

**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**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**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

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

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ovariectomia realizada no momento zero em gata doméstica. ----	23
<b>Figura 2.</b> (A e B) Secção transversal do ovário de gata doméstica em três segmentos, antes da realização do implante subcutâneo. -----	24
<b>Figura 3.</b> (a e b) Túnel obtido no subcutâneo de gata doméstica com pinça anatômica simples, para colocar os implantes. -----	25
<b>Figura 4.</b> Ponto em U, após o transplante subcutâneo dos fragmentos ovarianos em gata doméstica. -----	25
<b>Figura 5.</b> Exteriorização do ovário remanescente após 120 dias (A), e sutura da parede abdominal (B) em gata doméstica. -----	26
<b>Figura 6.</b> Localização (A) e retirada (B) do implante ovariano no subcutâneo, após 120 dias em gata doméstica. -----	26
<b>Figura 7.</b> Visualização do implante subcutâneo após a cirurgia de ovariectomia e implante ovariano heterotópico em gata doméstica (A e B).--	30
<b>Figura 8.</b> 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
<b>Figura 9.</b> 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
<b>Figura 10.</b> 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
<b>Figura 11.</b> 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
<b>Figura 12.</b> 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

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> 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
<b>Tabela 2.</b> Média do diâmetro dos folículos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle, no ovário remanescente e no ovário implantado. -----	36
<b>Tabela 3.</b> 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
<b>Tabela 4.</b> 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/mm<sup>2</sup>) em relação ao ovário controle (12,11/mm<sup>2</sup>) e ao ovário remanescente (16,27/mm<sup>2</sup>). O ovário remanescente mostrou aspecto macroscópico normal e folículos em todos os estágios de desenvolvimento, com número médio de terciários (1,12/mm<sup>2</sup>) superiores ao do ovário controle (0,96/mm<sup>2</sup>). 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/mm<sup>2</sup>) than in the control ovary (12.11/mm<sup>2</sup>), and larger than in the remaining ovary (16.27/mm<sup>2</sup>). The remaining ovary showed regular appearance with follicles in all stages of development, with the average of the tertiary follicles (1.12/mm<sup>2</sup>) larger than the control (0.96/mm<sup>2</sup>). 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  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 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 mm<sup>3</sup> 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 meglumine<sup>1</sup> 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 sódica<sup>2</sup> 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-zolazepam<sup>3</sup>) 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 sódica<sup>4</sup> 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 tramadol<sup>5</sup>, na dosagem de 1 a 2 mg/Kg por via intramuscular, durante as cirurgias.

---

<sup>1</sup> Banamine injetável pet 10 mg – Shering Plough

<sup>2</sup> Acepran 0,2% - Univet

<sup>3</sup> Zoletil 50 - Virbac

<sup>4</sup> Cezolin® 1g - BioChimico®

<sup>5</sup> Tramal inj. 50 - Pfiser

Todos os animais receberam analgésico à base de dipirona sódica<sup>6</sup> 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 clorexidina<sup>7</sup> até o 7º dia de pós-operatório, quando foram removidos os pontos de pele. Os animais receberam enrofloxacina<sup>8</sup> 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.

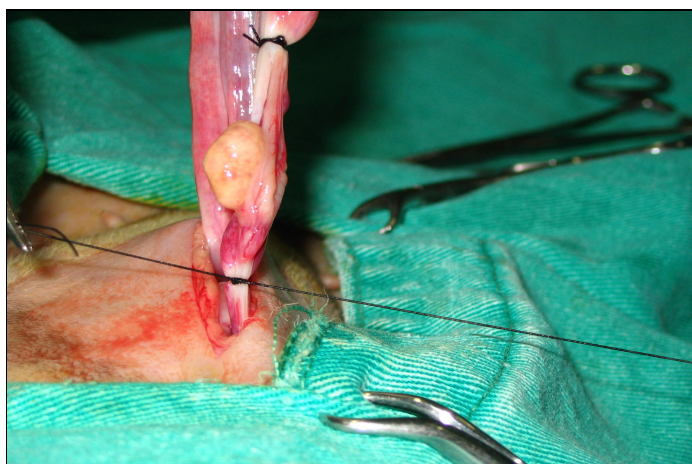


Figura 1. Ovariectomia realizada no momento zero em gata doméstica.

<sup>6</sup> Novalgina® sol. Oral - Aventis

<sup>7</sup> Furanil pomada - Vetnil

<sup>8</sup> Enropet oral - Vetbrands

### 3.3.3.1 Momento Zero

Os animais no momento da cirurgia de ovariectomia unilateral para realização do implante autólogo e heterotópico, tiveram o ovário seccionado transversalmente em 3 segmentos proporcionais, preservando as camadas cortical e medular (Fig 2). Os dois terços cranial e caudal foram transplantados no subcutâneo (com distância média de 1,0 cm entre eles), próximo da glândula mamária abdominal caudal (do respectivo lado em que foi retirado), mediante um túnel obtido por pinça anatômica simples, aproveitando-se a incisão mediana ventral, antes da laparorráfia e dermorrafia (Fig 3). O leito receptor foi fechado com a aplicação de um ponto separado em forma de “U” com fio de nylon monofilamento 3-0 (Fig 4).

O terço médio do ovário seccionado foi fixado em formol a 10% e processado segundo técnica histológica rotineira com inclusão em parafina, sendo este o tecido controle, com a finalidade de obter informação do padrão ovariano.

O ovário remanescente ficou no seu local de origem e não foi manipulado a fim de que após 120 dias fosse retirado e medido o consumo folicular, em relação ao controle e ao implante.

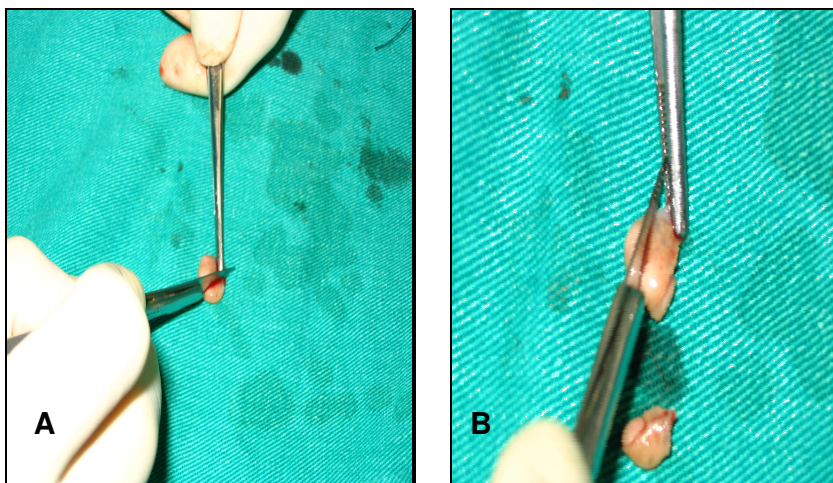


Figura 2. (A e B) Secção transversal do ovário de gata doméstica em três segmentos, antes da realização do implante subcutâneo.

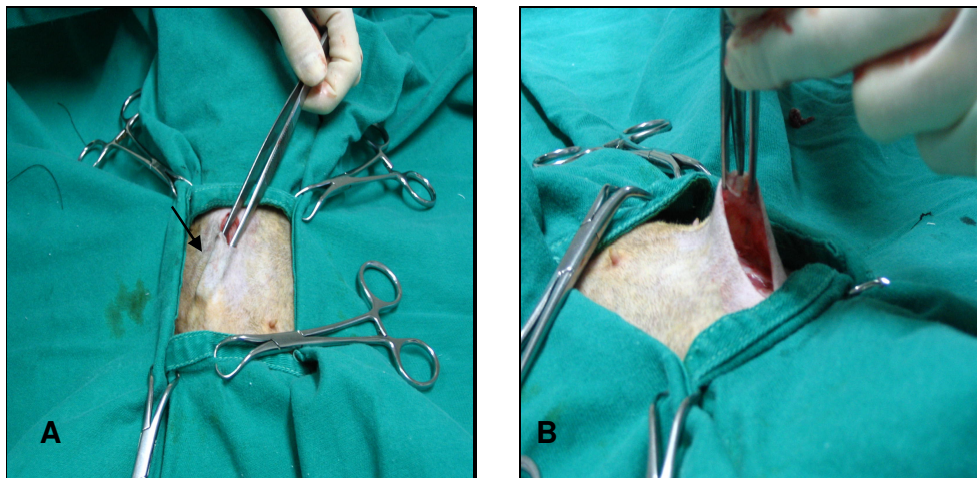


Figura 3. (A e B) Túnel obtido no subcutâneo de gata doméstica com pinça anatômica simples para colocar os implantes.



