as chances de reação tecidual no local de fixação e conseqüentemente, fornecendo melhores condições para a sobrevivência folicular.

### 6.3. Peso corpóreo e análise química da carcaça

Tabela 5 - Média e desvio-padrão do peso corpóreo em gramas de ratas antes e 180 dias depois do início do experimento (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

GRUPO	Início do Experimento	Final do Experimento
Grupo A	285,11 ± 23,68 <sup>a,A</sup>	336,00 ± 35,95 <sup>a,A</sup>
Grupo B	282,44 ± 17,96 <sup>a,A</sup>	402,22 ± 45,47 <sup>b,B</sup>
Grupo C	264,78 ± 28,24 <sup>a,A</sup>	334,44 ± 56,57 <sup>a,B</sup>
Grupo D	276,22 ± 29,03 <sup>a,A</sup>	327,67 ± 37,49 <sup>a,A</sup>
Grupo E	272,22 ± 23,75 <sup>a,A</sup>	328,67 ± 35,78 <sup>a,B</sup>
Grupo F	280,11 ± 24,60 <sup>a,A</sup>	386,33 ± 57,88 <sup>b,B</sup>

a, b: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes, A, B: letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam valores diferentes, ANOVA, Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Grupo A: animais não-ovarietomizados; Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

O peso corpóreo dos animais, registrado antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, não apresentou diferenças quanto ao grupo. Isto demonstrou a padronização dos modelos experimentais e colocou-os em condição de igualdade para instituição dos tratamentos preconizados no delineamento experimental deste trabalho. Entretanto, quando estes valores são comparados àqueles registrados após os 180 dias de tratamento, percebeu-se que ocorreram algumas modificações referentes aos animais do grupo em que se realizou apenas ovariectomia bilateral e aqueles em que, além da ovariectomia bilateral, foram realizados os transplantes para a região subcapsular do rim, bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais (tabela 5).

Quando são analisados apenas os resultados obtidos após os 180 dias de experimento, foi possível notar que o grupo F teve comportamento semelhante ao do grupo B (tabela 5). Estes dados permitem inferir que foi possível reproduzir experimentalmente, com a ovariectomia bilateral, um modelo de insuficiência estrogênica, mimetizando as alterações que ocorrem em mulheres por ocasião da Falência Ovariana Prematura (FOP). Nestas situações a interrupção da síntese de estrógenos promove um conjunto de distúrbios orgânicos, dentre eles, o aumento

do peso corpóreo. Segundo alguns autores, este ganho de peso pode estar relacionado a mudanças na homeostase energética e metabolismo (SIMPSON et al., 2005; ZOTH et al., 2010).

O comportamento do grupo B, quanto à insuficiência estrogênica foi perfeitamente compreensível, já que estes animais foram submetidos à ovariectomia bilateral; porém, para que seja possível entender o resultado estatisticamente semelhante do grupo F, faz-se necessário um esclarecimento.

Todos os modelos experimentais foram submetidos ao procedimento de pesagem semanal. Entretanto, ao realizar o acompanhamento do ciclo estral, percebeu-se que no grupo F, apenas 55,5% (5/9) dos animais demonstraram sinais colpocitológicos de retorno ao estro, sendo possível inferir que quase metade deles não respondeu satisfatoriamente ao transplante por fatores já mencionados no subitem anterior (ciclo estral). Sendo assim, a média deste grupo para peso corpóreo foi maior que a observada nos demais grupos transplantados e semelhante a do grupo ovariectomizado bilateralmente. Esta hipótese ganha força quando observamos que os grupos submetidos ao transplante na cápsula renal, tecido subcutâneo e bolsa ovárica, apresentaram peso corpóreo semelhante ao do grupo não-ovariectomizado.

Resultados semelhantes foram observados por CALLEJO et al. (1999). Estes pesquisadores descreveram aumento do peso corpóreo em ratas submetidas ao transplante no tecido subcutâneo próximo ao plexo vascular inguinal e avaliadas também após seis meses. Coincidentemente, esta região é anatomicamente próxima àquela preconizada no grupo F deste trabalho.

Tabela 6 - Média e desvio-padrão dos percentuais (%) de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e proteína (PB) expressos na matéria natural de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas após análise química da carcaça (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

GRUPO	MS	MM	EE	PB
Grupo A (n=4)	42,83±2,26 <sup>a</sup>	6,91±0,46 <sup>a</sup>	40,97±2,35 <sup>a</sup>	37,26±2,77 <sup>a</sup>
Grupo B (n=4)	54,35±11,83 <sup>b</sup>	5,09±0,80 <sup>b</sup>	50,22±2,21 <sup>b</sup>	27,16±2,61 <sup>b</sup>
Grupo C (n=4)	41,30±2,80 <sup>a</sup>	8,47±1,41 <sup>c</sup>	39,24±1,62 <sup>a</sup>	42,22±4,86 <sup>a</sup>
Grupo D (n=4)	40,63±1,02 <sup>a</sup>	8,74±1,26 <sup>c</sup>	41,00±2,04 <sup>a</sup>	42,07±2,30 <sup>a</sup>
Grupo E (n=4)	41,29±1,68 <sup>a</sup>	8,63±1,19 <sup>c</sup>	41,28±3,14 <sup>a</sup>	41,29±3,59 <sup>a</sup>
Grupo F (n=4)	50,34±2,28 <sup>b</sup>	6,06±0,47 <sup>a</sup>	51,84±3,26 <sup>b</sup>	30,43±4,10 <sup>b</sup>

n= número de animais avaliados em cada grupo. a, b, c, d: letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes, ANOVA, Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Grupo A: animais não-ovariectomizados; Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

Os resultados que surgiram após análise química da carcaça deixaram claro que para os parâmetros matéria seca, extrato etéreo e proteína bruta o comportamento entre os grupos foi semelhante. Os animais dos grupos ovariectomizados e ovariectomizados que receberam transplante na região de confluência dos vasos femorais não apresentaram diferença estatística. O mesmo pode ser observado quando comparamos os animais não-ovariectomizados com aqueles ovariectomizados que receberam transplantes na região subcapsular do rim, tecido subcutâneo e bolsa ovárica (tabela 5). Isso demonstrou que o comportamento hormonal entre esses grupos foi semelhante.

Tratando especificamente do grupo F, devem ser acrescentadas outras informações. A análise da composição corporal, descrita na metodologia deste trabalho, foi realizada em quatro animais selecionados aleatoriamente em cada grupo.

Ao observar conjuntamente os resultados, ao término de todas as análises, percebeu-se que três dos quatro animais deste grupo, ou seja, 75% da amostra eram compostas por exemplares em que o transplante autólogo não se comportou dentro do esperado. É, portanto compreensível, que este grupo tenha o mesmo

resultado quando comparado aos animais ovariectomizados, permitindo inferir que a produção hormonal e os percentuais de MS, EE e PB, sejam semelhantes.

Seguindo a mesma linha de pensamento, fica simples compreender, resultados semelhantes entre as amostras dos grupos não-ovariectomizado, transplantados para cápsula renal, subcutâneo e bolsa ovárica, para estes mesmos parâmetros. Os teores de matéria seca dos grupos B e F foram maiores que o observado nos demais grupos. A matéria seca desses grupos foi maior quando comparado ao resultado das outras amostras. O que provavelmente acentuou essa elevação foi o extrato etéreo. O EE maior nos grupos em que a produção estrogênica não foi satisfatória está bem fundamentado na literatura.

A deficiência de estrógeno no organismo tem papel fundamental no controle da homeostase energética de fêmeas (SIMPSON et al., 2005; ZOTH et al., 2010). Neste contexto estão envolvidas mudanças na distribuição da gordura corpórea, mobilização de ácidos graxos e maior capacidade de absorção da glicose por diferentes tecidos (TOTH et al., 2000; JONES et al., 2007; ZOTH et al., 2010).

O aumento drástico no peso corpóreo e adiposidade, com perda de massa muscular, também foi observada em linhagens de camundongos geneticamente modificados para deficiência na síntese de aromatase (aromatase knockout - ArKO), enzima expressa nos roedores e humanos, em vários tecidos periféricos. Ela é membro da família P450, produto do gene CYP19, e atua na aromatização de andrógenos em estrógenos. Além de ovários, testículos e placenta, a aromatase é expressa nas células mesenquimais do tecido adiposo, osteoblastos e condrócitos do tecido ósseo, músculo liso vascular e endotelial, bem como, em inúmeros locais do cérebro (SIMPSON et al., 2005).

É possível inferir que essas informações reforçam a hipótese de que os resultados obtidos neste estudo podem ser justificados pela ausência de estrógeno circulante no organismo de animais ovariectomizados e que receberam transplante sem sucesso na região dos vasos femorais, desencadeando toda a série de alterações comprovadas a partir dos dados de composição corporal.

Observando os resultados de análise química da carcaça, principalmente MS, EE e PB, dos animais não-ovariectomizados e daqueles em que, além da ovariectomia bilateral, foram realizados os transplantes para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo e bolsa ovárica, foi possível constatar que a produção hormonal foi satisfatória, pois não houve diferença para estes parâmetros. Sendo assim, conseguiu-se comprovar que o transplante autólogo ovariano pode atuar de forma semelhante a reposição estrogênica exógena em fêmeas ovariectomizadas, tomando por base as informações de outros autores que conseguiram reverter os efeitos deletérios da insuficiência estrogênica, seja provocada por ovariectomia ou ação de substâncias tóxicas ao tecido ovariano, e recuperar funções orgânicas específicas (BAILEY & AHMED-SOROUR, 1980; PELLIGRINO et al., 1998; GARCIA-SEGURA et al., 2001; OGE et al., 2003; ALONSO et al., 2010).

