

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AUTOTRANSPLANTAÇÃO DE OVÁRIO NO
SUBCUTÂNEO E CONSUMO FOLICULAR EM GATAS
DOMÉSTICAS (*Felis catus*)**

**Fernanda Mandim Crestana
Médica Veterinária**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Novembro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AUTOTRANSPLANTAÇÃO DE OVÁRIO NO
SUBCUTÂNEO E CONSUMO FOLICULAR EM GATAS
DOMÉSTICAS (*Felis catus*)**

Fernanda Mandim Crestana

**Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini
Co-orientador: Prof. Dr. Cirilo Antônio de Paula Lima**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias (Saúde Animal)**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Novembro de 2006

“Pensando bem,

*ser Veterinário não é só cuidar
de animais. É perder medos,
e ganhar amigos de pêlos e penas,
que jamais irão decepciona-lo.*

*Ser Veterinário é ter coragem de
Penetrar num mundo diferente
e ser igual.*

*É principalmente adivinhar
olhares, compreender gratidões
mudas e sem dúvida alguma,
as únicas verdadeiras.”*

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação ao meu marido Glauco e aos meus pais que sempre estiveram presentes com dedicação e pensamentos de força e otimismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar mais essa oportunidade de aprendizado.

Aos meus pais e meus irmãos pela importância dada a mais essa etapa da minha vida.

Ao meu orientador professor Jacomini pela dedicação, orientação e confiança em todas as fases dessa dissertação.

Ao professor Cirilo pela co-orientação e ao professor Beletti pela ajuda no processamento, leitura do material e na estatística.

Aos funcionários do Hospital Veterinário pela colaboração dada durante o tempo em que lá estive.

Agradeço às gatas que me retribuíram com seu amor sincero, e às pessoas que com muito carinho as adotaram no final do experimento.

À Juliana e a Sabrina pela parceria na realização das cirurgias, curativos, limpeza e disposição a qualquer hora do dia ou da noite. Jú, muito obrigada pela amizade que construímos, companheirismo e dedicação! À Fátima e a Elenir pela ajuda e disponibilidade.

Ao Glauco, agradeço por sempre me dar força, por ter entendido a minha dedicação intensa às gatas durante os finais de semana únicos que tínhamos pra nos encontrar. Agradeço por ele não deixar que a distância e a saudade das pessoas e animais queridos, e que até mesmo o frio da Alemanha me desanimasse ao escrever essa dissertação. Obrigada pelo amor, força e compreensão durante todo esse período!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS -----	vii
LISTA DE TABELAS -----	ix
RESUMO -----	x
ABSTRACT -----	xi
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DA LITERATURA -----	3
2.1 Consumo folicular -----	3
2.2 Autotransplante Ovariano -----	8
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	21
3.1 Animais e Local -----	21
3.2 Critério de Inclusão dos animais no experimento -----	21
3.3 Protocolo Experimental-----	21
3.3.1 Grupos -----	22
3.3.2 Medicções Pré e Pós Operatórias -----	22
3.3.3 Abordagem Cirúrgica -----	23
3.3.3.1 Momento Zero -----	24
3.3.3.2 Momento 1 -----	25
3.3.4 Preparo do Material -----	26
3.3.5 Análise do Material -----	28
3.4 Análise Estatística -----	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	29
6. CONCLUSÕES -----	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ovariectomia realizada no momento zero em gata doméstica. ----	23
Figura 2. (A e B) Secção transversal do ovário de gata doméstica em três segmentos, antes da realização do implante subcutâneo. -----	24
Figura 3. (a e b) Túnel obtido no subcutâneo de gata doméstica com pinça anatômica simples, para colocar os implantes. -----	25
Figura 4. Ponto em U, após o transplante subcutâneo dos fragmentos ovarianos em gata doméstica. -----	25
Figura 5. Exteriorização do ovário remanescente após 120 dias (A), e sutura da parede abdominal (B) em gata doméstica. -----	26
Figura 6. Localização (A) e retirada (B) do implante ovariano no subcutâneo, após 120 dias em gata doméstica. -----	26
Figura 7. Visualização do implante subcutâneo após a cirurgia de ovariectomia e implante ovariano heterotópico em gata doméstica (A e B).--	30
Figura 8. Cortes histológicos de ovário de gata doméstica, corados com hematoxilina e eosina. (A) Momento zero do ovário controle. (B) Momento 1 do ovário remanescente. Presença de folículos primordiais (a), primários (b) e secundário (c). Escala de baar = 50 µm. -----	32
Figura 9. Corte histológico de ovário remanescente de gata doméstica, corado com hematoxilina e eosina. Presença de folículos em várias fases de desenvolvimento: primordiais (a), primários (b), secundário (c) e terciário (d). Escala de baar = 50 µm. -----	33
Figura 10. Corte histológico de ovário de gata doméstica implantado, corado com hematoxilina e eosina. Presença de folículos primordiais (a) e glândula mamária (b). Escala de baar = 50 µm. -----	34
Figura 11. Corte histológico de ovário de gata doméstica implantado, corado com hematoxilina e eosina, com folículos primordiais (a) e primário (b). A seta indica fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular. Escala de baar = 50 µm. -----	34
Figura 12. Média da freqüência dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle, no ovário remanescente e no ovário implantado. -----	37

- Figura 13.** Média da frequência dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle e remanescente segundo a lateralidade. ----- 40
- Figura 14.** Média do diâmetro dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle e remanescente segundo a lateralidade. ----- 41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Probabilidades associadas aos valores de t, obtidas quando da aplicação do teste de Wilcoxon às freqüências de folículos ovarianos, encontrados no ovário controle, no remanescente e no implantado, considerando-se os valores relativos aos tipos de folículos: primordial, primário, secundário e terciário. -----	36
Tabela 2. Média do diâmetro dos folículos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle, no ovário remanescente e no ovário implantado. -----	36
Tabela 3. Probabilidades associadas aos valores de t, obtidas quando da aplicação do teste de Wilcoxon às freqüências de folículos ovarianos, encontrados no ovário controle e no remanescente, aos valores relativos aos tipos de folículos: primordial, primário, secundário e terciário, considerando-se a lateralidade. -----	39
Tabela 4. Probabilidades associadas aos valores de t, obtidas quando da aplicação do teste de Wilcoxon às medidas de diâmetro dos folículos encontrados no ovário controle e no ovário remanescente, considerando-se os tipos de folículos: primordial, primário, secundário e terciário e a lateralidade. -----	39

AUTOTRANSPLANTAÇÃO DE OVÁRIO NO SUBCUTÂNEO E CONSUMO FOLICULAR EM GATAS DOMÉSTICAS (*Felis catus*)