Figura 4. Ponto em U após o transplante subcutâneo dos fragmentos ovarianos em gata doméstica.

### 3.3.3.2 Momento 1

Decorridos os 120 dias, todos os animais foram submetidos à nova anestesia pelo método já descrito e feita a ovariectomia, com a finalidade de se retirar o ovário remanescente e os implantes ovarianos. O ovário remanescente foi seccionado em 3 segmentos proporcionais, sendo desprezados os 2 terços cranial e

caudal. A porção média e o ovário implantado foram fixados em formol a 10%, para estudo histológico.

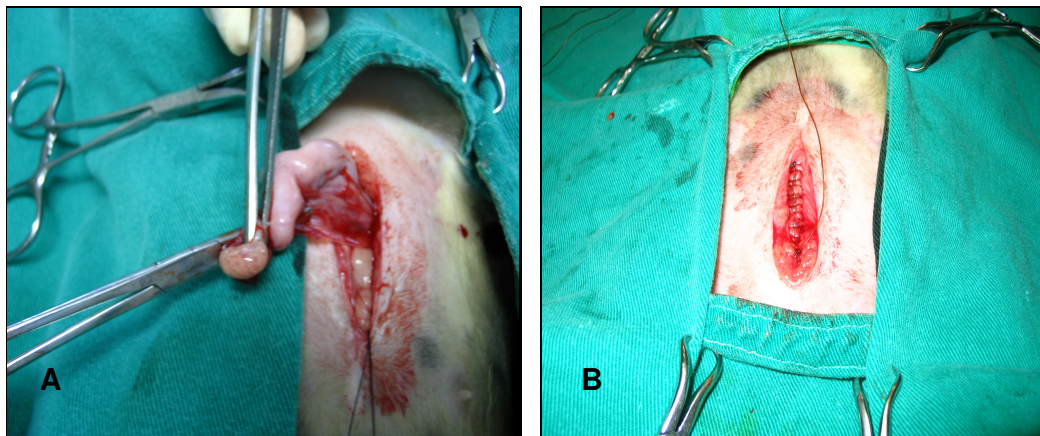


Figura 5. Exteriorização do ovário remanescente após 120 dias (A), e sutura da parede abdominal (B) em gata doméstica.

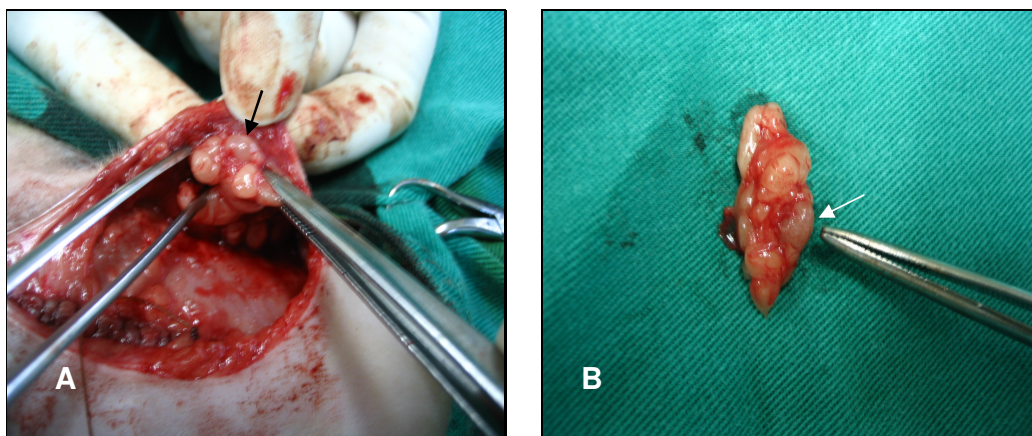


Figura 6. Localização (A) e retirada (B) do implante ovariano no subcutâneo, após 120 dias em gata doméstica.

### 3.3.4 Preparo do Material

Os segmentos ovarianos encaminhados para estudo histológico nos 2 momentos, foram preparados segundo técnica histológica convencional de

Michalany (1980), no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU, que consiste em:

**Desidratação:** Após cada material ter sido colocado em um recipiente plástico com identificação, foi deixado por 30 minutos em álcool 70%, 85%, 95%, absoluto I, II e III, respectivamente.

**Diafanização:** Para o álcool ser substituído pela parafina, o material foi colocado em 3 passagens de 30 minutos em xilol.

**Inclusão:** O material foi colocado em parafina fundida, passando por 3 banhos de 30 minutos cada, em estufa a 57° C. Em seguida o material foi colocado em formas de metal, incluído em parafina e deixado à temperatura ambiente para secagem.

**Corte:** Após secagem, os blocos foram cortados em micrótomo e aproveitados 3 cortes de 5µm de espessura de cada ovário, desprezando-se 30 cortes entre cada um dos coletados, de forma que três partes distintas de cada amostra fossem observadas.

**Coloração:** Cada corte histológico depois de ter sido colocado em banho-maria, foi montado em lâmina de vidro, submetido à secagem a 42°C por cerca de 2 horas em estufa. O material foi desparafinado em xilol III por 15 minutos, xilol II e I por 5 minutos. Depois, foi reidratado em soluções decrescentes de etanol (álcool absoluto III por 1 minuto, absoluto II e I, 95%, 85% e 70% por 5 minutos cada). As lâminas foram deixadas em água corrente por 20 minutos e destilada por 5 minutos. Em seguida, coradas com Hematoxilina de Harris por 15 minutos e lavadas em água corrente por 20 minutos e destilada por 5 minutos. Depois foram submetidas a Eosina por 10 segundos e água destilada por 1 segundo. Posteriormente, o material passou pelo álcool 70% até o xilol III em ordem inversa.

**Montagem das lâminas:** Sobre os fragmentos foi colocada de uma a duas gotas de entelan e então a lamínula, para serem secadas em estufa por 8 horas.

### 3.3.5 Análise do Material

As lâminas foram observadas em microscopia de luz, no ICBIM da UFU, captando-se em média três imagens de cada corte pelo programa de computador HL image<sup>®</sup>.

As imagens foram capturadas sob aumento de 40x para folículos terciários e secundários e 100x para folículos primordiais e primários. As áreas dessas imagens foram mensuradas em  $\mu\text{m}^2$  e convertidas em  $\text{mm}^2$ , com os folículos presentes quantificados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento, observando também a organização tecidual. Mensurou-se em cada imagem o diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de até dez folículos de cada fase de desenvolvimento.

Os folículos foram classificados, com base em Karja *et al.* (2002), considerando-se o aspecto morfológico dos mesmos, da seguinte forma: folículo primordial com ovócito localizado centralmente e uma única camada de células planas da granulosa ao redor; folículo primário com ovócito localizado centralmente e uma camada de células da granulosa de formato cuboidal; folículo secundário com ovócito centralizado e várias camadas de células da granulosa de formato cuboidal; folículo terciário com múltiplas camadas de células da granulosa, formação de antro e presença de células da teca interna e externa.

### 3.4 Análise Estatística

Após a aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição dos dados era normal, com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças entre as frequências de folículos ovarianos encontrados no ovário controle, no remanescente e no implantado, e quanto à lateralidade, foi aplicado o teste de Wilcoxon (SIEGEL, 1975). Para comparar o diâmetro folicular aplicou-se o teste t de Student (GRANER, 1966). Os testes foram feitos pelo software de análise de dados S-plus<sup>®</sup> Professional (2000). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto na medicina humana como na medicina veterinária estão sendo estudadas técnicas para preservar o potencial reprodutivo de fêmeas, segundo Yin *et al.* (2003). A identificação e prevenção de condições clínicas eventualmente associadas ao consumo folicular mais rápido que o habitual tem grande interesse clínico (MEDEIROS e YAMAMOTO, 1998). Por essa razão, foi proposto neste trabalho o implante ovariano avascular, fresco, autólogo e heterotópico no subcutâneo de gatas domésticas. A vantagem desta estratégia, para Yin *et al.* (2003), é que tanto a endocrinologia quanto a fertilidade natural dos indivíduos podem ser restaurados com os transplantes.