Pode-se ir além nessa questão, ao sugerir o transplante ovariano autólogo como forma de reposição hormonal, observando que alguns pesquisadores referiram efeitos indesejados e até adversos da reposição estrogênica oral como o aumento na incidência do câncer de mama e órgãos reprodutivos (CHEN, 2008; HAO et al., 2010) ou sugeriram a utilização destes hormônios por outra via de administração, que não seja oral, para evitar mudanças indesejáveis na composição corporal em usuárias de estrogênio na pós-menopausa em decorrência do efeito de primeira passagem do estrogênio sobre o metabolismo e funções endócrinas do fígado (O'SULLIVAN et al., 1998).

Quando se analisa a matéria mineral existem algumas diferenças particulares entre os grupos. Os animais não-ovariectomizados tiveram teor de matéria mineral semelhante ao do grupo que recebeu o transplante na região de confluência dos vasos femorais; os que receberam transplante na região subcapsular do rim, tecido subcutâneo e bolsa ovárica demonstraram o mesmo comportamento e o maior percentual quando comparados aos demais; e por fim, o grupo de animais ovariectomizados, que demonstraram o menor percentual de matéria mineral, diferindo de todos os outros grupos (tabela 6).

Nos grupos em que o transplante respondeu de forma satisfatória (Grupos C, D e E) foram obtidos os maiores percentuais de matéria mineral de todo o experimento. Sabe-se que os estrógenos podem atuar sobre o metabolismo ósseo por mecanismos indiretos, aumentando a disponibilidade do cálcio para este tecido (SCHMIDT et al., 2006). Entretanto, esta ideia, estabelecida ao longo de décadas, de que a deficiência estrogênica seria a razão da osteoporose na pós-menopausa foi desafiada pela proposta (SUN et al., 2006) de que os níveis elevados de FSH, que também ocorrem neste período, seriam a verdadeira causa desta condição. Porém, num dos estudos mais recentes sobre este assunto, concluiu-se que a deficiência de estrógeno é o fator dominante que desencadeia a perda de tecido ósseo em ratas ovariectomizadas (ROUACH et al., 2011).

Sendo assim, é possível continuar atribuindo os resultados dos grupos transplantados ao maior percentual de folículos ovarianos em crescimento destes animais quando comparados ao seu próprio controle e aos animais não ovariectomizados mantidos ao longo do experimento (dados disponíveis na tabela 9). Esses folículos em maior proporção foram, provavelmente, os responsáveis pelo aumento na síntese de estrógeno e maior disponibilidade do cálcio para o tecido ósseo, promovendo como resposta orgânica, maior massa óssea, representada pelo teor de matéria mineral mensurado neste trabalho.

As mesmas informações servem para justificar porque o grupo de animais transplantados na região de confluência dos vasos femorais apresentou taxa menor de matéria mineral quando comparado aos demais grupos transplantados, pois estes, apesar do percentual alto de folículos antrais, tiveram a menor população ovariana estimada dentre os transplantados.

Cadelas adultas submetidas à ovariectomia ou OSH apresentaram maior número de espaços de reabsorção óssea por  $\text{mm}^2$  quando comparadas a cadelas intactas (SCHMIDT et al., 2006). Esta informação corroborou os dados apresentados por ROUACH et al. (2011) em ratas ovariectomizadas e reforçaram os resultados obtidos neste estudo, pois o menor percentual de matéria mineral foi observado justamente no grupo de animais ovariectomizados.

#### 6.4. Avaliação histomorfométrica do útero

De acordo com PANTALEÃO et al. (2009), o endométrio de ratas e mulheres exibe alterações proliferativas semelhantes e comparáveis quando submetidas à terapia hormonal, validando o modelo murino para estudos relacionados aos eventos da pós-menopausa. A utilização dos modelos animais com fisiologia compatível a de humanos permite ainda uma avaliação do efeito que os hormônios têm sobre o endométrio, excluindo-se situações variáveis como estudo em casos clínicos, idade, tempo de menopausa e de terapia hormonal (ANDRADE et al., 2000; MORAES et al., 2006).

Tabela 7 - Média e desvio-padrão para espessura ( $\mu\text{m}$ ) do epitélio superficial (ESup), estroma endometrial (End), miométrio (Mio) e espessura total do útero (ETot) de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

GRUPO	ESup	End	Mio	ETot
Grupo A (n=8)	10,57±6,44 <sup>a</sup>	54,57±54,72 <sup>a</sup>	79,00±27,89 <sup>a</sup>	221,14±68,91 <sup>a</sup>
Grupo B (n=9)	3,00±1,46 <sup>b</sup>	26,71±20,48 <sup>b</sup>	36,50±14,29 <sup>b</sup>	118,82±24,33 <sup>b</sup>
Grupo C (n=8)	16,60±7,68 <sup>c</sup>	61,28±48,48 <sup>a</sup>	112,61±35,46 <sup>c</sup>	260,50±58,32 <sup>c</sup>
Grupo D (n=9)	13,96±7,21 <sup>c</sup>	63,20±46,37 <sup>a</sup>	97,82±28,92 <sup>a,c</sup>	248,32±53,12 <sup>a,c</sup>
Grupo E (n=9)	8,17±5,25 <sup>a</sup>	68,80±50,53 <sup>a</sup>	86,57±31,04 <sup>a</sup>	214,93±53,60 <sup>a</sup>
Grupo F (n=9)	3,10±2,67 <sup>b</sup>	51,65±43,16 <sup>a</sup>	73,42±38,33 <sup>a</sup>	185,29±70,88 <sup>a</sup>

n= número de animais avaliados. a, b, c, d: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes, ANOVA, Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Grupo A: animais não-ovariectomizados; Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

A avaliação histomorfométrica do útero revelou comportamentos distintos entre os grupos para cada um dos critérios avaliados: espessura do epitélio superficial, endométrio, miométrio e diâmetro total (somatória dos anteriores e da espessura do perimétrio). Os dados estão disponíveis na tabela 7.

A avaliação da espessura do epitélio superficial demonstrou valores dentro dos parâmetros normais nos animais não-ovariectomizados, bem como, naqueles transplantados na bolsa ovárica, de acordo com PANTALEÃO et al. (2009),

enquanto os submetidos ao transplante para cápsula renal e tecido subcutâneo, obedeceram aos padrões controle de MORAES et al. (2006).

A comparação com outros autores foi necessária para perceber-se o quanto este padrão considerado como normal pode ser diferente dentro de diferentes grupos controle. Pequenas variações são aceitáveis quando se leva em consideração que no momento das análises tinham-se amostras oriundas de animais que poderiam estar em fases distintas do ciclo estral, assim como ocorre nos trabalhos tomados por referência e citados acima.

Os resultados dos animais ovariectomizados e daqueles transplantados para região dos vasos femorais foram semelhantes. O resultado descrito a pouco já era esperado, pois 66,66% dos animais deste último grupo demonstravam sinais de atrofia uterina, situação compreensível inicialmente apenas para os animais ovariectomizados. Porém, esta questão da atrofia uterina será descrita e devidamente discutida mais adiante.

A espessura do endométrio nos animais transplantados foi semelhante a dos animais controle não ovariectomizados, e aquela observada no grupo ovariectomizado, foi a menor espessura mensurada para este parâmetro no experimento, confirmando a atrofia uterina. Esses dados sugerem a manutenção da responsividade uterina decorrente da regularidade na produção hormonal oriunda do tecido ovariano transplantado nesses animais, sendo esta comparável a de fêmeas que possuíam ovários íntegros.

As maiores valores obtidos na avaliação histomorfométrica foram do miométrio. Os grupos transplantados tiveram resultados semelhantes ao registrado nos animais não ovariectomizados utilizados como controle positivo de produção hormonal. A exceção ficou a cargo do grupo transplantado para a cápsula renal, onde foram observados os maiores valores. Já o resultado observado no grupo de animais ovariectomizados, foi o menor e diferiu de todos os outros, reforçando a teoria da atrofia uterina demonstrada neste grupo.

Os resultados relativos à espessura total do útero apresentaram o mesmo comportamento descrito a pouco para o miométrio e podem ser justificados por razões idênticas.

Analisando estes e outros resultados descritos adiante, foi possível perceber que a avaliação histomorfométrica do útero forneceu um número muito maior de informações acerca de qualquer tratamento experimental que possa ter influenciado os órgãos reprodutivos; sendo este tipo de análise mais completa que outras onde foi mensurado apenas o peso uterino (CORLETA et al., 1998).

O útero demonstrou características de atrofia em todos os animais (9/9) do grupo submetido à ovariectomia bilateral, 25% (2/8) dos animais submetidos ao transplante na região subcapsular do rim, 44,44% (4/9) dos que receberam o transplante no tecido subcutâneo e bolsa ovárica, e 66,66% (6/9) dos transplantados na região de confluência dos vasos femorais. Em alguns desses animais, além da atrofia, observaram-se alguns sinais característicos de endometrite e hiperplasia cística como: dilatação de glândulas endometriais, infiltrado celular neutrofílico no estroma endometrial e presença de abundante secreção mucosa no lume uterino.

Segundo relatos de MENDONÇA et al. (2004; 2006) e GALABOVA et al. (2003), a exposição à progesterona, principalmente por período de tempo prolongado, poderia promover proliferação endometrial e aumento da secreção glandular. O incremento desta secreção endometrial forneceria meio de cultura ideal para crescimento microbiano, predispondo o útero a infecções ascendentes a partir da mucosa vaginal. Essas informações sugeriram que os animais deste experimento desenvolveram atrofia em decorrência da interrupção abrupta (animais ovariectomizados bilateralmente) ou progressiva (animais ovariectomizados e transplantados) da secreção estrogênica. Essa condição promoveu supressão do efeito trófico e de renovação epitelial que o estrógeno promove em vários tecidos, dentre eles o útero, ocasionando todas as anormalidades observadas; inclusive, existem pesquisadores (CAMARGO et al., 2009; CHUFFA et al., 2011) que discutiram sobre este assunto. Eles afirmaram que após administração de

substâncias inibidoras de estrógeno em ratas, como decanoato de nandrolona, são observadas as mesmas alterações uterinas encontradas nesta tese.

