LIA CRUZ VAZ DA COSTA DAMÁSIO

**Transplante experimental, subcutâneo e
intraperitoneal, de ovário em suínos:
estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Co-orientador: Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Damásio, Lia Cruz Vaz da Costa

Transplante experimental, subcutâneo e intraperitoneal, de ovário em suínos :
estudo histomorfométrico e imunoistoquímico / Lia Cruz Vaz da Costa Damásio. --
São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.
Co-orientador: José Maria Soares Júnior.

Descritores: 1.Ovário/transplante 2.Apoptose 3.Folículo ovariano
4.Ovário/anatomia & histologia 5.Porco miniatura 6.Criopreservação
7.Imunoistoquímica 8.Caspase 3 9.Proteína de morte celular associada a bcl
10.Proteína Bax

USP/FM/DBD-080/11

DEDICATÓRIA

A minha filha **Maria Luiza**, sentido e alegria de minha vida todos os dias.

A minha mãe, **Maria dos Remédios**, pelo amor, apoio e força sempre, maravilhosa e incontestavelmente presentes em todos os momentos de minha vida.

A meu pai, **Edson**, pelo exemplo irretocável, compreensão, incentivo diário, amor e carinho infinitos.

A meus irmãos, **Esaú** e **Noeme**, pela amizade crescente, amor indiscutível e parceria indissolúvel.

A minhas irmãzinhas, **Letícia**, **Larissa** e **Naiara**, e a meu sobrinho **Erick**, pela vontade que me trazem de ser uma pessoa melhor.

A meu marido, **Helder**, pelo amor, paciência, cooperação e incentivo tão importantes para eu ser verdadeiramente quem sou e para minha plena felicidade.

A meu padrasto, **José Paulo**, pelo amor, respeito e educação concedidos, cultivados e aprimorados nesses anos de convivência.

A meu cunhado, **Rufino Filho**, irmão desta e de outras vidas, pela presença e apoio constantes em minha vida, dos simples detalhes às grandes decisões.

A meu sogro, **Rufino Damásio**, pelo apoio e incentivo indispensáveis para a conclusão desta tese e pelas contribuições constantes em minha formação humana e afetiva.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Edmund Chada Baracat**, por ser admirável exemplo de ser humano, professor e profissional, daqueles que contribuem para o crescimento e melhoria de todos a sua volta, com competência e compreensão.

Ao Professor Doutor **José Maria Soares Júnior**, pelas incontestáveis dedicação e sapiência e pelo apoio e ensinamentos nesta caminhada.

Ao Professor Doutor **Manuel de Jesus Simões**, pelas contribuições preciosas, pelo conforto emocional e apoio científico sem horas marcadas.

Ao companheiro **Jairo Iavelberg**, pelo apoio em todas as horas, pela facilidade de comunicação que viabilizou esta pesquisa e pela participação nos procedimentos e nas buscas árduas da pós-graduação.

Ao Professor Doutor **Eduardo Vieira da Motta**, pela sabedoria e bom senso que fazem parte de seu cotidiano e pelas contribuições constantes e precisas a minha formação pessoal e profissional.

Às melhores amigas que uma Residência pôde proporcionar a alguém nessa vida: **Lisandra Stein Bernardes**, **Maria Teresa Roncaglia** e **Camila Locci Bontempo**, tão diferentes entre si e tão maravilhosamente influentes e importantes em minha vida, com o apoio, carinho e companheirismo infalíveis na alegria e na tristeza.

A meu amigo **Felipe Fittipaldi**, sempre corajoso, confiável, carinhoso e companheiro.

A meus amigos **Leonardo Sérgio Luz**, **Danielle Dourado Magalhães** e **Thaís Araújo Fortes**, espelhos em que posso ver, verdadeiramente, minha alma refletida e amores eternos, sempre presentes e confiantes no êxito desta jornada.

Aos queridos **Cristiane**, **Célia**, **Mara**, **Leslie**, **Moacyr** e **Sônia**, anjos do cotidiano, das alegrias e das dificuldades de todos meus passos na Clínica Ginecológica da FMUSP.

À Sra. **Claudia Vieira**, profunda conhecedora da Pós-Graduação da FMUSP e colaboradora atenciosa e eficiente para efetivação desta tese.

Ao **Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa-IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein-HIAE**, pela magnífica estrutura física concedida e pelo apoio técnico e financeiro.

Ao **Centro de Treinamento e Experimentação em Cirurgia- CETEC do IIEP-HIAE** e a todos os seus funcionários e colaboradores, pela oportunidade de concluir este trabalho com qualidade e eficiência.