A técnica cirúrgica para a ovariectomia inicial e ovariohisterectomia posterior foi a recomendada por Christiansen (1988), Mialot (1988) e Wilson e Hayes Jr (1986), de uso consagrado na medicina veterinária, pois é de fácil execução e evita complicações durante o ato cirúrgico. A técnica utilizada para o enxerto ovariano seguiu a orientação de Le Roux e Van Der Valt (1978) e, mais recentemente, de Matera *et al.* (1998), Schossler *et al.* (1999) e Oktay *et al.* (2003). Após a cirurgia, o implante era claramente visível e palpável sob a pele da região abdominal das gatas (figura 7), porém, ao contrário dos autores acima, monitoramento pela palpação externa foi possível apenas no primeiro mês após o implante, em parte devido ao aumento de tecido adiposo acumulado na região abdominal. Segundo Weissman *et al.* (1999) e Kiram *et al.* (2004), o espaço subcutâneo é ideal para crescimento e desenvolvimento de folículos, mas também permite monitoramento simples, conveniente e de fácil acesso por aspiração com agulha. Em busca do primeiro relatório da função endócrina e recuperação de ovócitos autólogos enxertados com fragmentos ovarianos no antebraço, Oktay *et al.* (2001) mostraram que o subcutâneo é um local de implantação com acesso cirúrgico fácil e monitoramento com exames de ultra-som.

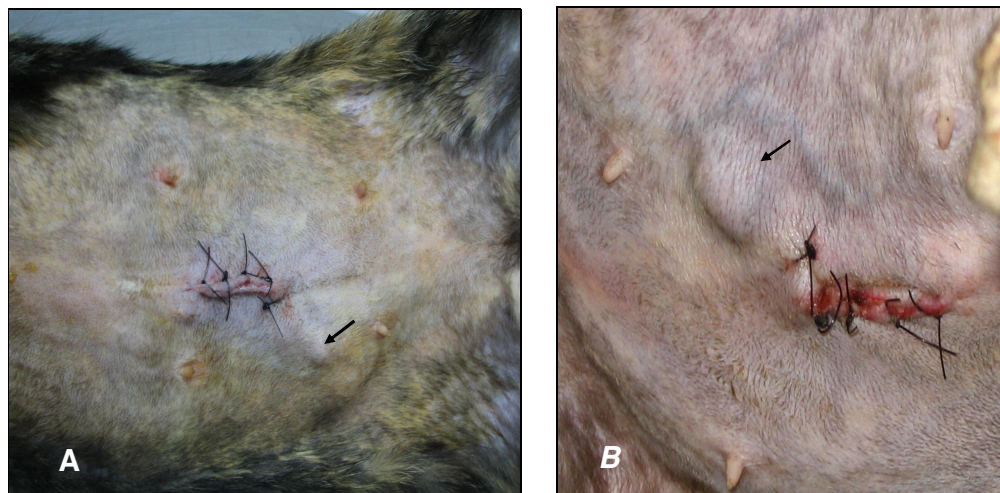


Figura 7. Visualização do implante subcutâneo após a cirurgia de ovariectomia e implante ovariano heterotópico em gata doméstica (A e B).

Nesse estudo os transplantes foram frescos e, segundo Yin *et al.* (2003), em seus estudos, o número de folículos foi maior no grupo dos transplantes frescos em relação aos criopreservados; embora tenha tido isquemia, a perda de folículos não foi significativa. Wood *et al.* (1997) resfriaram ovários de gatas domésticas que se degeneraram quando conservados por mais de 48 horas. Wang *et al.* (2002) reforçam essa idéia, pois relatam que criopreservação e enxerto reduzem o número de folículos viáveis no tecido ovariano.

Os implantes foram realizados sem anastomose vascular o que, segundo Yin *et al.* (2003), induz a isquemia, prejuízo ao tecido, depleção de células germinativas e o suporte de células somáticas. Porém, para Nugent *et al.* (1998), os folículos primordiais parecem ser relativamente resistentes à isquemia, embora perdas sempre ocorram. Existem estudos que reforçam a idéia de que a anastomose do pedículo vascular é desnecessária para a manutenção da vitalidade e função ovariana. Weissman *et al.* (1999) e Nisolle *et al.* (2000) acreditam nessa teoria e esclarecem que a intensa neovascularização que se forma em torno do ovário parece ser suficiente para conservar sua vitalidade. Em dois animais do experimento de Jeremias *et al.* (2002) as anastomoses vasculares foram ocluídas completamente, conduzindo a grande perda de tecido.

No presente estudo, foi criado um túnel entre a fáscia e o tecido subcutâneo, usando dissecação cega, assim como Oktay *et al.* (2003) em seu experimento. Esta área é relativamente vascularizada segundo os autores, e deve ser prestada atenção para evitar prejuízos às veias maiores e artérias porque o tecido ovariano adquirirá sua provisão de sangue local.

De acordo com Weissman *et al.* (1999), os elementos responsáveis pela estimulação da angiogênese ainda permanecem desconhecidos, mas o tecido ovariano é uma rica fonte de fatores angiogênicos, que estimulam a rápida migração de células endoteliais nos casos de transplantes, o que leva ao restabelecimento da circulação sangüínea. A revascularização do enxerto é crucial para a sobrevivência de folículos ovarianos transplantados, por isso implantou-se fragmentos ovarianos de cerca de 2 mm, contendo a área cortical e medular. O ovário cortado em fragmentos menores que 1–2 mm, segundo Nugent *et al.* (1997), minimiza a hipóxia no seu centro. Os fragmentos podem ser ancorados com quaisquer suturas no local heterotópico, como foi realizado nesse estudo. Os folículos primordiais presentes na periferia são os primeiros a se beneficiarem da revascularização. Na realidade, foi informado por Von Eye *et al.* (1998) que enxertos ovarianos com tecido fatiado resultaram em um grau mais baixo de isquemia ou mudanças degenerativas que ovários transplantados intactos.

Foi observada aderência após a ovariectomia parcial ao redor do útero, o que dificultou um pouco a exteriorização do mesmo para a realização da ovariohisterectomia, o que dificultaria posteriormente a transferência de óvulos fecundados. A infertilidade de algumas coelhas, de acordo com Petroianu *et al.* (2004), pôde ser atribuída à presença de aderências tubo-ovarianas e outros fenômenos inflamatórios presentes nas tubas uterinas.

Existe pouca informação na literatura médica veterinária com respeito à função hormonal de tecido ovariano transplantado em gatas ou até mesmo em outros animais domésticos. O presente trabalho não teve como objetivo realizar dosagem hormonal para verificar a função do ovário implantado, pois ficou o remanescente. No trabalho de Callejo *et al.* (2001), os níveis de estrógeno (E2) e hormônio folículo estimulante (FSH) permaneceram dentro dos limites de castração

depois da transplantação ovariana subcutânea ao longo de um ano e igualmente ocorreu no experimento de Matera *et al.* (1998) e Schossler *et al.* (1999).

O exame histológico dos tecidos ovarianos nesse experimento permitiu verificar a presença de folículos primordiais, primários, secundários e terciários (figuras 8 e 9). Essa classificação foi de acordo com Karja *et al.* (2002), e é semelhante à de Ceschin *et al.* (2004), Bristol e Woodruff (2004) e Weissman *et al.* (1999). Ainda, segundo Telfer e Gosden (1987), folículos com vários ovócitos são uma ocorrência natural em gatos, mas não foram observados nesse estudo.

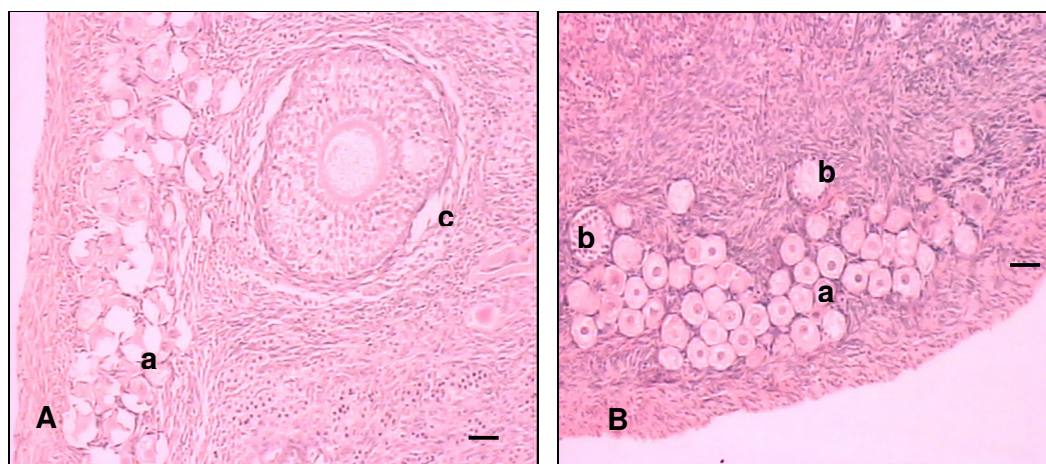


Figura 8. Cortes histológicos de ovário de gata doméstica, corados com hematoxilina e eosina. (A) Momento zero do ovário controle. (B) Momento 1 do ovário remanescente. Presença de folículos primordiais (a), primários (b) e secundário (c). Escala de baar = 50  $\mu$ m.