Quanto ao grau de desenvolvimento das glândulas endometriais observou-se que 48,15% (13/27) dos animais avaliados apresentavam grau 1, grau 2 em 7,4% (2/27) dos casos, grau 3 em 33,33% (9/27) e grau 4 nos 11,11% (3/27) restantes. O endométrio encontrava-se em fase proliferativa, indicativa de atividade estrogênica, para 55,55% (15/27) e secretória, com influências hormonais características da progesterona, nos 44,44% (12/27) restantes (figura 5). Essa avaliação somente foi possível nas amostras que não demonstravam atrofia uterina (27/52).

Tabela 8 - Média e desvio-padrão do número de glândulas endometriais de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e transplantadas (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

<b>GRUPO</b>	<b>Número de Glândulas Endometriais</b>
Grupo A (n=8)	7,22±7,03
Grupo B (n=9)	5,66±2,95
Grupo C (n=8)	7,22±2,68
Grupo D (n=9)	6,88±3,95
Grupo E (n=9)	10,00±5,33
Grupo F (n=9)	9,22±5,47

n= número de animais avaliados. Parâmetros avaliados por ANOVA, Teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Grupo A: animais não-ovariectomizados; Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

O número de glândulas endometriais não demonstrou diferença entre grupos (tabela 8), sendo este resultado semelhante ao observado por outros autores nas mesmas condições experimentais com seus animais controle (MENDONÇA et al., 2004; PANTALEÃO et al., 2009). Mesmo existindo distinção clara quanto à fase do ciclo estral e estágio endometrial, percebeu-se neste estudo, que o número de glândulas não se altera, porém estas podem evidenciar estados que variam desde a atrofia até o ápice da síntese secretória.

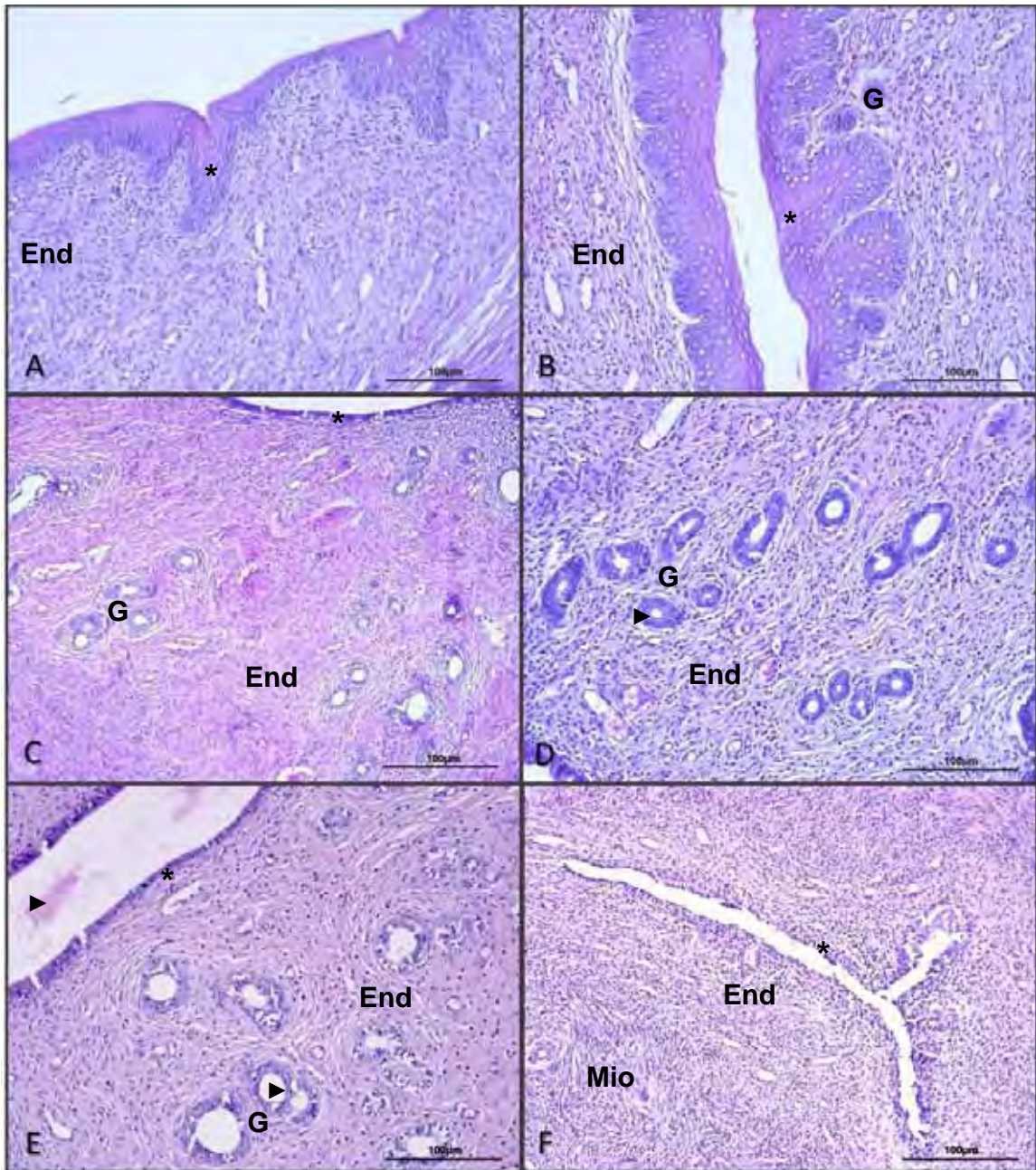


Figura 5 - Fotomicrografia de útero de rata (terço médio). Fase proliferativa no controle não-ovariectomizado (A) e com transplante no subcutâneo (B); Fase secretória no transplante da cápsula renal (C); transplante na bolsa ovárica (D) e transplante nos vasos femorais (E); F. Atrofia uterina, controle ovariectomizado. Notar epitélio superficial (\*), glândulas endometriais (G), secreção no interior das glândulas ou lume uterino (▶), estroma endometrial (End) e miométrio (Mio). Microscopia óptica, sem contraste de fase, Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 100µm.

### 6.5. Avaliação histomorfométrica dos tecidos ovarianos

Tabela 9 - Comparação das porcentagens (%) de folículos normais no tecido ovariano de ratas não-ovariectomizadas, ovariectomizadas e submetidas ao transplante autólogo por seis meses (FCAV, Câmpus de Jaboticabal - UNESP/2011).

GRUPO	Primord	Trans	Prim	Secund	A.Inic	Antral	Pré-Ovul	Total de folículos (n)	Tecido avaliado
Grupo A (n=9)	63,13 <sup>a</sup>	24,23 <sup>a</sup>	5,98 <sup>a</sup>	4,01 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a,b</sup>	62405	2 ovários
Grupo B (n=9)	61,13 <sup>b</sup>	20,23 <sup>b</sup>	9,69 <sup>b</sup>	4,71 <sup>b</sup>	2,92 <sup>b</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a,b</sup>	94954	2 ovários
Grupo C <sub>contr.</sub> (n=9)	69,29 <sup>c</sup>	18,55 <sup>c</sup>	5,91 <sup>a,c</sup>	3,19 <sup>c</sup>	1,93 <sup>c</sup>	0,88 <sup>c</sup>	0,25 <sup>a</sup>	39347	1 ovário
Grupo D <sub>contr.</sub> (n=9)	66,10 <sup>d</sup>	19,71 <sup>d</sup>	5,61 <sup>c,d</sup>	3,86 <sup>a</sup>	2,97 <sup>b</sup>	1,40 <sup>d</sup>	0,35 <sup>b</sup>	30760	1 ovário
Grupo E <sub>contr.</sub> (n=9)	65,87 <sup>d</sup>	20,61 <sup>b</sup>	5,40 <sup>d</sup>	3,95 <sup>a,d</sup>	2,47 <sup>d</sup>	1,43 <sup>d</sup>	0,27 <sup>a,b</sup>	28823	1 ovário
Grupo F <sub>contr.</sub> (n=9)	59,62 <sup>e</sup>	26,08 <sup>e</sup>	6,10 <sup>a</sup>	3,17 <sup>c</sup>	2,81 <sup>b</sup>	1,77 <sup>e</sup>	0,46 <sup>c</sup>	29436	1 ovário
Grupo C <sub>transp.</sub> (n*=8)	24,23 <sup>f</sup>	39,43 <sup>f</sup>	15,46 <sup>e</sup>	8,52 <sup>e</sup>	8,60 <sup>e</sup>	3,07 <sup>f</sup>	0,69 <sup>c</sup>	1765	3 fragmentos
Grupo D <sub>transp.</sub> (n*=7)	27,23 <sup>f</sup>	24,91 <sup>a,e</sup>	12,49 <sup>f</sup>	15,79 <sup>f</sup>	8,90 <sup>e</sup>	4,09 <sup>f,g</sup>	6,58 <sup>d</sup>	1274	3 fragmentos
Grupo E <sub>transp.</sub> (n*=5)	25,43 <sup>f</sup>	29,46 <sup>e</sup>	6,55 <sup>a,b,d</sup>	20,01 <sup>f</sup>	7,04 <sup>e</sup>	6,51 <sup>g</sup>	5,00 <sup>d</sup>	276	3 fragmentos
Grupo F <sub>transp.</sub> (n*=2)	-	-	66,88 <sup>g</sup>	-	-	19,21 <sup>h</sup>	13,91 <sup>e</sup>	54	3 fragmentos

n= número total de animais por grupo. n\*= número de animais que apresentaram folículos morfologicamente normais para estimativa da população folicular. a, b, c, d: letras diferentes na mesma coluna indicam valores diferentes, Teste de qui-quadrado (p<0,05). contr.: amostras controle. transp.: amostras obtidas após 6 meses de transplante. frag.: número de fragmentos ovarianos inseridos no momento do transplante. Grupo A: animais não-ovariectomizados; Grupo B: animais submetidos à ovariectomia bilateral; Grupos C, D, E e F: animais submetidos à ovariectomia bilateral seguida de transplante para região subcapsular do rim, tecido subcutâneo, bolsa ovárica e vasos femorais, respectivamente.