Resumo: O objetivo desse estudo foi estabelecer o consumo folicular do ovário remanescente e do implantado no subcutâneo de gatas domésticas após 120 dias pela quantificação e classificação morfométrica dos mesmos e em relação à preservação da organização tecidual. Foram utilizadas treze gatas (*Felis catus*), sem raça definida, distribuídas em dois grupos: G1 (Animais 1 a 7, com amostras de ovário esquerdo para controle e implante e ovário direito remanescente) e G2 (Animais 8 a 13, com amostras de ovário direito para controle e implante e ovário esquerdo remanescente). Após ovariectomia unilateral, o ovário foi seccionado transversalmente em três segmentos proporcionais. Os dois terços cranial e caudal foram transplantados no subcutâneo, e o terço médio foi para análise histológica de rotina como controle. Decorridos 4 meses, retirou-se os implantes e o ovário remanescente para serem avaliados em microscopia óptica de luz. Os implantes foram localizados em 38,4% das gatas e a histologia mostrou folículos primordiais (59,75%), folículos primários (40,25%) e fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular. O número médio de folículos primários foi maior no ovário implantado (36,10/mm²) em relação ao ovário controle (12,11/mm²) e ao ovário remanescente (16,27/mm²). O ovário remanescente mostrou aspecto macroscópico normal e folículos em todos os estágios de desenvolvimento, com número médio de terciários (1,12/mm²) superiores ao do ovário controle (0,96/mm²). O diâmetro dos folículos primordiais foi maior no ovário controle (41,51µm) em relação ao remanescente (37,30µm), o dos primários no controle foi maior (57,5µm) que no remanescente (47,5µm) e no implante (38,33). Considerando a lateralidade, os folículos terciários nos remanescentes foram mais freqüentes no lado direito e em relação ao diâmetro, os folículos primários nos controles foram superiores no lado esquerdo. Conclui-se que os implantes ovarianos recuperados nesse estudo apresentaram apenas folículos primordiais e primários, com fibroplasia de tecido conjuntivo interfolicular. Seria útil um tempo de estudo maior que 120 dias para analisar o consumo folicular nestes animais, pois nesse período não ficou caracterizado perda folicular.

Palavras-chave: gatas domésticas, autotransplante ovariano, subcutâneo, consumo folicular.

THE SUBCUTANEOUS AUTO-TRANSPLANTATION OVARIES AND FOLLICULAR DEPLETION IN DOMESTIC CATS (*FELIS CATUS*)

Abstract: The main goal of this study was to establish the follicular depletion of the remaining and implanted ovaries in the subcutaneous in domestic cats after 120 days, by quantification and morphometric classification, and with respect to the preservation of the tissue organization. Thirteen female domestic cats (*Felis catus*) were used, distributed into two groups: G1 (cats 1 to 7, with left ovary as control and implant, and right ovary remaining), and G2 (cats 8 to 13, with right ovary as control and implant, and left ovary remaining). After unilateral ovariectomy, the ovary was sliced in three parts. The two extremities were implanted under the skin, and the middle section was used as control. Four months later, the implants and the remaining ovary were removed and observed under light microscopy. The implants were found in 38.4% of the cats, and the analysis showed a large number of primordial follicles (59.75%), primary follicles (40.25%), and conjunctive fibroplasia. The average size of the primary follicles was larger in the implanted ovary (36.10/mm²) than in the control ovary (12.11/mm²), and larger than in the remaining ovary (16.27/mm²). The remaining ovary showed regular appearance with follicles in all stages of development, with the average of the tertiary follicles (1.12/mm²) larger than the control (0.96/mm²). The diameter of primordial follicles was bigger in the control ovary (41,51µm) in relation to the remaining (37,30µm). The primary in the control was bigger (57,5 µm) than the remaining (47,5µm) and bigger than the implants (38,33µm). Considering the side, the tertiary follicles in the remaining had been more frequent in the right side and in relation to the diameter; the primary follicles in the controls had been bigger in the left side. We conclude that the ovarian implants recovered in this study only presented primordial and primary follicles, with fibroplasia. A length of study longer than 120 days to analyze follicular depletion would also be useful, because in that period this fact was not characterized.

Keywords: domestic cats, ovarian auto-transplantation, subcutaneous, follicular depletion.

1. INTRODUÇÃO

A família do gato (Felidae) está composta de 37 espécies e, como muitos outros animais em extinção, o declínio das populações felinas, com a exceção do gato doméstico, ocorre principalmente devido à taxa acelerada de destruição de hábitat e à caça (BRISTOL, WOODRUFF, 2004).

A preservação de espécies em extinção já era uma preocupação quando Wildt *et al.* (1986) defenderam a necessidade de programas de procriação em jardins zoológicos e em parques de vida selvagem para sustentar as linhagens genéticas e a biodiversidade. Porém, enquanto alguns felinos em cativeiro recriam facilmente, outros reproduzem freqüentemente de forma insatisfatória. Normalmente o resultado é complicado por falta de informação sobre a fisiologia das espécies felinas.

Comparativamente, a maioria dos ovócitos presentes em ovários fetais é perdida antes do nascimento e só aproximadamente 400 vão ovular durante o período de vida fértil normal da mulher (DEPALO *et al.*, 2003). Este consumo contínuo acelerado de ovócitos é resultante de um mecanismo complexo de morte celular conhecido como apoptose. No consumo folicular, os fatores indutores ou atenuadores da degeneração e atresia podem ser diferentes durante a fase embrionária, fetal e vida extra-uterina (MEDEIROS, YAMAMOTO, 1998).

Além de se estudar o consumo folicular, alternativas promissoras na reprodução vêm sendo desenvolvidas, principalmente na medicina humana, e pesquisas indicam que ovários transplantados em locais heterotópicos e ortotópicos, com ou sem pedículo vascular, criopreservados ou frescos, podem preservar a função endócrina, mantendo a viabilidade folicular e reduzir conseqüentemente, a ocorrência de menopausa precoce. A medicina veterinária também tem expandido muito nessa linha de pesquisa; em cães, alguns pesquisadores relatam o uso de autotransplante ovariano em mucosa estomacal como Davies (1989), e na tela subcutânea, Matera *et al.* (1998) e Schossler *et al.* (1999) estudaram o implante autólogo heterotópico ovariano como alternativa de minimizar os efeitos indesejáveis da esterilização.

Existe pouca literatura sobre o implante ovariano em gatas, apesar de Bristol e Woodruff (2004), acreditarem que o gato doméstico é um modelo ideal para estudar a dinâmica do folículo ovariano, devido à abundância de todas as populações de folículo, incluindo a fase primordial.

Seria promissor tanto para a medicina quanto para a medicina veterinária, o conhecimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento e consumo folicular para investir em métodos alternativos de reprodução, como os implantes e até na maturação e fertilização *in vitro*, o que seria importante para espécies em extinção.

O objetivo desse estudo foi estabelecer a taxa de consumo folicular no ovário remanescente e no tecido ovariano autólogo transplantado para o subcutâneo de gatas domésticas, após 120 dias, pela quantificação e classificação morfométrica dos mesmos e em relação à preservação da organização tecidual.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Consumo Folicular

Os ovários da maioria dos animais são formados pelo córtex (zona parenquimatosa) e pela medula (zona vascular). O córtex contém numerosos folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, assim como células intersticiais e elementos do estroma (BANKS, 1992).

O desenvolvimento folicular é um processo dependente de fatores locais produzidos pelos ovários e da sinalização endócrina clássica dentro do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BRISTOL, WOODRUFF, 2004). Os ligantes representados pelo fator transformador de crescimento β (TGF β) também participam desse desenvolvimento de acordo com Eppig (2001), e foram estudados dentro do ovário felino em todas as fases de desenvolvimento folicular pela imunolocalização por Bristol e Woodruff (2004).