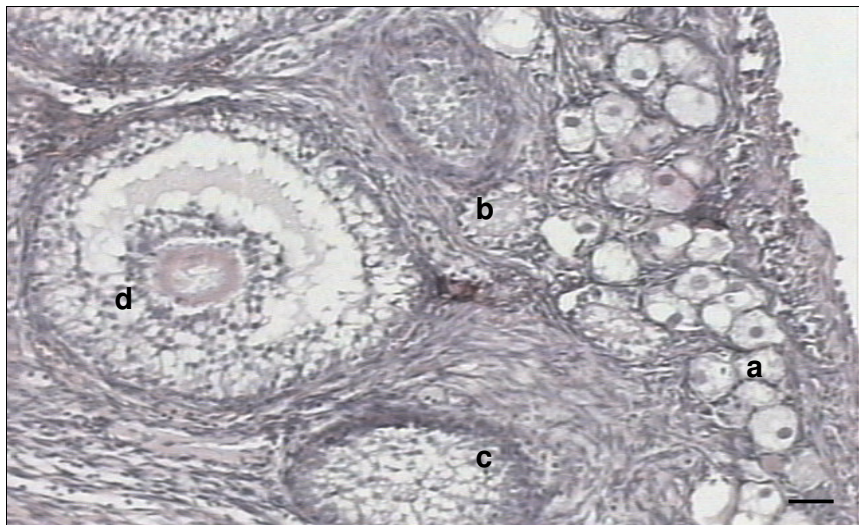


Figura 9. Corte histológico de ovário remanescente de gata doméstica, corado com hematoxilina e eosina. Presença de folículos em várias fases de desenvolvimento: primordiais (a), primários (b), secundário (c) e terciário (d). Escala de baar = 50  $\mu$ m.

Os implantes foram recuperados em 38,4% das gatas, e os demais não foram encontrados ou foram reabsorvidos. A procura dos mesmos foi intensa, em meio a grande quantidade de tecido adiposo e glândulas mamárias de aspectos macroscópicos semelhantes (figura 6 e 10). Notou-se nos implantes uma fibroplasia do tecido conjuntivo interfolicular, com aumento dos feixes de colágeno entre as estruturas do parênquima (figura 11). A hiperplasia de tecido observada nesse estudo é um pouco diferente da hiperplasia com densos agregados de fibroblastos, descritas por Banks (1992), que são normais nas espécies animais e podem ser paralelos à superfície ou se arranjar ordenadamente em volta dos folículos ou dos vasos a que estes se associam. As áreas de fibroplasia observadas nesse experimento também foram relatadas por Callejo *et al.* (2002), que no exame histológico de ovários removidos 6 meses depois do enxerto mostraram graus crescentes de fibroses, perda de folículos primordiais e a presença de cistos epiteliais. Com um ano de experimento, a maioria do parênquima ovariano foi substituído por fibrose, e embora o número de folículos antrais fosse significativamente baixo em grupos transplantados, a área de células granulosa era significativamente mais alta por causa de hiperplasia.

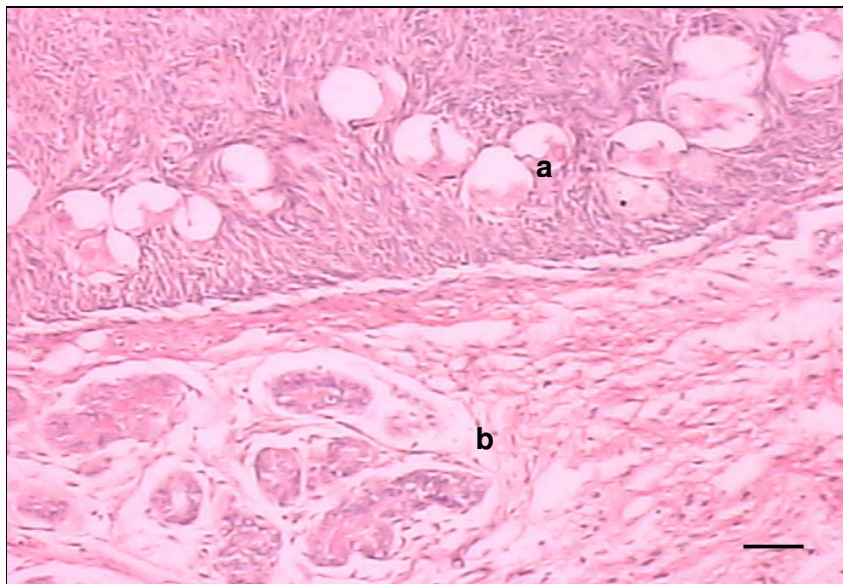


Figura 10. Corte histológico de ovário de gata doméstica implantado, corado com hematoxilina e eosina. Presença de folículos primordiais (a) e glândula mamária (b). Escala de baar = 50  $\mu$ m.

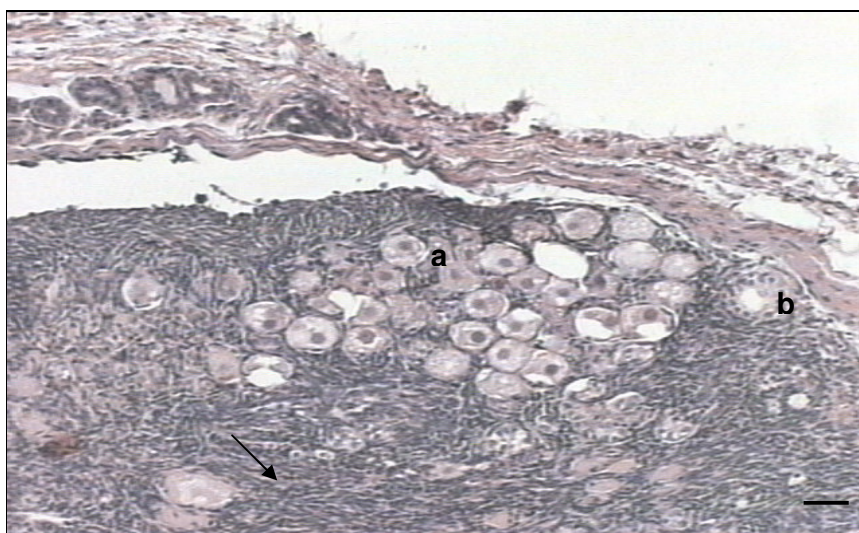


Figura 11. Corte histológico de ovário de gata doméstica implantado, corado com hematoxilina e eosina, com folículos primordiais (a) e primário (b). A seta indica fibroplasia do tecido conjuntivo interfollicular. Escala de baar = 50  $\mu$ m.

A proposta para verificar o consumo folicular foi pelo período de 120 dias, conforme descrito por Callejo *et al.* (2001), pois é necessário esperar de três a quatro meses até a recuperação espontânea da função ovariana, sendo o período de tempo requerido para os folículos primordiais que sobreviveram, se desenvolverem até folículos pré ovulatórios. Somente aos nove meses e meio Donnez *et al.* (2004) verificaram o crescimento de um folículo ovariano em mulheres com implantes. Segundo Baird *et al.* (1999), são requeridos de cinco a seis meses para a foliculogênese em ovelhas após o implante ovariano.

Nos ovários implantados foram encontrados 53,61 (59,75%) folículos primordiais por mm<sup>2</sup> e 36,10 (40,25%) folículos primários (figura 12). Diferentemente, nos experimentos de Matera *et al.* (1998) e Schossler *et al.* (1999), os fragmentos ovarianos implantados tiveram foliculogênese completa, porém o estudo foi durante doze meses, período três vezes maior que o deste. A maioria dos folículos sobreviventes (93-95%) nos transplantes do estudo de Bosch *et al.* (2004) permaneceu na fase primordial. Eles verificaram folículos em fases diferentes de desenvolvimento até antrais, usando o protocolo hormonal que incluía administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) em uma tentativa para induzir ativação de ovócitos, e apesar disto, não houve evidência de maturação. Não foi administrado gonadotrofina exógena nas gatas nesse estudo e, no trabalho de Schnorr *et al.* (2002) isso não melhorou o resultado dos transplantes nos animais testados. No estudo de Donnez *et al.* (2004) nenhum folículo primordial foi notado, a densidade folicular foi de 4 a 5 folículos por mL de aspirado e observou-se que a temperatura e mudanças de pressão no espaço subcutâneo podem danificar os ovócitos.