Aos Pós-Graduandos da Histologia da UNIFESP - **Carla Cristina Maganhin, Luiz Fernando Portugal Fuchs, Adriana Aparecida Ferraz Carbonel** - que generosamente me ajudaram e incentivaram na conclusão desta tese.

Ao Sr. **Paulo Celso Franco** e sua filha **Ariani Neiva Franco**, que, esmerados na técnica, competência e dedicação, proporcionaram-me um material histológico excelente e constante apoio.

Ao Professor Doutor **Paulo César Serafini**, em nome do qual agradeço a toda a equipe da Clínica Huntigton, pela inestimável colaboração e parceria na execução da pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES**, pela bolsa concedida e pelo acesso aos periódicos.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, que me construiu, com os irretocáveis Programas de Residência Médica e Pós-Graduação, preceitos e conhecimentos pessoais e profissionais sólidos e valorosos.

*O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios
em que nos é consentido sermos crianças por toda a vida.*
(Albert Einstein)

*Se você pensa que pode ou se pensa que não pode, de
qualquer forma você está certo.*

(Henry Ford)

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Listas de Figuras, Gráfico, Quadros e Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	Apoptose.....	5
2.1.1	Caspase.....	6
2.1.2	Família Bcl-2.....	7
2.1.3	Proteínas inibidoras da apoptose.....	8
2.1.4	Vias de ativação da apoptose.....	8
2.1.4.1	Via intrínseca (Mitocondrial).....	8
2.1.4.2	Via extrínseca (citoplasmática).....	10
2.2	Ciclo reprodutivo – suínos.....	11
2.2.1	Indução e sincronização do cio em suínos.....	13
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	Objetivo geral.....	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	MÉTODOS.....	16
4.1	Locais.....	17
4.2	Animais de experimentação.....	18
4.3	Grupos de estudo.....	19
4.4	Anestesia.....	21
4.5	Sincronização do ciclo estral.....	22
4.6	Ooforectomia.....	23
4.7	Preparo dos fragmentos de ovário.....	24
4.8	Criopreservação.....	25
4.9	Descongelação.....	28
4.10	Transplante a fresco subcutâneo.....	31
4.11	Transplante a fresco intraperitoneal.....	35
4.12	Transplante criopreservado subcutâneo.....	38
4.13	Transplante criopreservado intraperitoneal.....	38
4.14	Protocolo por grupos.....	38
4.15	Análise Histomorfológica.....	41
4.16	Análise Histomorfométrica.....	41
4.17	Análise imunoistoquímica.....	43
4.18	Análise estatística.....	44
4.19	Análise inferencial.....	45

5	RESULTADOS.....	46
5.1	Histomorfológicos.....	45
5.1.1	Grupos experimentais.....	51
5.2	Histomorfométricos.....	69
5.3	Imunoistoquímicos.....	71
5.3.1	Qualitativos.....	71
5.3.1.1	Bcl-2.....	71
5.3.1.2	Bax.....	77
5.3.1.3	Caspase 3-clivada.....	84
5.3.2	Quantitativos.....	90
6	DISCUSSÃO.....	91
7	CONCLUSÕES.....	114
8	ANEXOS.....	115
9	REFERÊNCIAS.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
µm	Micrômetros
AIF	Fator Indutor de Apoptose- <i>Apoptosis Inducing Factor</i>
ANOVA	Análise de Variância
APAF-1	Fator Ativador da Apoptose- <i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAD	<i>"Caspase-activated DNase"</i>
CAPPEsq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CETEC	Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetros
DAB	Diaminobenzidina
DFF	DNA <i>"Fragmentation Factor"</i> – fator de fragmentação do DNA
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DR	Receptores de Morte- <i>Death Receptors</i>
E2	Estradiol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FADD	Domínio proteico de morte relacionado ao FAS - <i>FAS-associated death domain protein</i>
FAZ	Sinônimo de CD95, receptor proteico envolvido na via apoptótica celular
FLICE	Enzima betaconversora da interleucina 1 semelhante ao FADD- <i>FADD- Like Interleukina 1 beta-Converting Enzyme</i>
FLIP	Proteína inibitória do FLICE
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
Gc	Grupo Controle
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas- <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein

IAP	Proteína inibidora da apoptose- <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
iCAD	Subunidade inibitória do CAD
IIEP	Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa
Kg	Quilogramas
L	Litros
LH	Hormônio Luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MG	Miligramas
MI	Mililitros
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
NC	Não Classificado
°C	Graus Celsius
PAK	Proteína quinase ativada
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PROH	Propilenoglicol
SMAC/Diablo	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point</i>
SP	São Paulo
TBS	<i>Tris Buffer Solution</i>
TCIP	Transplante Criopreservado Intraperitoneal
TCSC	Transplante Criopreservado Subcutâneo
TFIP	Transplante a Fresco Intraperitoneal
TFSC	Transplante a Fresco Subcutâneo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de ativação intrínseca da apoptose. Adaptado de GRIVICH	10
Figura 2	Via de ativação extrínseca da apoptose. Adaptado de GRIVICH	11
Figura 3	Estrutura química do altrenogest.....	14
Figura 4	Fotografia da baia de acomodação dos animais no centro de treinamento e experimentação em cirurgia- CETEC do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa- IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein - HIAE	19
Figura 5	Procedimento de congelação das fatias de tecido cortical ovariano. Detalhe da solução de crioprotetor utilizada no experimento.....	26
Figura 6	Fotografia do freezer de congelação lenta com taxas programáveis (CL-8800, Cryogenesis software, freezer control) utilizada na criopreservação dos ovários.....	27
Figura 7	Fotografia da primeira etapa da descongelação dos fragmentos de ovário, com exposição à temperatura ambiente por 40 segundos	29
Figura 8	Fotografia da segunda etapa da descongelação dos fragmentos de ovário, com banho-maria com temperatura controlada em 37°C.....	30
Figura 9	Fotografia do local de implante subcutâneo. Preparo do local.....	32
Figura 10	Fotografia do local de implante subcutâneo. Preparo do local.....	33
Figura 11	Fotografia do local de implante subcutâneo. Pós operatório imediato.....	34
Figura 12	Fotografia da técnica de implante intraperitoneal. Detalhe da fixação na tela de Surgicell®	36
Figura 13	Fotografia do local de implante intraperitoneal. Aspecto inicial	37
Figura 14	Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar inúmeros folículos primordiais formando “clusters”. H.E.....	47

Figura 15	Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar folículo maduro com ovócito no seu interior (seta) e folículo degenerado (*).H.E.....	48
Figura 16	Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar parte de corpo lúteo. H.E	49
Figura 17	Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar parte de corpo albicante (*).H.E	50
Figura 18	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região subcutânea. Notar folículos ovarianos em vários estágios do desenvolvimento. H.E.....	52
Figura 19	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região subcutânea. Notar inúmeros folículos ovarianos primordiais formando “Clusters”. H.E.....	53
Figura 20	Fotomicrografia mostrando parte do corpo lúteo de ovário de porca implantado a fresco na região subcutânea. Notar vasos de grande calibre na porção periférica. H.E.....	54
Figura 21 -	Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante de ovário de porca implantado a fresco na região subcutânea. Notar vasos de grande calibre na porção periférica. H.E.....	55
Figura 22 -	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região intraperitoneal. Notar folículos ovarianos primordiais, alguns formando “clusters”. H.E.....	56
Figura 23	Fotomicrografia mostrando parte do ovário de porca implantado a fresco na região intraperitoneal. Notar a presença de folículos ovarianos primordiais (setas) e em crescimento na porção periférica (c). H.E	57
Figura 24	Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante de ovário de porca implantado a fresco na região intraperitoneal. H.E.....	58
Figura 25	Fotomicrografia mostrando porção periférica de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar no estroma ovariano áreas de células arranjadas de forma concêntrica (setas) e inúmeros folículos ovarianos primordiais. H.E.....	60

Figura 26	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar área contendo inúmeros folículos ovarianos em várias fases do desenvolvimento. H.E.....	61
Figura 27	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar área contendo folículo ovariano em crescimento. H.E	62
Figura 28	Fotomicrografia mostrando parte de corpo lúteo de ovário de porca congelado e implantado na região subcutânea. Notar área central mais clara no centro do corpo lúteo (*). H.E	63
Figura 29	Fotomicrografia mostrando porção periférica de ovário de porca congelado implantado na região intraperitoneal. Notar no estroma ovariano áreas de células arranjadas de forma concêntrica (setas), raros folículos primordiais (*) e um corpo albicante (ca). H.E	65
Figura 30	Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar a presença de alguns folículos primordiais, um folículo em crescimento e um corpo albicante (ca). H.E	66
Figura 31	Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante de ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar na área periférica vasos sanguíneos de grosso calibre. H.E.....	67
Figura 32	Fotomicrografia mostrando parte do ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar folículos ovarianos em crescimento (FO) e alguns folículos primordiais (setas). H.E	68
Figura 33	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica	72
Figura 34	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica	73