Em humanos, ao nascimento há no córtex 500.000 folículos não-crescentes ou inativos por ovário, mas só 400 destes folículos desenvolverão a fase pré ovulatória (DEPALO *et al.*, 2003). Uma proporção significativa de ovócitos no ovário humano se degenera durante a vida fetal pelo mecanismo de apoptose, de acordo com Vaskivuo *et al.* (2001), e isto já é evidente a 13 semanas de gestação, sendo observado até 28-32 semanas. Em todas as espécies vertebradas examinadas por Morita e Tilly (1999), fêmeas nascem com poucos ovócitos, na realidade, mais de dois terços do potencial germinativo feminino está perdido até o nascimento em ratos e humanos.

Da perspectiva bioquímica, uma das características atribuídas às células em apoptose é a perda de integridade do DNA, seguida da fragmentação mediada pela endonuclease do “pool” do genoma nuclear (WILLIAMS *et al.*, 1974 apud TILLY, 1996). A fragmentação apoptótica de DNA foi encontrada por Depalo *et al.* (2003) em 23,4% dos folículos primordiais e em 23,2% dos folículos primários, assim

sugere que apoptose em folículo inativo pode acontecer inicialmente no folículo e subsequente na célula germinativa.

A apoptose é o mecanismo primário pelo qual a perda de célula é mediada durante a degeneração do folículo (TILLY, RATTIS, 1996). Depalo *et al.* (2003) relatam que apoptose é a morte programada de ovócitos e células da granulosa, que pode operar a seleção entre folículos destinados para sofrer atresia e folículos que permanecerão viáveis para ovulação. Em animais, Vaskivuo *et al.* (2001) mostraram que apoptose é o mecanismo de depleção de ovócito e atresia folicular.

A perda maior de células germinativas acontece durante a divisão populacional de ovogônios nas fases posteriores de desenvolvimento fetal, embora a degeneração celular continue depois do nascimento e é observada em células mitóticas e pós-mitóticas (TILLY, 1996).

Em todo o ciclo ovariano, centenas de folículos primordiais entram na fase crescente, observando-se a maioria das células em apoptose, que indicam quais ovócitos podem ter o mecanismo intrínseco para sua ativação durante o desenvolvimento folicular. No feto, a apoptose ocorre principalmente em folículos primários e em adultos foi descoberto também em folículos secundários e antrais (VASKIVUO *et al.* 2001).

Os critérios pelos quais a apoptose é caracterizada incluem perda de volume celular (condensação do citoplasma) acompanhada por picnose nuclear, que é o resultado da marginação da cromatina e sua redistribuição contra o envelope nuclear. Além disso, muitas organelas citoplasmáticas são mantidas intactas até o final do estágio de morte celular, o qual é identificado pela formação e liberação de vesículas da membrana do protoplasma (corpos de apoptose) contendo os componentes celulares que são então fagocitados pelas células vizinhas (TILLY, 1996).

O estudo de Gaytán *et al.* (1998), demonstrou uma associação íntima entre a presença de macrófagos e células da granulosa picnóticas em folículos crescentes de ratos imaturos. Estas células, correspondendo às células de apoptose, constituíram o marco clássico de atresia folicular. Em contraste, macrófagos estavam ausentes em folículos atrésicos iniciais de ratos adultos, apesar do número

alto de células em apoptose que pareciam ser fagocitadas pelas células de granulosa vizinhas.

A atresia folicular está presente no citoplasma da célula da granulosa, espaço antral, citoplasma do ovócito e zona pelúcida. Adicionalmente, os folículos em atresia tinham o ovócito com evidência de morte celular, que incluiu expansão da zona pelúcida e uma perda discreta de bordas (BRISTOL, WOODRUFF, 2004).

Os estudos comparativos da progressão da apoptose nas células da granulosa durante atresia folicular, realizados por Manabe *et al.* (2004), revelaram que há diferenças espécie-específicas no processo de apoptose nessas células. Em ovários de roedores, foram observadas em folículos nas fases iniciais, em bovinos, na superfície exterior da parede folicular, e em suínos, porém, verificaram células de granulosa localizadas na superfície interna que pareciam sofrer apoptose.

Os ovários de gatos domésticos contêm um variável e complexo número de folículos nos quais foram confirmadas atresias em vários estágios de desenvolvimento. Na maioria dos folículos antrais de pequeno a médio tamanho, a atresia no citoplasma do ovócito se mostrou gradual no começo e foi expressa por vacúolos centralizados e um aumento de transparência do citoplasma (WOOD *et al.*, 1997).

Hsueh *et al.* (1994), salientam que se o sinal de ovulação estiver ausente, os folículos maduros sofrem degeneração, como ocorre em coelhos e pelos quais os folículos das primeiras ondas de crescimento são eliminados em ruminantes domésticos, como ovelhas e vacas. Os autores demonstraram que os folículos dominantes da primeira onda que normalmente sofrem atresia, podem ser estimulados a ovulação, contanto que o estímulo seja determinado antes deles alcançarem a fase de regressão avançada. Uma associação íntima entre o ovócito e as células da granulosa é estabelecida por junções durante fases primárias da foliculogênese, e provavelmente todas as fases de crescimento folicular são associadas com atresia.

Segundo Santoro (2003), com o tempo os folículos estão sujeitos a atresia, que podem ser por causas autoimunes, infecciosas, cirúrgicas, vasculares, tóxicas e também psicológicas nas mulheres.

No amadurecimento folicular, os controles de apoptose no ovócito, granulosa e células da teca são complexos, porque eles têm uma cavidade antral e uma morfologia estrutural muito complexa, enquanto exigem intensa atividade metabólica e hormonal, mantêm a proliferação celular, os processos finais de maturação de ovócitos e atividade esteroideogênica da granulosa e células da teca. Dentro do folículo parece haver um plano estrutural que comunica os sinais de atresia de uma única célula para todas as outras na estrutura, mas a evidência de células granulosa com sinais de apoptose necessariamente não significa que o folículo inteiro é destinado a sofrer atresia (DEPALO *et al.*, 2003).

A foliculogênese é importante na regulação parácrina e autócrina (MCMULLEN *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2001). Segundo Chun *et al.* (1996), as citocinas têm um papel fundamental no controle do desenvolvimento ovariano. Os folículos ficam mais responsivos possivelmente aos fatores de crescimento pela aquisição de números crescentes de receptores durante a fase final de maturação.

Há evidência crescente de que o hormônio folículo estimulante (FSH), embora não sendo obrigatório, facilita a iniciação de crescimento folicular ou estimula cedo o seu desenvolvimento, em uma cooperação complexa com outros fatores largamente desconhecidos (TE VELDE *et al.*, 1998).

Segundo Ponderato *et al.* (2000) e Markström *et al.* (2002), a atresia folicular é um processo regulado por hormônios, e diversos fatores afetam na decisão de morte celular, em diferentes estágios do desenvolvimento folicular. Embora alguns fatores de crescimento afetem a sobrevivência folicular, o meio fisiológico de regulação é o FSH e o hormônio luteinizante (LH). Entretanto, Depalo *et al.* (2003), relatam que o fator primário responsável pela manutenção de sobrevivência da célula da granulosa parece ser o FSH, mas em folículo primordial e primário, que são gonadotrofinas independentes, a apoptose é um evento fisiológico celular autônomo que é independente de mudanças no ambiente hormonal ovariano e não é uma consequência de mudanças ou alterações no genoma celular. Cunningham (2004), relata que não está claro se os folículos não se desenvolvem de seu estado primordial por redução absoluta, ou relativa, no número de folículos ou se a ausência

de receptores de gonadotrofinas impede que os folículos entrem em estado de crescimento dependente de gonadotrofina.