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 1, foram encontradas diferenças significativas entre as freqüências das variáveis: - Folículo primário controle x folículo primário implante, com valores mais elevados obtidos com o implante; - primário remanescente x primário implante, com valores mais elevados obtidos com o implante; - terciário controle x terciário remanescente, com valores mais elevados obtidos com o remanescente (figura 12).

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.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
Primordial controle x primordial implante	0,7750
Primordial remanescente x primordial implante	0,7750
Primordial controle x primordial remanescente	0,9197
Primário controle x primário remanescente	0,1027
Primário controle x primário implante	0,0011*
Primário remanescente x primário implante	0,0227*
Secundário controle x secundário remanescente	0,8182
Terciário controle x terciário remanescente	0,000*

(\*)  $p < 0,05$ , significam grupos diferentes.

Tabela 2. Média do diâmetro dos folículos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle, no ovário remanescente e no ovário implantado.

Média do diâmetro dos folículos	Ovários		
	Controle	Remanescente	Implantado
<b>Primordial</b>	41,51 <sup>a</sup>	37,50 <sup>b</sup>	41,31 <sup>ab</sup>
<b>Primário</b>	57,05 <sup>a</sup>	47,50 <sup>b</sup>	38,33 <sup>c</sup>
<b>Secundário</b>	261,01 <sup>a</sup>	203,80 <sup>a</sup>	
<b>Terciário</b>	704,40 <sup>a</sup>	579,33 <sup>a</sup>	

Letras diferentes numa mesma linha significam médias diferentes ( $p < 0,05$ ), de acordo com o teste t de Student.



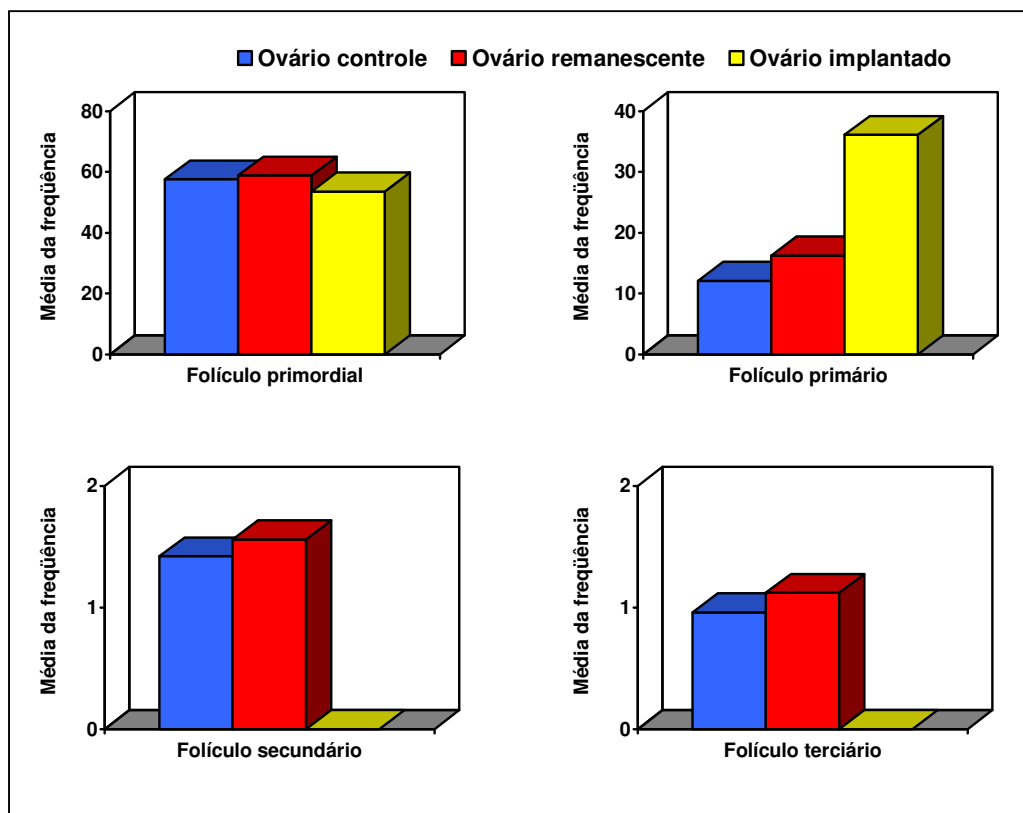


Figura 12. Média da frequência dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle, no ovário remanescente e no ovário implantado.

Uma análise de regressão feita por Miller *et al.* (1999) revelou forte correlação entre idade e número de folículos primordiais, os quais declinam durante a vida reprodutiva das espécies. Segundo Depalo *et al.* (2003), os folículos primordiais e primários são gonadotrofinas independentes e, de acordo com Eppig (2001), há vários fatores que influenciam na transição destes folículos, como o fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF $\beta$ ), fator de crescimento transformador (TGF $\beta$ ), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a insulina. A rápida revascularização do tecido ovariano é influenciada pela abundância de fatores angiogênicos e os fatores de crescimento, segundo Dissen *et al.* (1994), Nugent *et al.* (1997), e Torrents *et al.* (2003). Nugent *et al.* (1997), ainda complementam que os hormônios esteróides fazem com que haja secreção de gonadotrofina e conseqüentemente ativam todos esses fatores envolvidos na revascularização; assim, o implante se torna super estimulado e polifolicular, o que explica, além de todos os argumentos acima, o número de folículos primários ser maior nos

implantes. A análise imuno-histoquímica não foi usada no presente estudo como fizeram Wood *et al.* (1997) e Morita e Tilly (1999), que afirmam ser pouco conhecidos os mecanismos responsáveis por iniciar e executar a apoptose em ovócitos de folículos imaturos devido à dificuldade em obter o número suficiente de folículos para análise detalhada. Miller *et al.* (1999) acreditam que o fracasso dos dados em mostrar o ponto de perda de folículos seja em parte devido ao tamanho limitado da amostra, assim como nesse estudo com gatas domésticas.

Apesar de Bristol e Woodruff (2004) acreditarem que o gato é ideal para se estudar os folículos ovarianos devido à sua abundância, há certa dificuldade de avaliar o mesmo momento fisiológico em diferentes épocas. Na gata, segundo Dawson e Friedgood (1940), a ovulação é o resultado de um reflexo neuro endócrino iniciado por copulação ou um estímulo equivalente, quando os ovócitos em folículos pré-ovulatórios parados na prófase da primeira divisão meiótica são ativados pelo pico de LH que segue o acasalamento. Cunningham (2004) esclarece que o padrão de crescimento folicular ocorre em ondas de no mínimo 8-9 dias de intervalos e os folículos se desenvolvem e regridem em um período de 6 a 7 dias. Para confirmar que folículos de tecido ovarianos transplantados do gato estejam em desenvolvimento, Bosch *et al.* (2004) usaram uma técnica de imuno-histoquímica. Provavelmente, os animais nesse estudo estavam em diferentes estágios do ciclo estral quando foram realizadas as cirurgias nos dois momentos, por isso o número de folículos terciários foi maior em média no ovário remanescente, e também é uma questão geométrica, já que a média do diâmetro foi menor (tabela 2).

De acordo com a tabela 2, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as medidas dos diâmetros foliculares das seguintes variáveis: - primordial controle x primordial remanescente, com valores mais elevados obtidos com o controle; - primário controle, quando comparado com o primário remanescente e com o primário implante, com valores mais elevados obtidos com o controle; - primário remanescente x primário implante, com valores mais elevados obtidos com o remanescente. Conforme Hirshfield e Midgley Jr. (1978), o diâmetro pode ser até mais preciso para se classificar os folículos e no trabalho de Laschke *et al.* (2003), Bosch *et al.* (2004) e Gosden *et al.* (1994), a análise sequencial dos diâmetros foliculares revelou uma tendência com o passar do tempo para valores

maiores, com crescimento depois do transplante, diferente do que ocorreu nesse trabalho.

Neste estudo houve diferença entre os lados direito e esquerdo em relação à frequência de folículos terciários no remanescente, sendo que os valores mais elevados foram os do direito (tabela 3, figura 13). Miller *et al.* (1999), em seu trabalho com macacos, também não achou diferenças em relação ao número de folículos primordiais.