Figura 35	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica	74
Figura 36	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica	75
Figura 37	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica	76
Figura 38	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica	78
Figura 39	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante ovariano a fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica	79
Figura 40	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante a fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica	80
Figura 41	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante a fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica	81

Figura 42	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica.....	82
Figura 43	Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica.....	83
Figura 44	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a baixa intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica	85
Figura 45	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica	86
Figura 46	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica	87
Figura 47	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica	88
Figura 48	Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Grupos de Estudo.....	21
Quadro 2	Indicações atuais de preservação de tecido ovariano	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Histomorfometria do ovário de porcas (Minipig) nos grupos estudados.....	70
Tabela 2	Distribuição das médias e desvio-padrão da imunexpressão de Bcl-2, Bax e caspase 3-clivada nos grupos estudados.....	90

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	Evolução dos trabalhos indexados no Pubmed sobre o tema: “transplante ovariano” (search: ovarian transplantation) Novembro 2009.....	102
-----------	--	-----

RESUMO

Damásio LCVC. *Transplante experimental, subcutâneo e intraperitoneal, de ovário em suínos: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 132 p.

O transplante autólogo de tecido ovariano constitui alternativa relevante na preservação da fertilidade e da função hormonal ovariana em mulheres sujeitas à falência ovariana prematura e infertilidade, por causas malignas, tratamentos adjuvantes ou cirurgias. É a única opção para crianças, fase pré-puberal e para mulheres que não podem retardar a quimioterapia ou não podem ser submetidas à estimulação do ciclo. O transplante ovariano autólogo pode ser, quanto ao local de reimplantação, ortotópico ou heterotópico e, quanto à conservação, a fresco ou após o período de criopreservação. As várias etapas envolvidas neste transplante são estudadas mundialmente na atualidade, como a retirada e preservação do tecido ovariano, as técnicas de criopreservação, o local apropriado para o reimplante e as possibilidades de redução da perda folicular. A avaliação da apoptose - morte celular programada - é útil na avaliação da rejeição e viabilidade dos enxertos de transplantes estabelecidos na prática clínica, tanto autólogos como heterólogos. Com o intuito de utilizar animais de maior porte, conseguir seguimento de médio prazo e realizar os procedimentos cirúrgicos por via laparoscópica, padrão ouro em humanos, o presente estudo utilizou como modelo experimental fêmeas suínas, em idade reprodutiva, da raça Minipig. Este projeto teve como propósito avaliar a influência da criopreservação e do local de implante na qualidade e na viabilidade do transplante autólogo de ovário, a fresco e após criopreservação, no tecido celular subcutâneo e na região intraperitoneal peri-infundibular. Foram avaliados a quantidade e a densidade folicular dos implantes e os aspectos morfológicos e histomorfométricos, bem como a apoptose, por meio da imunoexpressão de proteínas proapoptóticas- Bax e antiapoptóticas-Bcl-2, além da Caspase 3-clivada, fase final das vias extrínseca e intrínseca dos mecanismos de apoptose. Quarenta animais foram divididos em cinco grupos: Controle com ooforectomia (Grupo I), ooforectomia e transplante a fresco subcutâneo (Grupo II), a ooforectomia e transplante fresco intraperitoneal (Grupo III), ooforectomia e transplante criopreservado subcutâneo (Grupo IV) e ooforectomia e transplante criopreservado intraperitoneal (Grupo V). Os resultados mostraram que independente da técnica empregada, havia folículos em desenvolvimento e corpos lúteos em todos os tecidos ovarianos transplantados; que a contagem de folículos antrais não degenerados foi menor nos grupos após criopreservação em relação ao grupo controle e que a imunoexpressão sugestiva de apoptose ocorreu em todos os grupos transplantados, sendo maior nos transplantes intraperitoneais. Concluiu-se que a técnica utilizada para o transplante de ovário e criopreservação foi viável no modelo suíno, em tecido celular subcutâneo e na região intraperitoneal peri-infundibular. O

transplante autólogo heterotópico subcutâneo apresentou melhores taxas de apoptose que o transplante ortotópico.

Descritores: 1.Ovário/transplante 2.Apoptose 3.Folículo ovariano
4.Ovário/anatomia & histologia 5.Porco miniatura 6.Criopreservação
7.Imunoistoquímica 8.Caspase 3 9.Proteína de morte celular associada a bcl 10.Proteína Bax

SUMMARY

Damasio LCVC. *Experimental transplantation, subcutaneous and intraperitoneal, ovary in pigs: immunohistochemical and histomorphometric study* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 132 p.