No estudo de Chun *et al.* (1996), o tratamento com FSH suprimiu a apoptose do folículo primordial e em folículos antrais primários, uma fase crítica durante a qual a maioria de folículos sofre atresia. Hirshfield (1991) completa que concentrações fisiológicas de FSH são capazes de estimular folículos antrais iniciais para completar a diferenciação final, enquanto alcançam o estágio pré ovulatório.

Baixas concentrações ou ausência de FSH podem acabar com os eventos reprodutivos pela iniciação da depleção folicular, mas quando são relativamente baixas por longos períodos, a menopausa tende a aparecer mais tarde (TE VELDE *et al.*, 1998). O mecanismo de seleção folicular durante o ciclo reprodutivo normal é a exposição de folículos ao FSH durante uma fase crítica de desenvolvimento. Folículos que recebem FSH insuficiente durante este período são sentenciados a atresia (HSUEH *et al.*, 1994).

A produção de estrógeno diminuída em algumas espécies resulta em acúmulo concomitante de andrógeno no fluido folicular, sugerindo possível papel no processo de atresia. O andrógeno diminuiu o peso ovariano em ratos hipofisectomizados, com aumento do número de células de granulosa picnóticas e ovócitos degenerados, induziu atresia com baixas doses de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e inibiu bloqueadores de receptor de andrógeno (HSUEH *et al.*, 1994). Chaffin e Stouffer (2000) verificaram baixos números de folículos em atresia após administração de hCG em seus estudos e completam que a progesterona pré ovulatória tem papel indispensável na ovulação e luteinização, controlando e remodelando o tecido do folículo ovulatório.

Nenhuma correlação positiva foi encontrada por Depalo *et al.* (2003), entre a idade do paciente e apoptose, porém houve correlação positiva entre organização folicular e apoptose, demonstrando ser evidente dentro de folículos primordial e primário. Em contrapartida, Bedaiwy *et al.* (2003), verificaram ausência de sinais de apoptose nos folículos primordiais, sendo que requer metabolismo ativo e normalmente leva várias horas ou até mesmo dias para se manifestar.

Meredith *et al.* (2000) relatam que a senescência reprodutiva é progressiva e as únicas categorias de folículos que decrescem significativamente com o aumento da idade são os folículos crescentes e não crescentes. Miller *et al.* (1999), detectaram que os folículos declinam em número, seguido de perda linear durante os anos reprodutivos em macacos.

Korfsmeier (1983) estudou por microscopia eletrônica e métodos histoquímicos, ovários de gatas imaturas de 2 a 6 semanas de vida. Foram encontrados numerosos folículos primordiais na periferia ovariana. Os ovócitos estavam rodeados por uma simples camada de células foliculares e exibiam microvilosidades estreitas projetadas entre o ovócito e o epitélio folicular. Ocasionalmente as células foliculares mostraram largas junções de aberturas entre as células foliculares com conteúdo pálido. O limite dos folículos era marcado por uma fina lâmina basal.

A descoberta de estratégias para diminuir ou desacelerar a taxa de consumo folicular seria de grande importância para a manutenção da fertilidade por mais tempo (MEDEIROS, YAMAMOTO, 1998). Segundo Pru e Tilly (2001), hoje já se tem ferramentas e tecnologias à disposição para traçar o mapa genético da apoptose dentro do ovário. Assim, há uma necessidade de interação de estratégias genéticas e bioquímicas novas para o descobrimento do gene nestas investigações.

2.2 Autotransplante Ovariano

Conforme Banks (1992), o ovário tem funções exócrinas e endócrinas, sendo esta responsável pela produção de estrógenos e de progesterona. Os estrógenos influenciam várias funções do corpo além das associadas à reprodução. A progesterona colabora com os estrógenos na expressão do comportamento sexual característico associado ao estro em canídeos.

A limitação da fertilidade dos carnívoros domésticos é um assunto de marcante interesse e discussão na última década (CARTER, 1990). A fêmea é o

alvo principal de intervenções de controle e supressão da reprodução (MIALOT, 1988).

A ovariectomia é, sem dúvida, a cirurgia mais rotineiramente utilizada na casuística veterinária. Esta técnica apresenta as vantagens da ovariectomia, de supressão de toda a atividade sexual, além de não deixar o animal sujeito as alterações uterinas, tais como a piometrite, uma afecção tão comum em pequenos animais e não muito rara em pacientes submetidos à ovariectomia somente (CHRISTIANSEN, 1988). Segundo Wilson e Hayes Jr. (1986), na fêmea normal, o principal objetivo da ovariectomia é de se evitar o estro, bem como os inconvenientes deste, relata Smith (1974), tais como, descarga sangüínea, atração de machos, coberturas acidentais, prenhez e filhotes indesejados.

De acordo com Davidson e Feldman (1997), a administração exógena crônica de estrogênio causa seqüelas como discrasias da medula óssea, predisposição à hiperplasia das glândulas endometriais (complexo piometra), e desenvolvimento de cistos ovarianos.

O auto-enxerto ovariano é sugerido como uma alternativa à ovariectomia na cadela, pois implica na produção de hormônios ovarianos e, conforme Christiansen (1988), se empregado em associação com a histerectomia para a prevenção das desordens uterinas, poderá ser um método de eleição.

O transplante resulta essencialmente na sincronização do desenvolvimento folicular primário, e depois da cirurgia é necessário de 3 a 6 meses para os animais começarem a ciclar (CAMPBELL *et al.*, 2000). A função ovariana diminui na maioria dos casos por causa de depleção da população de folículos primordiais em consequência de tratamentos quimioterápicos ou irradiação pélvica em mulheres. Uma alternativa fisiológica de manter a função hormonal é o transplante ovariano heterotópico (CALLEJO *et al.*, 1999; WEISSMAN *et al.*, 1999; OKTAY *et al.* 2001; ALBERTI *et al.*, 2002b; SCHNORR *et al.*, 2002).

Segundo Ksiazkiewicz (2006), os transplantes têm sido estudados em ratos mutantes homozigotos, pois nestes animais faltam tanto células humorais quanto células mediadoras de imunidade, pela ausência de células T e linfócitos B. Então,

eles aceitam transplantes de tecido ovariano prontamente de outras espécies de mamíferos.

Nance *et al.* (1982-83), acreditavam que a presença ou ausência de um “feedback” nervoso apropriado das gônadas era um importante componente no controle neuro endócrino. Enxertos ovarianos na ausência de inervação gonadal intacta podem aparentemente manter normal a função endócrina pelo mecanismo de controle de “feedback” sanguíneo.