Os resultados expressos na tabela 9 mostram as porcentagens de folículos observados nos grupos controle e após os procedimentos de transplantes. Foram considerados para estas análises, apenas folículos saudáveis (figura 6) sem sinais de atresia folicular. Para evitar erros de interpretação ou variações devido a diferentes dimensões de tecido entre os grupos é que foram consideradas as porcentagens de folículos observados, cujos valores relativos demonstram desvios de crescimento com maior clareza.

Observaram-se diferenças marcantes nos números de folículos contabilizados entre os grupos controle. Houve também diminuição no número de folículos dos animais submetidos ao procedimento de transplante, sendo o grupo que recebeu o tecido ovariano na região de confluência dos vasos femorais e sob a cápsula renal, aqueles que apresentaram menor e maior quantidade de folículos após seis meses, respectivamente.

Embora a diminuição no número de folículos observados tenha ocorrido devido ao tamanho da peça obtida como controle, em estudos cujas amostras controle tiveram as mesmas dimensões dos tratamentos foram observadas perdas foliculares em decorrência da manipulação e do período de isquemia e reperfusão tecidual (BOLS et al., 2010).

Os resultados apresentados e discutidos anteriormente associados aos vistos a partir da avaliação dos tecidos transplantados, reforçaram a hipótese de que o ovário, mesmo quando em locais ectópicos, pode promover interação com os diversos órgãos e tecidos do organismo com os quais mantenha relação (CALLEJO et al., 1999); e estas informações corroboram os achados de retorno à atividade ovariana em mulheres que tiveram os sintomas de menopausa suprimidos após transplante ovariano (OKTAY et al., 2003).

Os fragmentos ovarianos inseridos na região subcapsular do rim apresentaram boa vascularização, preservação das características individuais, coaptação adequada entre receptor e transplantado, sinais de luteinização, ausência de sinais relacionados que indicassem morte tecidual ou rejeição e, folículos morfológicamente normais em diferentes estádios de desenvolvimento.

Uma possível explicação para a rápida revascularização do tecido ovariano transplantado está na presença de substâncias angiogênicas, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que em situações de hipóxia, estimula a formação de novos vasos. Segundo MARTINS et al. (2008) em ratas o VEGF é sintetizado pelas células foliculares (granulosa e da teca), promove a angiogênese e favorece o desenvolvimento folicular. Além disso, o tecido renal possui a mesma origem embriológica do trato reprodutivo, podendo ainda, proporcionar um suporte vascular adequado ao tecido ovariano transplantado, pois 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).

O transplante ovariano para o tecido subcutâneo é uma técnica que normalmente facilita o acompanhamento do desenvolvimento folicular no pós-cirúrgico. Na presente tese, o grupo que recebeu o transplante neste local demonstrou pontos de comunicação direta entre os tecidos ovariano, muscular e conjuntivo frouxo, ausência de sinais de rejeição, assim como no grupo da cápsula renal, além de boa vascularização e luteinização presentes em todas as amostras. Foram visualizados ainda, folículos pilosos e glândulas sebáceas adjacentes à região do transplante. Folículos foram observados em diferentes estádios de desenvolvimento neste grupo.

Nos grupos transplantados para a bolsa ovárica e região de confluência dos vasos femorais foram observados poucos folículos ovarianos, quando comparadas às proporções desses e demais grupos tratados. Tal achado, no primeiro grupo deveu-se provavelmente à isquemia causada após abertura e reconstituição da estrutura da bolsa ovárica, com posterior dificuldade de remodelação dos tecidos envolvidos. Para o segundo, já foi levantada anteriormente a hipótese de que o fio cirúrgico inabsorvível utilizado para fixação dos fragmentos ovarianos e a própria manipulação do tecido a ser transplantado, tenham ocasionado uma reação local promovendo a substituição do tecido ovariano por conjuntivo frouxo afuncional.

No grupo que recebeu o transplante ortotópico, foram observados tecidos ovarianos ainda viáveis, bem vascularizados e envoltos por tecido conjuntivo frouxo característico da bolsa ovárica em 55,55% (5/9) dos animais submetidos ao procedimento. Das quatro amostras restantes, duas demonstravam presença de células mono e polimorfonucleares no tecido ovariano afuncional, enquanto as demais apresentavam tecido ovariano com manutenção das características morfológicas, porém sem folículos viáveis. A luteinização também foi observada nas amostras desse grupo.

Os animais submetidos aos transplantes para a região dos vasos femorais apresentaram tecido conjuntivo frouxo e adiposo em proximidade com os tecidos ovarianos, demonstrando mesênquima totalmente afuncional em 55,55% (5/9) dos animais transplantados, tecido ovariano ainda viável, porém afuncional em 22,22% (2/9) dos animais e, viabilidade do tecido transplantado, porém com poucos folículos, nos outros 22,22% (2/9) dos animais. Neste grupo, a vascularização observada estava presente sempre na periferia do tecido transplantado e a luteinização foi demonstrada em 44,44% (4/9) das amostras.

No tocante à distribuição folicular, as porcentagens de folículos primordiais dos grupos controle diferiram entre si. Esta diferença foi também observada quando comparou-se as proporções de folículos primordiais contidos nos tecidos transplantados (24,23-27,23%) com seus próprios controles (65,87-69,29%), fornecendo um claro sinal de que estes folículos se desenvolveram a categorias posteriores com o transplante. Não foram observados folículos primordiais saudáveis no grupo que recebeu o transplante na região dos vasos femorais. Diferente dos folículos em crescimento, os primordiais são bastante resistentes ao efeito da isquemia, o que pode ser atribuído à dormência em que se encontram e ao seu baixo metabolismo (NUGENT et al., 1997). Paralelamente a isto, os achados apresentados a pouco, referentes à menor porcentagem de folículos primordiais observados nos tecidos transplantados quando comparados aos seus respectivos controle, corroboraram as hipóteses de ativação massiva desses folículos (BAIRD et al., 2004) e depleção das reservas ovarianas após o

transplante (SALLE et al., 1999), sugerindo sobrevida limitada dos tecidos transplantados em modelos experimentais, assim como já foi observado em humanos (OKTAY et al., 2003).

A ativação em massa de folículos primordiais foi relatada após o transplante por BAIRD et al. (2004) com aumento na proporção de folículos em crescimento. Segundo estes autores, isso pode ser explicado pela diminuição de fatores inibidores como a inibina A, resultando numa maior liberação de FSH. Como o transplante provoca por si só diminuição do número de folículos antrais, seja por remoção mecânica antes do transplante, como foi o caso do presente experimento, ou por ação da isquemia e reperfusão, isso pode ter auxiliado na diminuição das concentrações de inibina A.

Os folículos de transição são constantemente utilizados como indicativos de ativação folicular em diferentes espécies (GOSDEN et al., 1994, CANDY et al., 1995, GUNASENA et al., 1998, HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005) podendo inclusive, receber a denominação de ativados a depender do estudo. Observando os resultados da tabela 9, percebe-se que a maior porcentagem deste tipo folicular foi encontrada no grupo em que o tecido ovariano foi transplantado para região subcapsular do rim (39,43%) sendo, significativamente maior, quando comparada a quaisquer dos outros grupos. Saliente-se ainda que, neste grupo foram observadas as maiores taxas de sucesso na implantação da técnica de transplante, uma vez que, mesmo após a ocorrência de um óbito, o número de folículos observados superou, por exemplo, aquele do grupo transplantado para o tecido subcutâneo que manteve o mesmo número de animais até o final do experimento.

O percentual de folículos primários observados também foi elevado no grupo da cápsula renal (15,46%) quando comparado aos demais controles. Contudo, a maior porcentagem de folículos primários foi, surpreendentemente, observada no grupo transplantado para a região dos vasos femorais (66,88%), sendo este achado restrito aos dois animais anteriormente citados em que o tecido ovariano

ainda apresentava folículos viáveis, e provavelmente, influenciado pelo baixo número de amostras em que houve sucesso no transplante.

Paradoxalmente, o grupo com transplante na região dos vasos femorais foi o único que demonstrou ausência de folículos secundários, contrariando a tendência observada nos demais grupos de transplantados (8,52-20,01%), que apresentaram aumento considerável nas porcentagens deste tipo folicular quando comparados ao controle (3,17-4,71%). O grupo que recebeu o tecido ovariano na bolsa ovárica destacou-se com aproximadamente 20% dos seus folículos morfológicamente normais nesta categoria.

Um padrão de desenvolvimento folicular diferenciado também foi observado nas categorias antrais para os grupos da cápsula renal, tecido subcutâneo e bolsa ovárica. Nesses, folículos antrais iniciais demonstravam porcentagens 3 a 4 vezes maiores (7,04-8,90%) quando comparadas com seus respectivos controles (1,70-2,97%). Tal achado reforçou a hipótese de supressão dos fatores inibitórios e sua influência no crescimento de folículos transplantados (BAIRD et al., 2004), comentada anteriormente.

Os folículos antrais e pré-ovulatórios foram observados em maior proporção nos grupos que receberam os fragmentos ovarianos no tecido subcutâneo (4,09% e 6,58%), bolsa ovárica (6,51% e 5%) e vasos femorais (19,21% e 13,91%), sendo neste último encontrada a maior porcentagem de folículos pré-ovulatórios dentre todos os grupos transplantados. Um fato que merece observação é a distribuição folicular em diferentes categorias nos grupos transplantados, o que denota desenvolvimento e, o número considerável de folículos ainda existentes após seis meses de transplante. A pequena porcentagem de folículos pré-ovulatórios (0,69%) associado à grande proporção de pré-antrais ainda existentes (87,64%) observados no grupo da cápsula renal quando comparados aos demais transplantados (66,88-81,45%), sugerem que o tecido renal apresentou um maior controle na regulação da foliculogênese quando comparado aos demais tecidos receptores, permitindo uma menor depleção dos folículos ao longo do tempo.