Tabela 3. Probabilidades associadas aos valores de t, obtidas quando da aplicação do teste de Wilcoxon às frequências 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.

<b>Variáveis Analisadas</b>	<b>Probabilidades</b>
Primordial controle direito x esquerdo	0,5807
Primário controle direito x esquerdo	0,9372
Secundário controle direito x esquerdo	0,4000
Terciário controle direito x esquerdo	0,8357
Primordial remanescente direito x esquerdo	1,0000
Primário remanescente direito x esquerdo	0,2343
Secundário remanescente direito x esquerdo	0,1000
Terciário remanescente direito x esquerdo	0,0221*

(\*)  $p < 0,05$ , significam grupos diferentes.

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

<b>Variáveis Analisadas</b>	<b>Probabilidades</b>
Primordial controle direito x esquerdo	0,2949
Primário controle direito x esquerdo	0,0022*
Secundário controle direito x esquerdo	1,0000
Terciário controle direito x esquerdo	0,6282
Primordial remanescente direito x esquerdo	0,5338
Primário remanescente direito x esquerdo	0,3660
Secundário remanescente direito x esquerdo	1,0000
Terciário remanescente direito x esquerdo	0,1807

(\*)  $p < 0,05$ , significam grupos diferentes.

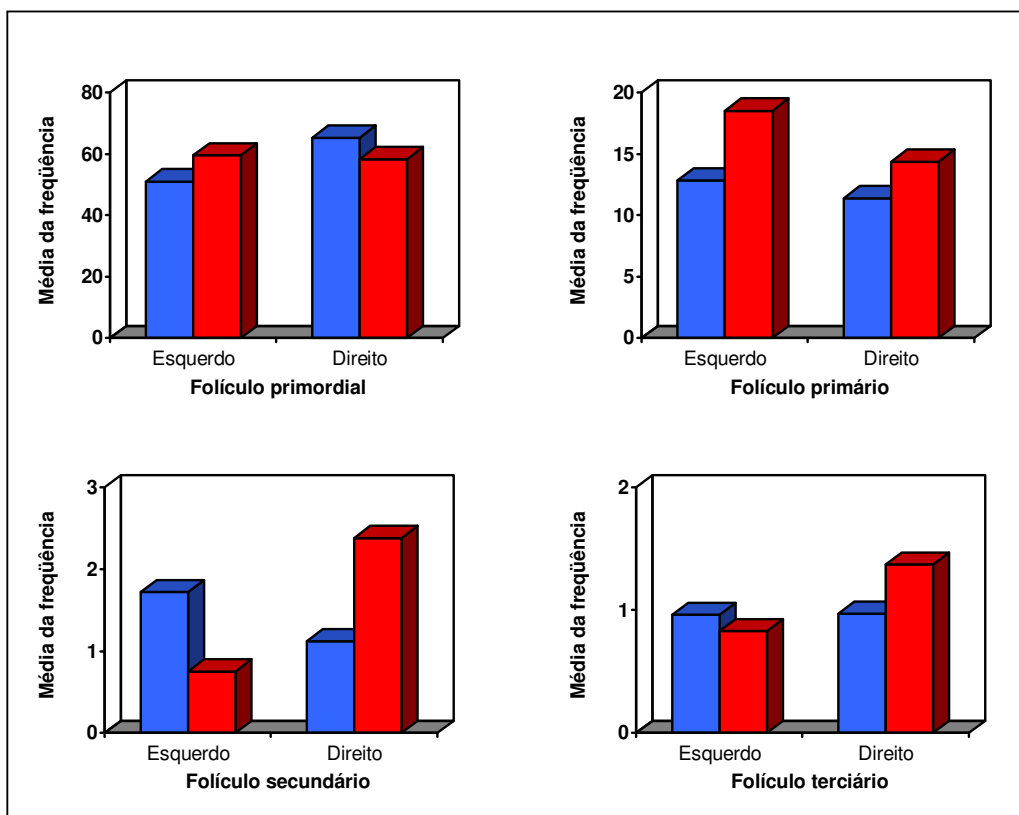


Figura 13. Média da frequência dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle e remanescente segundo a lateralidade.

Foi observado diferença significativa em relação ao diâmetro folicular primário no ovário controle, considerando-se a lateralidade (tabela 4), sendo que os valores mais elevados foram os obtidos com o lado esquerdo (figura 14).

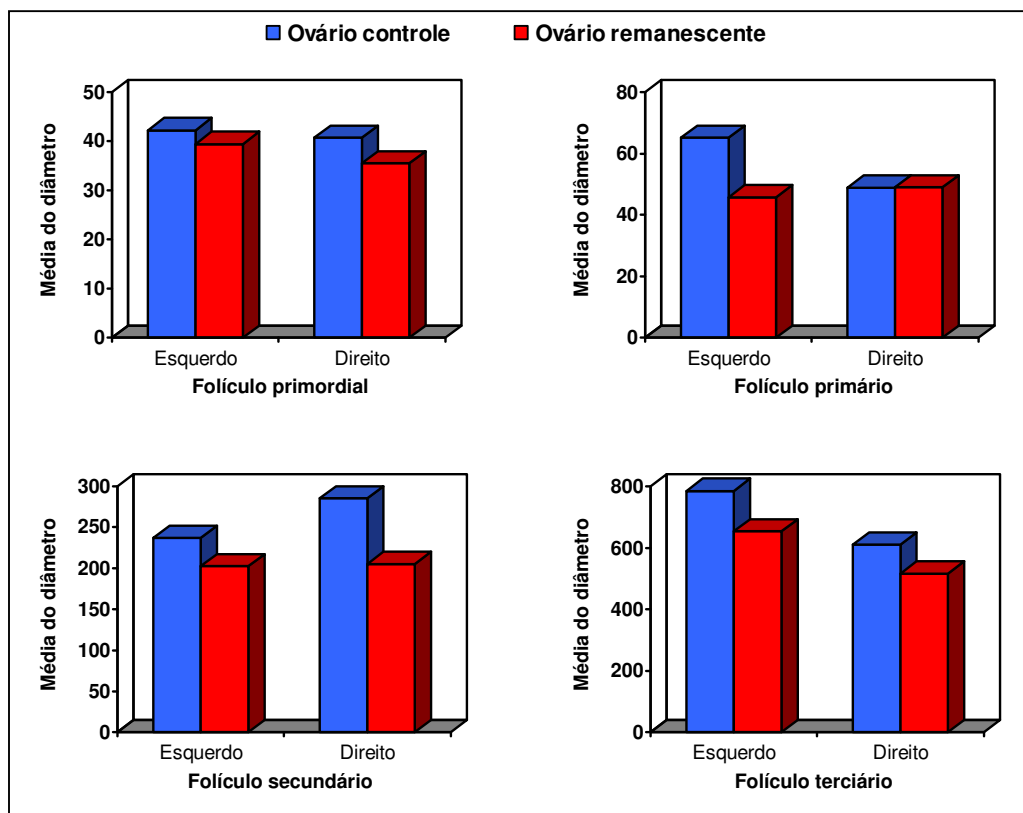


Figura 14. Média do diâmetro dos folículos ovarianos primordial, primário, secundário e terciário obtidos no ovário controle e remanescente segundo a lateralidade.

Os resultados desta investigação precisam ser complementados com estudos adicionais de dosagem hormonal, métodos imuno-histoquímicos e também em outras espécies animais, por um período maior que 120 dias. Conforme Ksiazkiewicz (2006), é esperado que as tecnologias emergentes possam prover uma fonte adicional de ovócito para reprodução das espécies, sobretudo às em extinção. A produção de ovócitos competentes depende da utilização de técnicas apropriadas. No entanto, o nível alto de atresia encontrado no gato doméstico por Wood et al. (1997) contribui para o baixo sucesso da maturação e fertilização de ovócito *in vitro* quando comparado a outras espécies. A descoberta de estratégias para diminuir ou desacelerar a taxa de consumo folicular em gatas domésticas pode ajudar, eventualmente, no entendimento da biologia folicular, útil para o desenvolvimento contínuo de tecnologias para preservar ovócitos de espécies felinas em extinção. Por essa razão, acreditamos que o implante autólogo fresco ovariano possa ser um método promissor para garantir a fecundidade dessas espécies.

## **5. CONCLUSÕES**

Os implantes ovarianos recuperados nesse estudo apresentaram folículos primordiais e primários, com fibroplasia de tecido conjuntivo interfolicular.