Diversos trabalhos procuram descobrir o melhor local para realizar o auto-implante ovariano, bem como a forma mais adequada de tal procedimento para preservar a função ovariana, relatam Alberti *et al.* (2002b). O autotransplante ovariano pode ser realizado tanto ortotópico (retornar para o pedículo ovariano) como heterotópico (transplante do tecido para outros locais, como debaixo da pele). O autotransplante tem uma série de vantagens de outras estratégias, pois o tecido ovariano é dotado de muitos folículos primordiais. Cerca de 1 mm³ de córtex ovariano contém centenas de ovócitos (LEE *et al.*, 2001).

O implante autólogo ovariano heterotópico, tem sido proposto, com o objetivo de se manter concentrações hormonais fisiológicas. Diversas técnicas de implante autólogo ovariano vêm sendo pesquisadas continuamente em animais (ALBERTI *et al.*, 2002a). Embora o transplante ortotópico tenha a possibilidade de restaurar a fertilidade natural, transplantes heterotrópicos requerem reprodução assistida (YIN *et al.*, 2003).

O número total de folículos no ovário é drasticamente diminuído no processo de transplante e os folículos antrais pequenos recrutados dos quais os folículos ovulatórios são selecionados, são depois limitados (CAMPBELL *et al.*, 2000). O folículo não crescente e o folículo primordial são recursos que podem ser utilizados ou manipulados para aliviar a infertilidade, e até produzir a contracepção (FORTUNE *et al.*, 2000).

Os alotransplantes foram vigorosamente rejeitados em ratos, no experimento de Yin *et al.* (2003). Em contrapartida, de acordo com Yves (2000), os alotransplantes têm uma vantagem grande sobre a doação de ovócitos em restabelecer as funções endócrinas do ovário e assim evitar necessidade de

hormônios de substituição. Dissen *et al.* (1994) usaram o alotransplante de córtex ovariano adjacente à veia jugular, e a revascularização do enxerto foi iniciada dentro de 48 h após o transplante.

O autotransplante ortotópico ovariano em porcas, onde o ovário esquerdo substituiu o direito, com anastomose vascular da aorta e veia cava, foi seguido de ciclicidade, gestação e lactação aparentemente normais (HARRISON, 1982).

É conveniente, segundo Nugent *et al.* (1997), que o tecido ovariano seja facilmente visualizado em um local heterotópico. Contanto que uma provisão de sangue satisfatória esteja disponível, podem ser estabelecidos ciclos normais em locais heterotópicos. Dissen *et al.* (1994) demonstraram que a autotransplantação ovariana em ratos juvenis em local heterotópico resultou em rápida revascularização da glândula.

Para Wolner-Hanssen *et al.* (2005), o autotransplante de tecido ovariano tem duas metas principais: restabelecer produção de hormônio e desenvolvimento folicular no paciente para alcançar gestação. A revascularização deve ser rápida, o transplante deve ser possível com cirurgia mínima, acessível facilmente com exame e manipulações, inclusive aspiração do folículo.

O estudo da preservação da função ovariana em várias espécies animais, resulta em informações conflitantes na literatura quanto à eficácia da manutenção dos níveis hormonais (GUNASENA *et al.*, 1997). Alguns animais falham na ovulação ou têm uma fase folicular prolongada, pois não possuem folículos disponíveis nos transplantes para serem promovidos ao estágio ovulatório (CAMPBELL *et al.*, 2000). Na gata, segundo Dawson e Friedgood (1940), a ovulação é o resultado de um reflexo neuro endócrino iniciado por copulação ou um estímulo equivalente.

Estudos com roedores de laboratório demonstraram que os enxertos ficam menos efetivos com a idade porque os folículos primordiais ficam mais escassos e o órgão acumula tecido fibroso denso. Teoricamente, uma suspensão de folículos primordiais poderia ser injetada no estroma para repopular o córtex ovariano (NUGENT *et al.*, 1997).

Folículos pequenos e células germinativas pré-foliculares isoladas de ovários fetais ou imaturos podem ser transplantados para um ovário anfitrião, onde eles

completam o crescimento e a maturação. O método de transferência varia entre as espécies. Se o objetivo é promover longa fecundidade para o anfitrião é necessário que se use folículos primordiais ao invés de folículos em crescimento, desde que alguns desses possam continuar, nos estágios restantes, a promover atividade longa aos transplantes (GOSDEN, 1992). Segundo Nugent *et al.* (1997), há vantagens teóricas no isolamento folicular, como a seleção de fases desejadas de desenvolvimento e eliminação de célula não desejada.

O ovário de mamíferos, quando transplantado para um sítio ectópico, torna-se hormonalmente competente e capaz de ovular dentro de poucas semanas, garantem Dissen *et al.* (1994). No entanto, problemas técnicos dos transplantes, como a incerteza do sucesso da revascularização do órgão, a rejeição do tecido transplantado e a toxicidade das drogas imunossupressoras, freqüentemente obscurecem o objetivo original desse tópico (BRITO *et al.*, 2005).

A neovascularização de enxertos ovarianos pode ser diferente de acordo com o local de transplante. Assim, é plausível que a revascularização do tecido ovariano transplantado na bursa ovariana seja melhor. A isquemia que inevitavelmente acontece durante o enxerto causa a morte de uma fração significativa de ovócitos. Com a perda da população, a função endócrina do ovário está temporariamente suspensa, mas retorna, uma vez que foram recrutados folículos primordiais sobreviventes (CALLEJO *et al.*, 2002; NISSOLE *et al.*, 2000).

Reciprocamente, o dano de isquemia-perfusão produzido durante o processo de vascularização é o fator principal responsável para a redução drástica em populações foliculares em tecido ovariano transplantado (BOSCH *et al.*, 2004). A rápida revascularização do tecido ovariano é influenciada pela abundância de fatores angiogênicos, fatores de crescimento de fibroblastos, transformação de fatores de crescimento, níveis de gonadotrofinas e esteróides ovarianos (TORRENTS *et al.*, 2003; NUGENT *et al.*, 1997; DISSEN *et al.*, 1994).

Alguns destes danos podem ser causados por reações de oxigênio geradas durante isquemia-reperfusão; além disso, folículos ovarianos podem ser resistentes a isquemia, por regularmente se desenvolver dentro do epitélio avascular e um ambiente de hipóxia relativa. A população de folículos primordiais parece ser mais

resistente aos efeitos de isquemia que as fases crescentes, presumivelmente em virtude de serem dormentes e ter uma baixa taxa metabólica (NUGENT *et al.*, 1997). Nugent *et al.* (1998) acreditam que o uso de vitamina E como antioxidante pode reverter esse tipo de isquemia, embora, em seus estudos, não tenha resultado em diferença quando usada após sete dias da cirurgia.

A limitada provisão de oxigênio no tecido devido à hipóxia nos primeiros dias após o transplante pode ter induzido a angiogênese pela regulação do fator de crescimento endotelial vascular (LASCHKE *et al.*, 2003). Nugent *et al.* (1997) relatam que se deve tomar cuidado com as manipulações do tecido para reduzir os danos de isquemia.

Apesar do grande estímulo, em que a angiogênese leva a uma revascularização precoce do órgão, enfrenta-se ainda outras dificuldades, como a reação inflamatória que pode ocorrer, mesmo nos transplantes autólogos, provocando perda importante de tecido e funcionalidade do órgão (BRITO *et al.*, 2005).