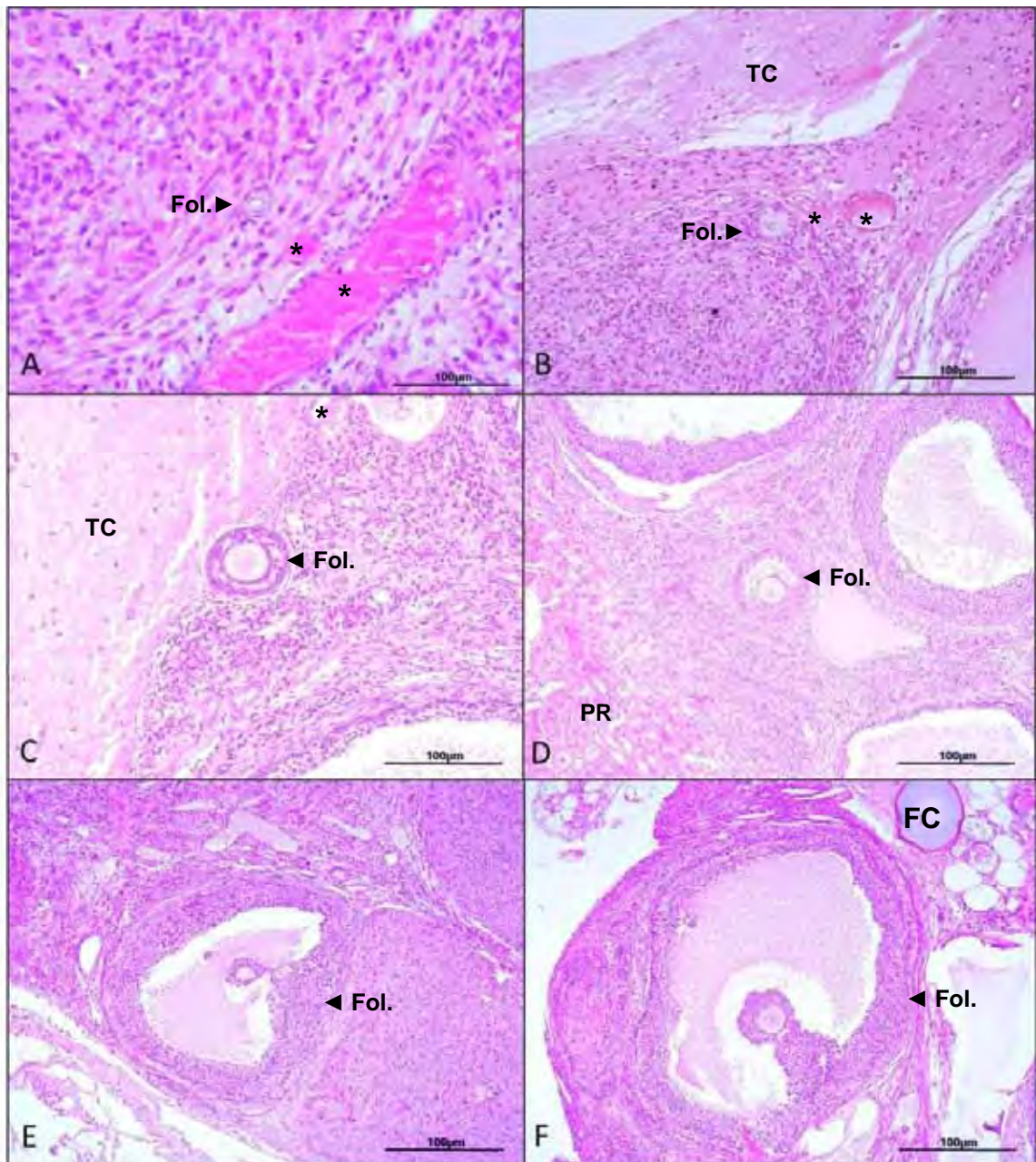


Figura 6 - Fotomicrografia dos folículos contidos nos tecidos ovarianos transplantados em ratos. (A) Fol. primordial, transplante no tecido subcutâneo, 40x; (B) Fol. primário, transplante nos vasos femorais, 20x; (C) Fol. Secundário, transplante no tecido subcutâneo, 20x; (D) Fol. Antral Inicial, transplante na cápsula renal, 10x; (E) Fol. Antral, transplante na bolsa ovárica, 10x; (F) Fol. Pré-Ovulatório, transplante nos vasos femorais, 10x. Notar vascularização (\*), folículos ovarianos (Fol.▶), tecido conjuntivo (TC), parênquima renal (PR), fio cirúrgico (FC). Microscopia óptica, sem contraste de fase, Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 100µm.

## 7. CONCLUSÕES

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

- ✓ Todas as técnicas utilizadas para realização do transplante autólogo ovariano foram exequíveis e os procedimentos para a bolsa ovárica e tecido subcutâneo foram os que exigiram respectivamente maior e menor habilidade para realização;
- ✓ O protocolo anestésico com tribromoetanol atendeu às expectativas e não foram registradas quaisquer limitações à sua utilização, sendo este recomendado para realização de transplantes gonadais em ratas;
- ✓ Por meio da colpocitologia vaginal foi possível acompanhar o retorno à atividade ovariana que ocorreu 17 dias após os procedimentos de transplante com sinais de ciclicidade na maioria dos animais;
- ✓ Todos os sítios anatômicos, à exceção da região próxima aos vasos femorais, permitiram um desenvolvimento folicular satisfatório, sem prejuízos às suas respectivas funções e com demonstrações de adequada interação entre os tecidos receptor e transplantado;
- ✓ Os animais transplantados, à exceção daqueles que receberam o tecido ovariano na região próxima aos vasos femorais, demonstraram sinais de responsividade hormonal uterina semelhante à observada nas fêmeas não-ovariectomizadas;
- ✓ Os transplantes para a região subcapsular do rim, tecido subcutâneo e bolsa ovárica impediram o acúmulo de gordura corporal e promoveram aumento da matéria mineral;
- ✓ O transplante autólogo ovariano viabilizou a manutenção do desenvolvimento folicular, sendo, as maiores populações foliculares observadas na região subcapsular do rim e tecido subcutâneo.

## 8. IMPLICAÇÕES

Analisando os resultados deste estudo percebemos que o transplante autólogo ovariano pode servir como alternativa à terapia de reposição hormonal hoje realizada como rotina em mulheres na pós-menopausa, o que vem para reforçar os resultados com autotransplante já obtidos noutras investigações fora do país.

Entretanto, faz-se necessário esclarecer que a preservação do tecido ovariano a ser transplantado posteriormente, por ocasião do surgimento da menopausa, deveria ser realizada, preferencialmente, ainda durante a vida fértil dessa mulher, a fim de que o tecido ovariano ainda possua uma população folicular significativa que garanta uma maior sobrevida do transplante.

Esta técnica pode inclusive ser utilizada como forma de diminuir o custo dos tratamentos hormonais hoje empregados, reduzindo os gastos públicos com a saúde de mulheres que cada vez mais alcançam a melhor idade, no Brasil e no mundo.

Quanto aos animais, podemos inferir, e quem sabe extrapolar, que o transplante autólogo ovariano também possa vir a auxiliar na redução da obesidade dos animais de companhia devido à comprovada manutenção da composição corporal em ratas observada neste estudo. Porém, estamos lidando ainda com inferências e possíveis aplicações de resultados, sendo necessário que outras investigações tenham esta questão como foco principal.

Entretanto, é prudente sugerir que, futuramente, sejam realizados mais estudos em modelos experimentais para comparar a reposição hormonal estrogênica tradicional e o transplante autólogo ovariano, determinando sua real viabilidade nos diferentes aspectos a serem ainda avaliados; e para isso, é importante que seja ressaltada a necessidade de interação entre grupos de pesquisa voltados para as Medicinas Humana e Veterinária.

## 9. REFERÊNCIAS<sup>20</sup>

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.

ALONSO, A.; GONZÁLEZ-PARDO, H.; GARRIDO, P.; CONEJO, N.M.; LLANEZA, P.; DÍAZ, F.; DEL REY, C.G.; GONZÁLEZ, C. Acute effects of 17 $\beta$ -estradiol and genistein on insulin sensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. **AGE - The Official Journal of the American Aging Association**, v. 32, p. 421-434, 2010.

ALONSO, A.; MORENO, M.; ORDONEZ, P.; FERNANDEZ, R.; PEREZ, C.; DIAZ, F.; NAVARRO, A.; TOLIVIA, J.; GONZALEZ, C. Chronic estradiol treatment improves brain homeostasis during aging in female rats. **Endocrinology**, v.149, p.57-72, 2008.

ALONSO, A.; FERNANDEZ, R.; MORENO, M.; ORDONEZ, P.; GONZALEZ-PARDO, H.; CONEJO, N.M.; DIAZ, F.; GONZALEZ, C. Positive effects of 17beta-estradiol on insulin sensitivity in aged ovariectomized female rats. **Journals of Gerontology - Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v.61, p.419-426, 2006.

ANDERSEN, C.Y.; ROSENDAHL, M.; BYSKOV, A.G.; LOFT, A.; OTTOSEN, C.; DUEHOLM, M.; SCHMIDT, K.L.; ANDERSEN, A.N.; ERNST, E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.23, p.2266-2272, 2008.

---

<sup>20</sup> ABNT NBR 6023, Ago / 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.

ANDRADE, P.M.; BARACAT, E.C.; SIMÕES, M.J.; RODRIGUES DE LIMA, G. Histomorphometric aspects of adult castrated rat endometrium after the use of estrogen, progesterone and tamoxifen. **Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology**, v.27, n.2, p.138-41, 2000.