O período de 120 dias não foi suficiente para caracterizar o consumo folicular ovariano.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, L.R.; VASCONCELLOS, L.S.; BARBOSA, J.F.; PETROIANU, A. Ovarian Autotransplantation to the Greater Omentum: Experimental Model. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.187-192, 2002a.

ALBERTI, L.R.; VASCONCELLOS, L.S.; PETROIANU A.; NUNES, M.B. Avaliação morfofuncional do auto-implante ovariano no retroperitônio. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, SP, v. 35, p. 30-35, 2002b.

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 -196C. **Endocrinology**, Baltimore, Md., v. 140, p. 462-71, 1999.

BANKS, W.J. Sistema Reprodutor feminino. In:\_\_\_ **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992. p. 565-588.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T. Ovarian tissue banking for cancer patients: reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. **Human Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v. 19, n. 6, p. 1242-44, 2004.

BEDAIWY, M.A.; JEREMIAS, E.; GURUNLUOGLU, R.; HUSSEIN, M.R.; SIEMIANOW, M.; BISCOTTI, C.; FALCONE, T. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v. 79, n. 3, p. 594-602, 2003.

BOSCH, P.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; MILLER, D.M.; WININGER, J.D.; MASSEY, J.B.; LAMB, S.V.; BRACKETT, B.G. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, New York, NY, v.61, p. 581-594, 2004.

BRISTOL, S.K.; WOODRUFF, T.K. Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor  $\beta$  superfamily ligands in the feline ovary. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v.70, p. 846-859, 2004.

BRITO, N.M.B.; TORRES, I.O.; SILVEIRA, E.L.; SANTOS, L.L. Study about the feasibility of ovarian graft in rats' omentum pouch, using cyclosporine A. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Sao Paulo, SP, v. 20, n.2, p.174-179, 2005.

CALLEJO, J.; JAUREGUI, M.T.; VALLS, C.; FERNANDEZ, M.E.; CABRE, 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**, Birmingham, Ala., US, v. 72, n. 3, p. 513-7, 1999.

CALLEJO, J.; SALVADOR, C.; MIRALLES, A.; VILASECA, S.; LAILLA, J.M.; BALASCH, J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarin tissue. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, Md., US, v. 86, p. 4489-94, 2001.

CALLEJO, J.; VILASECA, S.; MEDINA, M.; SALVADOR, C.; VALLS, C.; LAILLA, J.M. Inhibin and follicular development in heterotopical ovary transplants without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats. **Fertility and Sterility**, Supplement 1, Birmingham, Ala., US, v. 79, p. s743-s748, 2003.

CALLEJO, J.; VILASECA, S.; ORDI, J.; CABRE, 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**, Birmingham, Ala., US, v. 77, n. 2, p. 396-402, 2002.

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**, Amsterdam, NL, v. 25, n. 163(1-2), p. 131-9, 2000.

CARTER, C. N. Pet population control: another decade without control. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, US, v. 197, n. 2, p. 192-5, 1990.

CESCHIN, A. P.; BIONDO-SIMOES, M. D. L. P.; THOMAZ, B. A. C.; TOTSUGUI, J. Indirect hormonal evaluation and study of the follicles preservation in the ovarian transplantation tissue in rats inguinal region. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, SP, v.19, n.1, p. 27-30, 2004.



CHAFFIN, C. L.; STOUFFER, R. L. Role of gonadotrophins and progesterone in the regulation of morphological remodelling and atresia in the monkey peri-ovulatory follicle. **Human Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v.15, n.12, p.2489-2495, December 2000.

CHRISTIANSEN, I. J. Limitação da fertilidade na fêmea e no macho. In: \_\_\_\_\_. **Reprodução no cão e gato**. São Paulo: Manole, 1988, p. 145-78.

CHUN, S.Y.; EISENHAUER, K. M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E.; HSUEH, A. J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, Baltimore, Md., v.137, p. 1447-1456, 1996.

COOPER, J. E. Ethics and laboratory animals. **The Veterinary Record**, England, v.116, p. 594-595, 1985

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3ª edição, Guanabara-Koogan S.A., 2004, 454 p.

DAVIDSON, A. P.; FELDMAN, E. C. Anormalidades ovarianas e do ciclo estral na cadela. In: Ettinger, S.J. (Ed.). **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997, v.2, p. 2218-26.

DAVIES, N. L. Complications of ovarian autotransplantation in bitches. **Journal of the South African Veterinary Association**, Bryanston, Republic of South Africa, v. 60, n. 3, p.145, 1989.

DAWSON, A. B.; FRIEDGOOD, H. B. The time and sequence of preovulatory changes in the cat ovary after mating or mechanical stimulation of the cervix uteri. **The Anatomical Record**, New York, US, v. 76, p. 411-29, 1940.

DEPALO, R.; NAPPI, L.; LOVERRO, G.; BETTOCCHI, S.; CARUSO, M. L.; VALENTINI, A. M.; SELVAGGI, L. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. **Human Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v. 18, n. 12, p. 2678-82, 2003.

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 a Gonadotropin- Dependent Increase in Angiogenic Factor Gene Expression. **Endocrinology**, Baltimore, Md., v. 134, n. 3, p. 1146-1154, 1994.

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 (British Ed.)**, London, GB, v. 64, Issue 9443, p. 1405-1410, 2004.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v. 122, p. 829-838, 2001.

FAROOKHI, R.; KEYES, P. L.; KAHN, L. E. A method for transplantation of luteinizing granulosa cells: evidence for progesterone secretion. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 27, p. 1261-1266, 1982.

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

GAYTÁN, F.; MORALES, C.; BELLIDO, C.; AGUILAR, E.; SANCHEZ-CRIADOS, J. E. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 58, p. 52-59. 1998.

GOLDENBERG, S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, SP, v. 15, n. 4, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>

GOSDEN, R. G. Ovarian germ cell manipulation and transplantation. **Agbiotech News and Information**, v. 4, p. 337–340, 1992.

GOSDEN, R. G.; BOULTON, M. I.; GRANT, K.; WEBB, R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, GB, v.101, p. 619–23, 1994.

GRANER, E. A. **Estatística**. ed Melhoramentos, São Paulo, 1966. 187 p.

GUNASENA, K. T.; VILLINES, P. M.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v. 12, p. 101-6, 1997.

HARRIS, M.; EAKIN, R. M. Survival of transplanted ovaries in rats. **The Journal of experimental zoology**, United States, v. 112, p. 131–156, 1949.

HARRISON, F.A. Reproductive behaviour in the pig after autotransplantation of the ovary by vascular anastomoses. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, Inglaterra, GB., v. 67, n. 4, p. 663-70, 1982.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, New York, US, v. 124, p. 43-101, 1991.

HIRSHFIELD, A. N.; MIDGLEY JR., A. R. Morphometric analysis of follicular development in the rat. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 19, n. 3, p. 597-605, 1978.

HSUEH, A. J. W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, Baltimore, Md., US, v.15, p. 707-724, 1994.

ISRAELY, T.; NEVO, N.; HARMELIN, A.; NEEMAN, M.; TSAFRIRI, A. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. **Human Reproduction**, Oxford, Inglaterra, v. 21, n. 6, p. 1368-79, 2006.

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**, Birmingham, Ala., US, v. 77, n. 6, p. 1278-82, 2002.

KARJA, N. W.; OTOI, T.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. **Theriogenology: an International Journal of Animal Reproduction**, Stoneham, Mass., US, v. 57, n. 9, p. 2289-98, 2002.

KIRAN, G.; KIRAN, H.; COBAN, Y. K.; GUVEN, A. M.; YUKSEL, M. Fresh autologous transplantation of ovarian cortical strips to the anterior abdominal wall at the Pfannenstiel incision site. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v. 82, I. 4, p. 954-956, 2004.

KORFSMEIER, K. H. Oocytes in primordial follicles of the immature cat (*Felis domestica*). **Anatomischer Anzeiger**, Germany, v. 154, p. 283-292, 1983.

KSIAZKIEWICZ, L. K. Recent achievements in in vitro culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reproductive Biology**, Poland, v. 6, n. 1, p. 3-16, 2006.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D.; VOLLMAR, B. Cryopreservation does not affect neovascularization of freely transplanted ovarian follicles. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v. 79, I. 6, p. 1458-1460, 2003.

LE ROUX, P. H.; VAN DER VALT, L. A. Ovarian autograft as an alternative to ovariectomy in female dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, Colo., US, v. 14, p. 418-9, 1978.

LEE, D.; OUHIBI, N.; BATTAGLIA, D. Cryopreservation of ovarian tissue: banking reproductive potential for the future. **Current Women's Health Reports**, United States, v. 1, n. 2, p. 152-6, 2001.