Está bem estabelecido que a secreção de FSH pela pituitária é controlada por ação sinérgica da inibina e do estradiol. A causa primária do aumento do FSH observado nos transplantes é o declínio da secreção de inibina A ovariana, que é produzida pela célula granulosa do folículo antral, e o número de células da granulosa com esse conteúdo são aumentados com o tempo. Processo similar ocorre com o estradiol, avaliado de três a quatro meses depois do transplante, coincidindo com o aparecimento de folículos pré ovulatórios maiores que 4 mm (CAMPBELL *et al.*, 2000).

Em grupos transplantados, o FSH reflete a recuperação de secreção de hormônio. Porém, de forma interessante, apesar do declínio na sua secreção, a concentração global permaneceu significativamente mais alta ao longo do período de estudo quando comparado com concentrações basais. Da mesma forma ocorreu com o E2 após a recuperação da função ovariana. Assim, a provável explicação para a secreção de FSH aumentada é a secreção de inibina reduzida de ovários secundários transplantados pelo “pool” de folículos terciários pequenos, dos quais os folículos ovulatórios são selecionados (CALLEJO *et al.*, 2002).

A síntese de estrógenos pelo implante de tecido ovariano é refletida melhor pelo FSH, que são mais sensíveis para descobrir atividade ovariana do que E2 (CALLEJO *et al.*, 1999). A ótima maturação dos folículos de enxertos de tecidos ovarianos, segundo Callejo *et al.* (2003), deve seguir protocolos que enfrentam restrição de FSH endógeno para iniciar estímulo controlado desses folículos que, embora escassos, foram recrutados.

Com a identificação dos fatores de angiogênese regulados por meio de gonadotrofinas, a atividade de angiogênese é maior em animais tratados com sua suplementação (DISSEN *et al.*, 1994). Na década de 80, Farookhi *et al.* (1982), após aplicarem hCG em ratas, removeram os ovários, puncionaram os folículos pré ovulatórios, as células da granulosa e as implantaram na cápsula renal. O exame histológico revelou células da granulosa luteinizadas entre o parênquima e a cápsula renal. No experimento de Schnorr *et al.* (2002), a excitação ovariana com gonadotrofinas resultou em crescimento folicular e produção de ovócitos maduros de tecido ovariano fresco e criopreservado.

Folículos primordiais e primários em transplante ovariano retêm a habilidade para ficar responsivo à gonadotrofina e desenvolver folículos avançados com excitação seguinte (WEISSMAN *et al.*, 1999). A granulosa ovariana secreta vários componentes da matriz extracelular e esta secreção realmente é influenciada pelos níveis de gonadotrofina. A diminuição de FSH e o aumento do GnRH aumentam a secreção granulosa de fibronectina. Concentrações de FSH que não decrescem corretamente teriam um efeito negativo neste mecanismo (CALLEJO *et al.*, 2003). Gosden (1992) sugere o tratamento com gonadotrofinas exógenas para induzir a ovulação. Esse tratamento foi realizado por Bosch *et al.* (2004) e induziu a luteinização de folículos antrais, porém sem ovulação e os folículos continham um ovócito imaturo na fase de vesícula germinal.

A iniciação do crescimento folicular pode ser regulada principalmente pelo inibidor que emana da região medular mais central do ovário. A simples separação da região cortical do resto do ovário não é suficiente para a ativação. A transição de folículo primordial a primário pode ser iniciada separadamente nos dois

compartimentos do folículo e sugerem que mais de um sinal está envolvido na ativação folicular (FORTUNE *et al.*, 2000).

Dissen *et al.* (1994) avaliaram o transplante autólogo ovariano em ratos juvenis e demonstraram que aqueles ovários imaturos se tornam revascularizados e recuperaram a habilidade para controlar secreção de gonadotrofina por “feedback” negativo de esteróide dentro de uma semana sem anastomose vascular. A revascularização acontece após 2 dias do enxerto, mas um grau significativo de dano celular pode acontecer durante esse período.

Newton *et al.* (1996), Nugent *et al.* (1997), Baird *et al.* (1999) e Torrents *et al.* (2003) relatam a criopreservação como uma alternativa para os implantes. Wood *et al.* (1997) verificaram total degeneração como resultado de armazenamento de ovócitos de gatas domésticas por mais de 48 horas, em criopreservantes.

Bedaiwy e Falcone (2004) esclarecem que é desafiador a criopreservação em espécies maiores, uma vez que se tem obtido sucesso em ratos e em espécies cujos tecidos são bem menores. Em seu experimento, Guanasena *et al.* (1997) verificaram ciclo estral após 15 dias de autotransplante fresco ou criopreservado, sem diferença entre os grupos. As ratas ficaram prenhes após no máximo duas cópulas e tiveram filhotes.

Transplante de ovários frescos de ratos resultou na restauração do ciclo ovariano em três semanas após o transplante e o desenvolvimento folicular e corpos lúteos foram observados com quatro semanas após transplantes heterotópicos e seis semanas após transplantes ortotópicos. No grupo ortotópico, 33% dos receptores ficaram prenhes (COEX *et al.*, 1996 apud TORRENTS *et al.*, 2003).

No estudo de Liu *et al.* (2002) apud Torrents *et al.* (2003), os transplantes frescos ovarianos de roedores tinham 58% de folículos e transplantes criopreservados 49% de folículos. Foi avaliado apoptose nas células foliculares e marcada fragmentação de DNA logo após o transplante, e mostrou que somente 9% dos folículos foram perdidos quando o tecido foi criopreservado. A maioria da perda folicular ocorreu, na maior parte dos casos, mais depois do transplante que após o processo de congelamento.

O impacto do período de isquemia que segue o enxerto em qualquer folículo está correlacionado com suas demandas metabólicas e locais dentro do ovário. Quando o ovário é cortado em pedaços pequenos, são minimizadas as isquemias e mudanças degenerativas porque o processo de revascularização depende do tamanho do tecido envolvido (CALLEJO *et al.*, 2001).

Baseado em todos esses problemas relacionados à isquemia e conseqüentemente necrose do tecido enxertado, vêm sendo pesquisado as anastomoses microvasculares e suas implicações (BRITO *et al.*, 2005). Alguns animais que sofreram transplante íntegro e fatiado sem anastomose vascular não mostraram isquemia nem inflamação causadas pela cirurgia. Outros apresentaram características morfológicas de degeneração, principalmente isquêmicas, em graus diferentes (leve, moderado, e severo) (VON EYE CORLETA *et al.*, 1998).

Bedaiwy e Falcone (2004) estudaram que transplantes de ovários intactos com micro anastomose vascular poderão maximizar a possibilidade de vascularização imediata e potencialmente minimizar a isquemia folicular pós-transplante. Bedaiwy *et al.* (2003) relatam que em procedimentos de transplantação que não utilizam anastomose vascular, os enxertos são completamente dependentes de vascularização pós-transplante. Assim, as células do enxerto têm que ser hábeis para obter nutrientes do ambiente antes da revascularização e são dependentes do local do transplante, da taxa de difusão destes nutrientes para o transplante, e do tempo necessário para a revascularização ser completada.