ATTKISS, K.J.; SUSKI, M.; HUNT, T.K.; BUNCKE, H.J. Ischemic preconditioning of skeletal muscle improves tissue oxygenation during reperfusion. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v.15, p.223-228, 1999.

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

AUBARD, Y.; NEWTON, H.; SCHEFFER, G.; GOSDEN, R. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.79, p.83-87, 1998.

AZEVEDO, G.D. Terapia com raloxifeno na pós-menopausa: efeitos sobre o sistema hemostático. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.24, n.1, p.67-67, 2002.

BAILEY, C.J.; AHMED-SOROUR, H. Role of ovarian hormones in the longterm control of glucose homeostasis. **Diabetologia**, v.19, p.475-481, 1980.

BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.; SOUZA, C.; TELFER, E. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.113, suppl.1, p.55-59, 2004.

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.

BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. p.565-587.

BEDAIWY, M.A.; SHAHIN, A.Y.; FALCONE, T. Reproductive organ transplantation: advances and controversies. **Fertility and Sterility**, v.90, n.6, p. 2031-2055, 2008.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976. 239 p.

BIGGERS, J.D. In vitro fertilization and embryo transfer in historical perspective. In: TROUNSON, A.A.; WOOD, C. **In vitro fertilization and embryo transfer**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1982. p. 3-15.

BOLS, P.E.J.; AERTS, J.M.J.; LANGBEEN, A.; GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R. Xenotransplantation in immunodeficient mice to study ovarian follicular development in domestic animals. **Theriogenology**, v.73, p.740-747, 2010.

BOOM, H.; MALLAT, M.J.; DE FIJTER, J.W.; ZWINDERMAN, A.H.; PAUL, L.C. Delayed graft function influences renal function, but not survival. **Kidney International**, v.58, p. 859–866, 2000.

BOUCHER, A.; LEMAY, A.; A KOUM, A. Effect of hormonal agents on monocyte chemotactic protein-1 expression by endometrial epithelial cells of women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, v.74, n.5, p.969-975, 2000.

BRANHAM, W.S.; SHEEHAN, D.M.; ZEHR, D.R.; RIDLON, E.; NELSON, C.J. The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 $\beta$ -estradiol. **Endocrinology**, v. 117, p.2229-2237, 1985.

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

BRODY, J.R.; CUNHA, G.R. Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. **American Journal of Anatomy**, v.186, p.1-20, 1989.

CALLEJO, J.; VILASECA, S.; ORDI, J.; CABRÉ, S.; LAILLA, J.M.; BALASCH, J. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: long-term evaluation of effects on ovarian structure and function. **Fertility and Sterility**, v.77, n.2, p.396-402, 2002.

CALLEJO, J.; JÁUREGUI, M.T.; VALLS, C.; FERNANDEZ, M.E.; CABRÉ, S.; LAILLA, J.M. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p.513-517, 1999.

CAMARGO, I.C.C.; GASPAR, A.L.C.; FREI, F.; MESQUITA, S.F.P. Efeitos dos esteroides anabólicos androgênicos sobre o útero e parâmetros reprodutivos de ratas adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.9, p.453-60, 2009.

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.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after xenografting. **Human Reproduction**, v.10, p.2334-2338, 1995.

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.

CARSON, D.D.; BAGCHI, I.; DEY, S.K.; ENDERS, A.C.; FAZLEABAS, A.T.; LESSEY, B.A.; YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Developmental Biology**, v.223, p.217-237, 2000.

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.

CHEN, W.Y. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.22, n. 4, p.573-585, 2008.

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

CHUFFA, L.G.A.; SOUZA, R.B.; FREI, F.; MESQUITA, S.F.P.; CAMARGO, I.C.C. Nandrolone decanoate and physical effort: Histological and morphometrical assessment in adult rat uterus. **The Anatomical Record**, v.294, p.335-341, 2011.

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.

COURBIERE, B.; MASSARDIER, J.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 84, p.1065-1071, 2005.

CUNHA, A.G. **Dicionário etimológico da língua portuguesa**. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Lexicon, 2010. 744p.

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 a viabilidade do transplante autólogo de hemi-ovário em retroperitônio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.4, p.360-369, 2004.

DAMOUS, L.L.; SILVA, S.M.; LOPES, R.A.M.; SAKANO, C.R.S.B.; SIMÕES, M.J.; MONTERO, E.F.S. Study on the vaginal smear of rats submitted to autologous ovarian transplant. Impact of remote ischemic preconditioning. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n.5, p. 387-392, 2009.

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.

DEANESLY, R. Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 147, p. 412-421, 1957.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **The Journal of Endocrinology**, v. 11, p. 197-200, 1954.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. **Oncologist**, v.12, p.1437-1442, 2007.

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.

DISSEN, G.A.; LARA, H.E.; 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.

DONATO JR, J.; PEDROSA, R.G.; CRUZAT, V.F.; PIRES, I.S.; TIRAPEGUI J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition**, v.22, n.5, p.520-527, 2006.

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

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.364, p.1405-1410, 2004.

ERNST, E.; BERGHOLDT, S.; JORGENSEN, J.S.; ANDERSEN, C.Y. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, article in press, p.1-2, 2010.

FACUNDO, H.T.F. **Efeitos redox e protetores do pré-condicionamento isquêmico e da abertura do canal mitocondrial de potássio sensível a ATP contra morte celular por isquemia e reperfusão cardíaca**. São Paulo, SP: Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica), 2007. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 94p.

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.

FRANCO, F.S.C. **Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido ósseo e no balanço de cálcio em ratas**. Viçosa, MG: Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), 2009. Universidade Federal de Viçosa, 232p.

GALABOVA, G.; EGERBACHER, M.; AURICH, J.E.; LEITNER, M.; WALTER, I. Morphological changes of the endometrial epithelium in the bitch during metoestrus and anoestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.415-420, 2003.

GARCIA-SEGURA, L.M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L.L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, v.63, p.29-60, 2001.

GARDNER, D.J.; DAVIS, J.A.; WEINA, P.J.; THEUNE, B. Comparison of tribromoethanol, ketamine/acetylpromazine, Telazol/xylazine, pentobarbital, and methoxyflurane anesthesia in HSD: ICR mice. **Laboratory Animal Science**, v.45, p.199-204, 1995.

GARTON, M.J.; ROBERTSON, E.M.; GILBERT, F.J.; GOMERSALL, L.; REID, D.M. Can Radiologists detect osteopenia on plain radiographs? **Clinical Radiology**, v.49, p.118-122, 1994.

GENTILE, M.A.; NANTERMET, P.V.; VOGEL, R.L.; PHILLIPS, R.; HOLDER, D.; HODOR, P.; CHENG, C.; DAI, H.; FREEDMAN, L.P.; RAY, W.J. Androgen-mediated improvement of body composition and muscle function involves a novel early transcriptional program including IGF1, mechano growth factor, and induction of  $\beta$ -catenin. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.44, p.55-73, 2010.

GODING, J.R. Ovarian autotransplantation with vascular anastomoses, and its application to the study of reproductive physiology in the ewe. **The Journal of physiology**, v. 186, n. 2, p. 86-87, 1966.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research (Part B)**, v.80, p.84-87, 2007.

GOPALAN, C.; HEGADE, G.M.; BAY, T.N.; BROWN, S.R.; TALCOTT, M.R. Tribromoethanol–Medetomidine combination provides a safe and reversible anesthetic effect in Sprague-Dawley rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.44, n.1, p.7-10, 2005.

GOSDEN, R.G.; BOULTON, M.I.; GRANT, K.; WEBB, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.619-623, 1994.

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.

GRAY, C.A.; BARTOL, F.F.; TARLETON, B.J.; WILEY, A.A.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Development biology of uterine glands. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1311-1323, 2001.

GREEN, S.H.; SMITH, A.U.; ZUCKERMAN, S. The numbers of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. **The Journal of Endocrinology** , v. 13, p. 330-334, 1956.

GUNASENA, K.T.; LAKEY, J.R.T.; VILLINES, P.M.; BUSH, M.; RAATH, C.; CRITSER, E.S. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v.53, p.265-75, 1998.

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, 1997a.

GUNASENA, K.T.; VILLINES, P.M.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v.12, n.1, p.101-106, 1997b.

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, n.1, p.57-63, 2008.

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.

HAMILTON, J.A.; MCCARTHY, G.; WHITTY, G. Inflammatory microcrystals induce murine macrophage survival and DNA synthesis. **Arthritis Research**, v.3, n.4, p.242-246, 2001.

HAMILTON, J.A.; BYRNE, R.; WHITTY, G. Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, n.2, p.226-232, 2000.

HANKINSON, S.E.; WILLETT, W.C.; MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; HUNTER, D.J.; SPIEGELMAN, D.; BARBIERI, R.L.; SPEIZER, F.E. Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women. **Journal of The National Cancer Institute**, v.90, n.17, p.1292-1299, 1998.

HAO, L.; WANG, Y.; DUAN, Y.; BU, S. Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. **European Journal of Applied Physiology**, v.109, p.879-886, 2010.

HART, C.Y.T.; BURNETT JR, J.C.; REDFIELD, M.M. Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. **American Journal Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.281, p.1938-1945, 2001.

HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; BOSCH, P.; MILLER, D.P.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; BRACKETT, B.G. Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation *in* male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. **Fertility and Sterility**, v.83, n.1, p.1180-1187, 2005.

HERTRAMPF, T.; GRUCA, M.J.; SEIBEL, J.; LAUDENBACH, U.; FRITZEMEIER, K.H.; DIEL, P. The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. **Bone**, v.40, n.6, p.1529-1535, 2007.

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.

ROUACH, V.; KATZBURG, S.; KOCH, Y.; STERN, N.; SOMJEN, D. Bone loss in ovariectomized rats: Dominant role for estrogen but apparently not for FSH. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.112, p.128-137, 2011.