LEE, D. M.; YEOMAN, R. R.; BATTAGLIA, D. E. Live birth after ovarian tissue transplant. Fresh pieces of monkey ovary remain fully functional even when moved to a new site. **Nature, Society and Thought**, Minneapolis, Minn., US, v. 428, p. 137-138, 2004.

MANABE, N.; GOTO, Y.; MATSUDA-MINEHATA, F.; INOUE, N.; MAEDA, A.; SAKAMAKI, K.; MIYANO, T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, JP, v. 50, n. 5, p. 493-514, 2004.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C. H.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, Cambridge, Inglaterra, GB, v.123, n.1, p. 23-30, 2002.

MATERA, J. M.; BARNABE, V. H.; GAMBARINI, M. L.; GEURRA, J. L. Estudo experimental do enxerto autólogo de ovário em cadelas submetidas à ovariectomia e ovariosalpingohisterectomia. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, SP, v.13, p. 44-52, 1998.

MCMULLEN, M. L.; CHO, B.; YATES, J.; MAYO, K. E. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha subunit. **Endocrinology**, Baltimore, Md., v.142, p. 5005-5014, 2001.

MEDEIROS, S. F.; YAMAMOTO, M. M. W. Mecanismos do consumo folicular ovariano. **Reproducao e Climaterio**, Ribeirao Preto, SP, v. 13, n. 1, p. 18-27, 1998.

MEREDITH, S.; DUDENHOEFFER, G.; JACKSON, K. Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, GB, v. 119, p. 43-48, 2000.

MIALOT, J. P. Métodos anti-reprodutivos. In:\_\_\_\_. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária; 1988. p 28-33.

MICHALANY, J. In:\_\_\_\_. **Técnica histológica em anatomia patológica**.1.ed. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1980. 277p.

MILLER, P. B.; CHARLESTON, J. S.; BATTAGLIA, D. E.; KLEIN, N. A.; SOULES, M. R. Morphometric analysis of primordial follicle number in pigtail monkey ovaries: symmetry and relationship with age. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 61, p. 553– 6, 1999.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, San Diego, Calif., US., v. 1, n. 213 (1), p. 1-17, 1999.

NANCE, D. M.; MOGER, W. H.; WILKINSON, M. Neuroendocrine control of ovarian autografts. **Endocrine Research Communications**, New York, US, v. 9, n. 3-4, p. 185-94, 1982-83.

NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, Oxford. Inglaterra, v.11, p.1487–91, 1996.

NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; MARBAIX, E.; JADOUL, P.; DONNEZ, J. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. **Human reproduction**, Oxford, England, v.15, n.3, p.572-7, 2000.

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**, Oxford, Inglaterra, GB, v.3, p. 267–280, 1997.

NUGENT, D.; NEWTON, H.; GALLIVAN, L.; GOSDEN, R. G. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra, GB, v.114, p. 341–346, 1998.

OKTAY, K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? **Human Reproduction**, Oxford, Inglaterra, v.21, n. 6, p.1345-1348, 2006.

OKTAY, K.; BUYUK, E.; ROSENWAKS, Z.; RUCINSKI, J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v.80, Issue 1, p.193-198, 2003.

OKTAY, K.; ECONOMOS, K.; KAN, M.; RUCINSKI, J.; VEECK, L.; ROSENWAKS, Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. **JAMA: The journal of the American Medical Association**, United States, v. 286, n. 12, p. 1490–3, 2001.

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 & Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p.117-123, 2004.

PETROIANU, A.; VASCONCELLOS, L. S.; ALBERTI, L. R.; NUNES, M. B. The Influence of Venous Drainage on Autologous Ovarian Transplantation. **Journal of Surgical Research**, New York, US., v. 124, p. 175–179, 2005.

PONDERATO, N.; GRASSELLI, F.; SALERI, R.; TAMANINI, C. Factors Modulating Apoptosis: an in-vitro Study in Swine Granulosa Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, DE, v. 35, n. 5, p. 213-219, 2000.

PRU, J. K.; TILLY, J. L. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, Md., v. 15, n. 6, p. 845-53, 2001.

SANTORO, N. Mechanisms of premature ovarian failure. **Annales D'endocrinologie**, France, v.64, n. 2, p. 87-92, 2003.

SCHNORR, J.; OEHNINGER, S.; TONER, J.; HSIU, J.; LANZENDORF, S.; WILLIAMS, R.; HODGEN, G. Functional studies of subcutaneous ovarian transplants in non-human primates: steroidogenesis, endometrial development, ovulation, menstrual patterns and gamete morphology. **Human Reproduction**, Oxford, Inglaterra, GB, v. 17, p. 612-619, 2002.

SCHOSSLER, J. E.; RIOS M. V.; ILHA M. R.; LIMA S. Auto-transplantação de ovário na tela subcutânea em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, SP, v. 14, n.1, 1999. Este artigo está disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0102-86501999000100002&lng=en&nrm=iso>>. Acessado em 12/05/06.

[scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502000000400001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000400001&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 10/ 08/06.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento**. Trad. Alfredo Alves de Farias.ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975. 350 p.

SMITH, K.W. Female genital system. In: **Archibald J. Canine Surgery**. Santa Bárbara: American Veterinary Publications; 1974, p 751-82.

TE VELDE, E. R.; SCHEFFER, G. J.; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. J.; FAUSER, B.C. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, NL., v. 25, n. 145(1-2), p. 67-73, 1998.

TELFER, E., GOSDEN, R.G., A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Inglaterra , GB v. 81:p. 1137-147, 1987.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, Inglaterra , GB, v. 1, n. 3, p. 162-72, 1996.

TILLY, J.L.; RATTS, V.S. The biological and clinical significance of ovarian cell death. **Contemporary OB/Gyn**, v.41, n.3, p.59-86, 1996.

TORRENTS, E.; BOISO, I.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. Applications of ovarian tissue transplantation in experimental biology and medicine. **Human Reproduction Update**, Oxford. Inglaterra, v. 9, n. 5, p. 471-81, 2003.

VASKIVUO, T. E.; ANTTONEN, M.; HERVA, R.; BILLIG, H.; DORLAND, M.; TE VELDE, E. R.; STENBACK, F.; HEIKINHEIMO, M.; TAPANAINEN, J.S. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, Md., US, v. 86, n. 7, p. 3421-9, 2001.

VON EYE CORLETA, H.; CORLETA, O.; CAPP, E.; EDELWEISS, M. I. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v. 70, n. 1, p. 16-9, 1998.

WANG, H.; MOONEY, S.; WEN, Y.; BEHR, B.; POLAN, M. L. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Saint Louis, Mo., US, v.187, n.2, p.370-4, 2002.

WEISSMAN, A.; GOTLIEB, L.; COLGAN, T.; JURISICOVA, A.; GREENBLATT, E.M.; CASPER R.F. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. **Biology of Reproduction**, Champaign, Ill., US, v. 60, n. 6, p. 1462-7, 1999.

WILDT, D.E.; SCHIEWE, M.C.; SCHMIDT, P.M.; GOODROWE, K.L.; HOWARD, J.G.; PHILLIPS, L.G.; O'BREIN, S.J.; BUSH, M. Developing animal model systems for embryo technologies in the rare and endangered wildlife. **Theriogenology: an International Journal of Animal Reproduction**, Stoneham, Mass., US, v. 25, p. 33-51, 1986.

WILSON, G.P.; HAYES Jr. Ovariohisterectomia em cães fêmeas e gatas. In: Bojrab, MJ. **Cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Roca; 1986; p 365-9.

WOLNER-HANSEN, P.; HAGGLUND, L.; PLOMAN, F.; RAMIREZ, A.; MANTHORPE, R.; THURING, A. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4(1/2) years after autologous stem cell transplantation. **Acta Obstet Gynecol, Scand.**, v. 84, n. 7, p. 695-8, 2005.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**, New York, US, v. 46, p. 190-200, 1997.



YIN, H.; WANG, X.; KIM, S.S.; CHEN, H.; TAN, S.L.; GOSDEN, R.G. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype **Human Reproduction**, Oxford, Inglaterra, GB, , v. 18, p. 1165-1172, 2003.

YVES, A. More to Ovarian Transplantation Than Meets the Eye. **Fertility and Sterility**, Birmingham, Ala., US, v. 74, n. 2, p. 423-424, 2000.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.; VAN DER WEIJDEN, G.; BEVERS, M.; VAN DER HURK, R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, Champaign, US, v. 65, p. 967-977, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)