Para tentar estabelecer um modelo para estudar os diferentes aspectos da vascularização de ovários transplantados, Bedaiwy e Falcone (2004) propuseram a anastomose dos vasos ovarianos para os vasos epigástricos profundos em ovelhas. Porém, não houve diferenças entre os valores de apoptose e viabilidade folicular entre grupos com ou sem anastomose vascular. Uma semana após o transplante as concentrações de FSH e estradiol eram similares aos valores antes do transplante.

Harrison (1982) realizou a autotransplantação heterotópica do ovário esquerdo com anastomose vascular no pescoço de porcas, no qual o ovário direito foi removido, verificada atividade cíclica ovariana, com temperamento sexual normal. Não foi executada anastomose vascular e nenhuma adversidade morfofisiológica foi

observada por Petroianu *et al.* (2005) e os grupos não tiveram sinais de isquemia ovariana. A neovascularização que desenvolveu ao redor dos ovários implantados foi suficiente para preservar a vitalidade. Os transplantes com ovário fatiado e drenagem pela veia porta foram mais efetivos e promoveram ciclos estrais normais.

Os resultados do experimento de Petroianu *et al.* (2004) confirmam que a função ovariana pode ser preservada após castração seguida de implante ovariano ortotópico, sem a realização de anastomose vascular em coelhos. Esse fato também foi constatado previamente em ratos por Alberti *et al.* (2002a).

A área de drenagem da veia porta foi proposta como o melhor local para o autotransplante, com objetivo de prevenir obesidade em cadelas ovariectomizadas. Porém, verificaram continuação da ciclicidade e sinais de pro-estro, com intervalos entre os períodos de seis meses. Sinais de severa anemia, melena, vômito e diarreia, associado com o desenvolvimento de neoplasias foram observados em dois casos de ovários transplantados em cadelas. O exame histológico verificou carcinoma tubular ovariano como causa de uma grande úlcera gástrica formada pela hiperplasia dos implantes (DAVIES, 1989).

A técnica de auto-enxerto ovariano descrita por Le Roux, Van Der Valt (1978) consiste na ovariectomia de rotina, sendo que, do ovário removido são seccionadas fatias de 1 a 2 mm de espessura, implantando-as em uma alça subserosa do estômago. Os animais submetidos a auto-enxerto ovariano não apresentaram estro e puderam ser treinadas e usadas normalmente como cães de trabalho, enquanto que as ovariohisterectomizadas comportaram-se inferiormente. Foi observado aumento no implante de até dez vezes o tamanho original do fragmento ovariano.

Fatias de córtex ovariano (aproximadamente 2mm x 2mm x 1mm) criopreservados de gatas foram transplantados debaixo de cada cápsula renal de ratos machos castrados. Em cada seção, foram contados folículos e classificados como primordial, primário, secundário ou antral (BOSCH *et al.*, 2004). No estudo de Kiram *et al.* (2004), os ovários foram preparados em dez cortes de 2 a 3mm e antes do implante foram mantidos em solução salina.

Gosden *et al.* (1994) implantaram ovários com fatias de aproximadamente 1mm x 1mm x 0,5mm de gatas e ovelhas na cápsula renal de ratas

imunodeficientes. Após três a quatro semanas, as que receberam ovário de gatas mostraram células cornificadas no exame vaginal, e as que receberam ovários de ovelhas demoraram de oito a vinte semanas. Os autores mostram que o tempo esperado para o desenvolvimento folicular é espécie específica e é menor em ratos, depois em gatos e por fim em ovelhas.

A provisão de sangue profusa na região sub capsular do rim e na bursa ovariana foi a razão principal para Weissman *et al.* (1999), escolherem estes locais para transplante. Porém, a escolha do local pode não ser crítica, desde que o tecido no subcutâneo possa alcançar uma provisão vascular.

O estudo de Alberti *et al.* (2002b) propôs o auto-implante ovariano no retroperitônio, por considerar a drenagem venosa para a veia cava inferior, que recebe fisiologicamente o sangue e os hormônios dos ovários por meio das veias ovarianas. A capacidade de secreção hormonal foi avaliada pela manutenção do ciclo estral, com base em esfregaços vaginais, e a viabilidade e as alterações morfológicas foram estudadas por método histológico.

Em situação normal, os hormônios ovarianos são drenados pelas veias ovarianas para a veia cava inferior. Esta mesma veia recebe a drenagem venosa da região retroperitoneal em que os ovários foram implantados. Dessa forma, evita-se, segundo Alberti *et al.* (2002b), a passagem dos hormônios pelo fígado, onde poderiam ser metabolizados precocemente e interferir em sua ação sistêmica.

O implante autólogo avascular ovariano no omento maior de ratas é tecnicamente simples e mantém os ovários viáveis. Entretanto, sob aspecto funcional, apenas os ovários fatiados tiveram atividade hormonal satisfatória (ALBERTI *et al.*, 2002a). O enxerto de ovário íntegro realizado em omento maior de ratas, independente do uso ou não da Ciclosporina A, não se mostrou viável de acordo com o método utilizado (BRITO *et al.*, 2005). A histoarquitetura dos ovários transplantados sobre o omento, de acordo com Petroianu *et al.* (2005), era mais íntima que os implantados no retroperitônio. Todos os animais apresentaram aspectos vaginais compatíveis com função hormonal ovariana em níveis diferentes, associando os aspectos histológicos de transplantação de ovário autólogo com citologia vaginal.

Já no final da década de 40, Harris e Eakin (1949) enxertaram porções de ovários de rato frescos em um túnel subcutâneo no flanco e avaliaram a atividade funcional deles por meio de secreções vaginais.

No grupo ovariectomizados e com implantes autólogos no subcutâneo, a implantação dos dois ovários foi imediata no plexo inguinal esquerdo de cada rato. Antes da fixação dos implantes, foram executadas duas seções em cada ovário e cada parte foi dividida em quatro partes para favorecer a revascularização (CALLEJO *et al.*, 1999). Com exceção dos ovários severamente degenerados, os ovários transplantados no subcutâneo mostraram folículos em fases diferentes de maturação e viabilidade, preservando a função endócrina (VON EYE CORLETA *et al.*, 1998).

Na pesquisa realizada por Matera *et al.* (1998), o autotransplante ovariano no espaço subperitoneal da parede abdominal mostrou vascularização adequada do fragmento, perfeita integração com o tecido subjacente, e liberou hormônio para a circulação geral, mantendo dessa maneira, hormônio para o organismo.

Schossler *et al.* (1999) e Kiran *et al.* (2004) sugerem o autoenxerto na tela subcutânea em seu experimento, pois tem-se a possibilidade de monitoração do implante, que pode ser observado por inspeção e palpação, permitindo, em caso de alteração, ser biopsado e, se necessário, remoção total, inclusive com infiltração anestésica local, demandando pequeno risco ao paciente.

Jeremias *et al.* (2002) buscaram desenvolver uma técnica para autotransplantação ovariana e anastomose vascular em um local que permite acesso fácil por procedimentos micro-cirúrgicos, como também recuperações de óvulos futuros em ovelha. A parede abdominal foi escolhida porque os recipientes epigástricos inferiores são satisfatórios para anastomose com tecidos ovarianos. Após completa anastomose microcirúrgica, as braçadeiras foram removidas e o fluxo de sangue durante pelo menos 20 minutos foi documentado em todos os transplantes, mostrando sucesso pós-operatório imediato. Concentrações de E2 no soro não diferiram antes e depois do transplante nos grupos.