HUTCHISON, S.; CHOO-KANG, B.S.W.; GIBSON, V.B.; BUNDICK, R.V.; LEISHMAN, A.J.; BREWER, J.M.; McINNES, I.B.; GARSIDE, P. An investigation of the impact of the location and timing of antigen-specific T cell division on airways inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v.155, p.107-116, 2008.

ISHIMI, Y.; ARAI, N.; WANG, X.X.; WU, J.; UMEGAKI, K.; MIYAURA, C.; TAKADA, A.; IKEGAMI, S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.274, n.3, p.697-701, 2000.

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.

JEREMIAS, E.; BEDAIWY, M.A.; GURUNLUOGLU, R.; BISCOTTI, C.V.; SIEMIONOW, M.; FALCONE, T. Heterotopic autotransplantation of the ovary with microvascular anastomosis: a novel surgical technique. **Fertility and Sterility**, v.77, p.1278–1282, 2002.

JONES, M.; MC INNES, K.J.; BOON, W.C.; SIMPSON, E. Estrogen and adiposity—Utilizing models of aromatase deficiency to explore the relationship. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.106, p.3-7, 2007.

KAAJA, R.J. Metabolic syndrome and the menopause. **Menopause**, v.14, p.21-25, 2008.

KIM, S.S.; RADFORD, J.; HARRIS, M.; VARLEY, J.; RUTHERFORD, A.J.; LIEBERMAN, B.; SHALET, S.; GOSDEN, R.G. 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.

KODAMA, Y.; SAMESHIMA, H.; IKENOUE, T.; IKEDA, T.; KAWAGOE, Y. Successful fresh whole ovarian autotransplantation without vascular anastomosis. **Fertility and Sterility**, article in press, p.1-2, 2010.

KROHN, P.L. Transplantation of the ovary. In: ZUCKERMAN, L.; WEIR, B.J. **The Ovary**, v.2. 2.ed. New York, San Francisco and London: Academic Press, 1977. cap. 3, p. 101-128.

LALOUNTAS, M.A.; BALLAS, K.D.; SKOURAS, C.; ASTERIOU, C.; KONTOULIS, T.; PISSAS, D.; TRIANTAFYLLOU, A.; SAKANTAMIS, A.K. Preventing intraperitoneal adhesions with atorvastatin and sodium hyaluronate/carboxymethylcellulose: a comparative study in rats. **The American Journal of Surgery**, v.200, p.118-123, 2010.

LEE, C.H.; XUEB, H.; SUTCLIFFEB, M.; GOUTB, P.W.; HUNTSMANA, D.G.; MILLERD, D.M.; GILKSA, 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.

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

LIEGGI, C.C.; ARTWOHL, J.E.; LESZCZYNSKI, J.K.; RODRIGUEZ, N.A.; FICKBOHM, B.L.; FORTMAN, J.D. Efficacy and safety of stored and newly prepared tribromoethanol in ICR mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.44, n.1, p.17-22, 2005a.

LIEGGI, C.C.; FORTMAN, J.D.; KLEPS, R.A.; SETHI, V.; ANDERSON, J.A.; BROWN, C.E.; ARTWOHL, J.E. An evaluation of preparation methods and storage conditions of tribromoethanol. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.44, n.1, p.11-16, 2005b.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECKE, R.; DHONT, M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 605-611, 2002.

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

MACEDO, M.F. **Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região subcapsular do rim de ratas**. Jaboticabal, SP: Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), 2007a. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 78p.

MACEDO, M.F.; BEZERRA, M.B.; DUARTE, A.L.L.; CORDEIRO, M.F.; VICENTE, W.R.R.; PACHECO, M.R. Avaliação morfológica da viabilidade do auto-transplante de tecido ovariano em ratas. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v.17, p.243, 2007b.

MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Embryo production after in vitro growth, maturation and fertilization of oocytes from goat preantral follicles cultured in presence of growth hormone (GH). **Acta Scientiae Veterinariae**, n.38, suppl.2, p.679, 2010.

MANDL, A. M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Journal of Experimental Biology**, v.28, p.576-584, 1951.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v.42, 4A, p.609-614, 2002.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.

MATZUK, M.M.; BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178–2180, 2002.

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.

MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; BEN YEHUDA, D.; DOR J. Ovarian tissue storing for fertility preservation in clinical practice: successful pregnancy, technology, and risk assessment. **Fertility and Sterility**, v.84, suppl.2, 2005a.

MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; HARDAN, I.; FRIDMAN, E.; ZALEL, Y.; SCHIFF, E.; DOR, J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.318-321, 2005b.

MENDONÇA, F.S.; EVÊNCIO-NETO, J.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, M.J. Aspectos histopatológicos do útero de ratas utilizadas como modelo experimental de endometrite. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 47-56, 2006.

MENDONÇA, F.S.; MEDEIROS, J.P.; SILVA, V.C.L.; EVÊNCIO-NETO, J.; SÁ, F.B.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, M.J. Aspectos morfométricos do útero de ratas utilizadas como modelo experimental de endometrite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.434-437, 2004.

MORAES, A.V.S.; SIMÕES, R.S.; FONZAR, L.F.; SIMÕES, M.J.; SOARES JÚNIOR, J.M.; HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C. Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, n.2, p.101-106, 2006.

MORISHITA, S.; IMAI, A.; KAWABATA, I.; TAMAYA, T. Acute myelogenous leukemia in pregnancy: fetal blood sampling and early effects of chemotherapy. **International Journal of Gynaecology and Obstetrics**, v. 44, p.273-277, 1994.

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

NAKAGAWA, K.; KOO, D.D.; DAVIES, D.R.; GRAY, D.W.; MCLAREN, A.J.; WELSH, K.I.; MORRIS, P.J.; FUGGLE, S.V. Lecithinized superoxide dismutase reduces cold ischemia-induced chronic allograft dysfunction. **Kidney International**, v.61, p.1160-1169, 2002.

NUGENT, D.; MEIROW, D.; BROOK, P.F.; AUBARD, Y.; GOSDEN, R.G. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v.3, p.267-280, 1997.

OGE, A.; SEZER, E.D.; OZGONUL, M.; BAYRAKTAR, F.; SOZMEN, E.Y. The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. **Neuroscience Letters**, v.338, p.217-220, 2003.

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.

OKTAY, K.; BUYUK, E.; ROSENWAKS, Z.; RUCINSKI, J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **Fertility and Sterility**, v.80, p.193-198, 2003.

OKTAY, K.; ECONOMOS, K.; KAN, M.; RUCINSKI, J.; VEECK, L.; ROSENWAKS, Z. Endocrine function and oocytes retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **Journal of the American Medical Association**, v.286, p.1490-1493, 2001.

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.

OLIVEIRA, T.S.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; SERAKIDES, R. Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.448-456, 2005.

O'SULLIVAN, A.J.; CRAMPTON, L.J.; FREUND, J.; HO, K.K.Y. The route of estrogen replacement therapy confers divergent effects on substrate oxidation and body composition in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Investigation**, v.102, n. 5, p.1035-1040, 1998.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador-BA: Fundação Oswaldo Cruz, 2005. 28 p.

PANTALEÃO, J.A.S.; HENRIQUES, H.N.; CARVALHO, A.C.B.; POLLASTRI, C.E.; SOARES FILHO, P.J.; GUZMÁN-SILVA, M.A. Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n.3, p.124-130, 2009.

PAPAIIOANNOU, V.E.; FOX, J.G. Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. **Laboratory Animal Science**, v.43, p.189-192, 1993.

PARKES, A.S. Grafting of mouse ovarian tissue after freezing and thawing. **The Journal of Endocrinology**, v. 14, n.3, p. 30-31, 1956.

PARROTT, D.M.V. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 1, p. 230-241, 1960.

PARROTT, D.M.V.; PARKES, A.S. Dynamics of the orthotopic ovarian graft. **Sex Differentiation and Development**. Mem. Soc. Endocrin., n. 7, p. 71, Proceedings Book by CR Austin. Cambridge University Press, 1960.

PARROTT, D.M.V. Fertility of orthotopic ovarian grafts. **Proceedings - Society for the Study of Fertility**, v. 9, p. 137-145, 1958.

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.

PELLIGRINO, D.A.; SANTIZO, R.; BAUGHMAN, V.L.; WANG, Q. Cerebral vasodilating capacity during forebrain ischemia: effects of chronic estrogen depletion and repletion and the role of neuronal nitric oxide synthase. **Neuroreport**, v.9, p.3285-3291, 1998.

PERSSON, I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers-evidence and hypotheses from epidemiological findings. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.74, n.5, p.357-364, 2000.

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.

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 homogêneo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.3, p.206-211, 2004b.

PICHERIT, C.; CHANTERANNE, B.; BENNETAU-PELISSERO, C.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J.P.; COXAM, V. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. **British Journal of Nutrition**, v.85, n.3, p.307-316, 2001.

PIVA, M.; HOROWITZ, G.M.; SHARPE-TIMMS, K.L. Interleukin-6 differentially stimulates haptoglobin production by peritoneal and endometriotic cells in vitro: a model for endometrial-peritoneal interaction in endometriosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, n.6, p.2553-2561, 2001.

RACHO EL-AKOURI, R.; KURLBERG, G.; DINDELEGAN, G.; MOLNE, J.; WALLIN, A.; BRANNSTROM, M. Heterotopic uterine transplantation by vascular anastomosis in the mouse. **Journal of Endocrinology**, v.174, p.157-166, 2002.

RASGON, N.; JARVIK, L. Insulin resistance, affective disorders, and Alzheimer's disease: review and hypothesis. **Journals of Gerontology - Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v.59, p.178-183, 2004.

REID, S.W.; TESSAROLLO, L. Isolation, microinjection and transfer of mouse blastocysts. **Gene Knockout Protocols-Methods in Molecular Biology**, v.530, n.3, p.269-285, 2009.

REID, W.C.; CARMICHAEL, K.P.; SRINIVAS, S.; BRYANT, J.L. Pathologic changes associated with use of tribromoethanol (Avertin) in the Sprague Dawley rat. **Laboratory Animal Science**, v.49, n.6, p.665-667, 1999.

REITER, R.J. The melatonin rhythm: both a clock and calendar. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.49, n.8, p.654-664, 1993.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v.12, n.2, p.151-180, 1991.

REITER, R.J.; JOHNSON, L.Y.; VAUGHAN, M.K.; RICHARDSON, B.A. Pineal constituents and reproductive physiology. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.74, p.163-178, 1981.

RICHARD, D.; ROCHON, L.; DESHAIES, Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. **American Journal of Physiology**, v.253, p.740-745, 1987.

ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; PIRES, I.S.O.; TIRAPEGUI, J. O desmame precoce afeta o ganho de peso e a composição corporal em camundongos adultos? **Revista de Nutrição**, v.23, n.1, p.85-93, 2010.

SAAD, F.; GOOREN, L. The role of testosterone in the metabolic syndrome: A review. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.114, p.40-43, 2009.

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

SALLE, B.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; VAUDOYER, F.; POIREL, M.T.; FRANCK, M.; RIDIGOZ, R.C.; GUERIN, J.F. Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep. **Fertility and Sterility**, v.72, nº2, p.366-370, 1999.

SÁNCHEZ-SERRANO, M.; CRESPO, J.; MIRABET, V.; COBO, A.C.; ESCRIBÁ, M.J.; SIMÓN, C.; PELLICER, A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. **Fertility and Sterility**, v.93, n.1, p.268-e13, 2010.

SANTOS, E.T.; SAMPAIO, M.D.D.; CECON, P.R.; SIMÕES, M.J.; SARTORI, M.G.F.; GIRÃO, M.J.B.C. Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. **International Urogynecology Journal**, v.21, p.111-116, 2010.

SANTOS, K.R.P.; MENDONÇA, J.S.; TEIXEIRA, V.W.; TEIXEIRA, A.A.C. Influência da ausência de luz sobre o ciclo estral de ratas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.21-23, 2003.

SCHMIDT, C.; FRANCO, S.R.V.S.; VULCANO, L.C.; GODOY, C.L.B.; RAISER, A.G. Densidade mineral óssea em cadelas submetidas à ovariectomia com e sem reposição estrogênica oral. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 506-510, 2006.

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.

SILBER, S.J.; DEROSA, M.; PINEDA, J.; LENAHAN, K.; GREINIA, D.; GORMAN, K.; GOSDEN, R.G. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. **Human Reproduction**, v.23, p.1531-1537, 2008.

SILBER, S.J.; GOSDEN, R.G. Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. **New England Journal of Medicine**, v.356, p.1382-1384, 2007.

SILVA, A.C.; MONTAGNER, A.C. **Dicionário Latino-Português: Etimologia, Gramática, Derivações, Exemplos**. Petrópolis, RJ: Editora Vozes, 2009. 527 p.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, T.S.; OLIVEIRA, T.S.; OCARINO, N.M.; NASCIMENTO, E.F.; NUNES, V.A. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p.628-639, 2004.

SILVA, D.J; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3ªed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235p.

SIMPKINS, J.W.; RAJAKUMAR, G.; ZHANG, Y.Q.; SIMPKINS, C.E.; GREENWALD, D.; YU, C.J.; BODOR, N.; DAY, A.L. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. **Journal of Neurosurgery**, v.87, p.724-730, 1997.

SIMPKINS, J.W.; SINGH, M.; BISHOP, J. The potential role for estrogen replacement therapy in the treatment of the cognitive decline and neurodegeneration associated with Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v.15, suppl.2, p.195-197, 1994.

SIMPSON, E.; JONES, M.; KYLIE, M.; HILL, R.; MAFFEI, L.; CARANI, C.; BOON, W.C. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.95, p.3-8, 2005.

STEWART, C.L.; CULLINAN, E.B. Preimplantation development of the mammalian embryo and its regulation by growth factors. **Developmental Genetics**, v.21, p.91-101, 1997.

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.

STOCKARD, C.R.; PAPANICOLAOU, G.N. The existence of a typical oestrous cycle in the Guinea pig with a study of its histological and physiological changes. **American Journal of Anatomy**, v.22, p.225–283, 1917.

SUN, L.; PENG, Y.; SHARROW, A.C.; IQBAL, J.; ZHANG, Z.; PAPACHRISTOU, D.J.; ZAIDI, S.; ZHU, L.L.; YAROSLAVSKIY, B.B.; ZHOU, H.; ZALLONE, A.; SAIRAM, M.R.; KUMAR, T.R.; BO, W.; BRAUN, J.; CARDOSO-LANDA, L.; SCHAFFLER, M.B.; MOONGA, B.S.; BLAIR, H.C.; ZAIDI, M. FSH directly regulates bone mass. **Cell**, v.125, p.247-260, 2006.

TAMARKIN, L.; BAIRD, C.J.; ALMEIDA, O.F.X. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? **Science**, v.227, n.4688, p.714-720, 1985.

TARIN, D.; STRURDEE, A. Surgical anesthesia of mice: evaluation of tribromoethanol, ether, halothane and methoxyflurane and development of a reliable technique. **Laboratory Animals**. v.6, p.79-84, 1972.

TEIXEIRA, A.A.C.; SIMÕES, M.J.; EVÊNCIO NETO, J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Morphologic aspects of the endometrium, in the estrus phase, of pinealectomized rats. **Revista Chilena de Anatomía**, v.20, n.2, p.145-149, 2002.

TOTH, M.; TCHERNOF, A.; SITES, C.; POEHLMAN, E. Menopause related changes in body fat distribution. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v.904, p.502-506, 2000.

UESUGI, T.; TODA, T.; TSUJI, K.; ISHIDA, H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.4, p.368-372, 2001.

WANG, X.; CHEN, H.; YIN, H.; KIM, S.S.; TAN, S.L.; GOSDEN, R.G. Fertility after intact ovary transplantation. **Nature**, v. 415, p. 385, 2002.

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.

WEAVER, D.R.; STEHLE, J.H.; STOPA, E.G.; REPERT, S.M. Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.76, n.2, p.295-301, 1993.

WEBER, M.; MAPSTONE, M. Memory complaints and memory performance in the menopausal transition. **Menopause**, v.16, p.694-700, 2009.

WEBSTER, R.S. **O papel do condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão do músculo grácil de ratos**. São Paulo, SP: Tese (Mestrado em Cirurgia e Experimentação), 2005. Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 62p.

WEISS, J.; ZIMMERMANN, F. Tribromoethanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. **Laboratory Animals**, v.33, p.192-193, 1999.

WINKLER, E.; RAVID-MEGIDO, M.; ROSIN, D.; KURIANSKY, J.; YUDITZ, A.; HOROWITZ, A.; ORENSTEIN, A.; SHABTAI, M.; AYALON, A.. The use of magnetic resonance imaging in the differential diagnosis between starch and fecal peritonitis. **International Journal of Surgical Investigation**, v.2, n.6, p.475-482, 2001.

WITZ, C.A.; MONOTOYA-RODRIGUEZ, I.A.; SCHENKEN R.S. Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion. **Fertility and Sterility**, v.71, n.1, p.56-60, 1999.

WOLNER-HANSEN, P.; HÄGGLUND, L.; PLOMAN, F.; RAMIREZ, A.; MANTHORPE, R.; THURING, A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> 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.

WRANNING, C.A.; MARCICKIEWICZ, J.; ENSKOG, A.; DAHM-KÄHLER, P.; HANAFY, A.; BRÄNNSTRÖM, M. Fertility after autologous ovine uterine-tubal-ovarian transplantation by vascular anastomosis to the external iliac vessels. **Human Reproduction**, article in press, p.1-7, 2010.

WRANNING, C.A.; AKHI, S.N.; KURLBERG, G.; BRANNSTROM, M. Uterus transplantation in the rat: Model development, surgical learning and morphological evaluation of healing. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.87, p.1239-1247, 2008.

YANASE, T.; FAN, W.; KYOYA, K.; MIN, L.; TAKAYANAGI, R.; KATO, S.; NAWATA, H. Androgens and metabolic syndrome: lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.109, p.254-257, 2008.

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.

YELLON, D.M.; BAXTER, G.F.; DORADO, D.G.; HEUSCH, G.; SUMERAY, M.S. Ischaemic preconditioning: present and future directions. **Cardiovascular Research**, v.37, p.21-33, 1998.

ZOTH, N.; WEIGT, C.; LAUDENBACH-LESCHOWSKI, U.; DIEHL, P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.122, p.100-105, 2010.

## APÉNDICE

**Apêndice A: INSTRUMENTAL CIRÚRGICO**

Instrumental cirúrgico utilizado para realização dos procedimentos de ovariectomia bilateral e transplante autólogo ovariano para diferentes sítios receptores.

**- Especial e Auxiliar:**

- . Pinça de Allis Baby para tecidos 12cm
- . Pinça de campo Backhaus 10cm
- . Pinça de dissecação 10cm
- . Pinça para íris 10cm
- . Pinça para íris (denteada) 10cm

**- Diérese:**

- . Cabo para lâmina de bisturi nº4
- . Tesoura para íris com ponta reta 11,5cm
- . Tesoura para íris com ponta curva 11,5cm
- . Pinça de dissecação 12cm
- . Pinça de dissecação (denteada) 10cm
- . Tesoura para suturas de Spencer

**- Hemostasia:**

- . Pinça hemostática mosquito de Halsted com ponta reta 12cm
- . Pinça hemostática mosquito de Halsted com ponta curva 12cm

**- Síntese:**

- . Pinça de dissecação 10cm
- . Pinça de dissecação 12cm
- . Pinça de dissecação (denteada) 12cm
- . Porta-agulha Mathieu 10cm
- . Porta-agulha Mayo-Hegar 14cm