Existem inúmeras vantagens em transplante subcutâneo mesmo em doadores diferentes, pela simplicidade do procedimento, conveniência e facilidade

de monitoração, e acesso direto para aspiração folicular (LEE *et al.*, 2001). Conforme afirmam Wang *et al.* (2002), o transplante ovariano subcutâneo pode prover um ambiente satisfatório para o crescimento do folículo e maturação de ovócitos, assim poderia resolver muitos problemas e preocupações que são relacionados ao banco ovariano para humanos.

Lee *et al.* (2004) tiveram sucesso fertilizando um macaco com um ovócito obtido de tecido ovariano transplantado no subcutâneo do abdômen, resultando no nascimento de um filhote do sexo feminino saudável no final de 2003. Cortou-se o córtex ovariano em pedaços pequenos (1, 3, 4mm) a 4°C e transplantou-se imediatamente no animal de origem em bolsos subcutâneos no braço, abdômen ou rim.

O exame histológico do tecido transplantado no subcutâneo da região inguinal de ratos permitiu verificar a presença de folículos primordiais, primários e secundários, não constatando diferença em relação às do grupo controle (Ceschin *et al.*, 2004).

Israely *et al.* (2006) provocaram injúria no tecido muscular e implantaram o tecido ovariano nesse ferimento. A perfusão dos implantes foi melhor e a sobrevivência dos folículos primordiais foi maior e evidente. Assim, segundo os autores, o tecido da ferida contribuiu para a restauração mais cedo dos enxertos, além de ser fácil a monitoração e recuperação de ovócitos.

Recentemente, Donnez *et al.* (2004) e Oktay (2006) provaram que o transplante ovariano ortotópico e heterotópico no subcutâneo de mulheres liberou estrógeno e progesterona, foi capaz de ovular e com a fertilização *in vitro* foi gerada uma criança saudável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Local

Foram utilizadas treze gatas (*Felis catus*), sem raça definida, clinicamente sadias e com idade variando de 8 meses a 3 anos. Onze gatas foram cedidas pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, as demais por proprietários na cidade de Uberlândia – MG. Durante o experimento, os animais ficaram em gatil composto de oito alojamentos cobertos e área externa com luz solar, nas dependências do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todas as gatas eram alimentadas diariamente com a mesma ração comercial e água, ambas à vontade. O gatil era limpo diariamente e desinfetado com hipoclorito de sódio.

Este trabalho foi realizado de acordo com as Normas Internacionais de Proteção dos Animais, descritas por Cooper (1985), e como recomenda Goldenberg (2000), em seu editorial sobre a ética da pesquisa com animais. As cirurgias foram realizadas no centro cirúrgico experimental do hospital veterinário e os materiais processados no laboratório de Histologia da UFU.

3.2 Critério de Inclusão dos animais no experimento

Os animais passaram por um período de adaptação de 8 a 12 semanas, foram submetidos ao exame físico detalhado e hemograma, para assegurar que estavam sadios. Todas as gatas foram vermifugadas, vacinadas contra raiva e tratadas contra ectoparasitos.

3.3 Protocolo Experimental

3.3.1 Grupos

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: G1 (Animais 1 a 7, com amostras de ovário esquerdo para controle e implante e ovário direito remanescente). G2 (Animais 8 a 13, com amostras de ovário direito para controle e implante e ovário esquerdo remanescente).

3.3.2 Medicações pré e pós-operatórias

Todos os animais receberam por via subcutânea, o antiinflamatório flunixin meglumine¹ na dosagem de 0,25 mg/kg, 24 horas antes, durante as cirurgias e 24 horas após.

Após jejum alimentar de 8 horas, os animais foram pesados e pré-anestesiados com acepromazina sódica² a 0,2%, na dosagem de 0,2 mg/kg por via intramuscular e logo após realizou-se a tricotomia da região abdominal ventral. A indução anestésica foi feita com anestesia dissociativa (tiletamina-zolazepam³) por via intramuscular, na dose de 0,1 ml/kg, e a manutenção por via intravenosa, com 0,05 ml/kg. Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal e então realizada a anti-sepsia com álcool-iodo-álcool.

Foi aplicado cefazolina sódica⁴ na dosagem de 30 mg/kg, por via intravenosa no trans operatório. Igualmente durante a cirurgia, os animais receberam fluidoterapia com solução fisiológica a 0,9% ou solução de ringer simples, mediante cateter localizado na veia cefálica. Também foi aplicado cloridrato de tramadol⁵, na dosagem de 1 a 2 mg/Kg por via intramuscular, durante as cirurgias.

¹ Banamine injetável pet 10 mg – Shering Plough

² Acepran 0,2% - Univet

³ Zoletil 50 - Virbac

⁴ Cezolin® 1g - BioChimico®

⁵ Tramal inj. 50 - Pfiser

Todos os animais receberam analgésico à base de dipirona sódica⁶ oral (21 mg por kg de peso), duas vezes ao dia, durante 3 dias de pós-operatório.

Em todos os animais foram feitos curativos tópicos diários das feridas cirúrgicas com solução fisiológica 0,9% e anti-séptico à base de clorexidina⁷ até o 7º dia de pós-operatório, quando foram removidos os pontos de pele. Os animais receberam enrofloxacina⁸ oral (5mg/kg), uma vez ao dia, durante sete dias.

3.3.3 Abordagem Cirúrgica

A abordagem cirúrgica de todos os animais foi realizada mediante laparotomia retrumbilical mediana com localização e exposição de um dos cornos uterinos e o ovário, conforme técnica de Wilson, Hayes Jr (1986). No ligamento suspensório do ovário, foi feito pinçamento com ligadura transfixante abaixo desta, utilizando-se categute cromado 3-0 (Fig 1). O mesmo fio foi utilizado na laparorrafia, constando de sutura contínua ancorada na linha alba e aproximação do tecido subcutâneo. Para dermorrafia foi utilizada sutura tipo wolf com fio monofilamentoso de nylon 3-0.

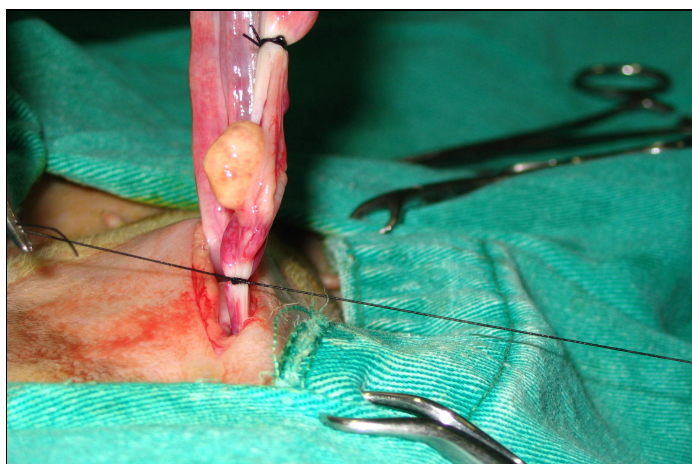


Figura 1. Ovariectomia realizada no momento zero em gata doméstica.

⁶ Novalgina® sol. Oral - Aventis

⁷ Furanil pomada - Vetnil

⁸ Enropet oral - Vetbrands