Autotransplantation of ovarian tissue is an important alternative to preserve fertility and hormonal ovarian function in women undergoing ovarian failure and premature infertility, because of cancer or surgery. It is the only option for infants, pre-pubertal patients and for women who can not delay chemotherapy or not may be subjected to stimulation of the cycle. The various steps involved in the transplant are studied worldwide today, as the removal and preservation of ovarian tissue, the techniques of cryopreservation, the appropriate site and mechanisms to reduce follicular loss. Assessment of apoptosis - programmed cell death-is useful in the study of the viability of the grafts and rejection of transplants established in clinical practice, both autologous and heterologous. In order to use larger animals, getting following medium term (over 21 days) and to perform surgical procedures by laparoscopy (gold standard in humans), this study used an experimental model sows, reproductive age, Minipig race. This project aims to evaluate the influence of cryopreservation and implantation site of the quality and viability of ovarian autografts, fresh and after cryopreservation, at subcutaneous site and at intraperitoneal site. We analyzed the quantity and density of follicular implants and the morphological and histomorphometric as well as apoptosis, by proteins immunoexpression antiapoptotic and proapoptotic. Forty animals were divided into five groups: Control with oophorectomy (Group I), oophorectomy and fresh transplantation to subcutaneous site (Group II), oophorectomy and fresh transplantation to intraperitoneal site (Group III), oophorectomy and transplantation of cryopreserved ovarian tissue to subcutaneous site (Group IV) and oophorectomy and transplantation of cryopreserved ovarian tissue to intraperitoneal site (Group V). We concluded that the autologous ovarian transplantation was feasible in the technical proposals, in subcutaneous and intraperitoneal site in the porcine model; that regardless of the technique, there was developing follicles and corpora lutea in all ovarian tissue transplanted; that antral non-degenerate follicle count was lower in groups after cryopreservation that in the control group and that the immunoexpression of apoptosis occurred in all transplanted groups, more evident in intraperitoneal transplants.

Keywords: Ovarian transplantation. Apoptosis. Bax. Bcl-2. Cleaved Caspase 3. Pigs. Follicle accounting.

O transplante autólogo de tecido ovariano constitui alternativa relevante na preservação da fertilidade e da função hormonal ovariana em mulheres sujeitas à falência ovariana prematura e infertilidade ⁽¹⁻⁴⁾. As principais causas são neoplasias, doenças benignas e situações clínicas que requeiram a retirada do tecido ovariano da região pélvica para proteção, como por exemplo, radioterapia ^(1, 5-7). Mais recentemente, alguns autores sugerem sua utilização nos casos de adiamento da maternidade, indicação ainda controversa do ponto de vista ético ^(1, 5).

O transplante de ovário realça das demais alternativas de preservação da fertilidade ⁽⁷⁻⁹⁾, nos casos indicados, por ser utilizável em crianças, na fase pré-puberal e para mulheres que necessitam e não podem retardar a quimioterapia ⁽¹⁰⁾. Além disso, prescinde da estimulação do ciclo, tem menores implicações éticas do que a criopreservação de embriões e apresenta maior viabilidade técnica do que a criopreservação de oócitos isolados ⁽¹⁰⁾. Outro aspecto favorável do transplante de ovário é que os estudos iniciais mostraram que o ovário pode ser implantado na forma de pequenos fragmentos corticais, não requisitando anastomoses vasculares cirúrgicas ^(11, 12).

Em geral, o transplante ovariano pode ser autólogo, o que diminui os problemas relacionados à necessidade de imunossupressão. Contudo, há outros mecanismos envolvidos na rejeição de enxertos, como apoptose e

reação inflamatória, que ainda não estão bem esclarecidas nesse tipo de transplante ^(1, 13). Os fragmentos corticais de ovário podem ser implantados a fresco ou após criopreservação, porém, ainda existem muitas dúvidas sobre o impacto da isquemia imediata, o potencial da crioinjúria na reserva folicular, o melhor local para o reimplante e a viabilidade em longo prazo do tecido transplantado ^(6, 10). Em sua maioria, os trabalhos publicados são experimentais, com curto período de avaliação e realizados em animais de pequeno porte, sendo divergentes em relação a todos estes aspectos ^(1, 5, 14).

Nos transplantes já rotineiros na prática médica, como o de rim ⁽¹⁵⁾ e o de pâncreas, os mecanismos de morte celular e regeneração constituem motivo de investigação. Assumem papel importante a morte celular na rejeição e a viabilidade dos enxertos, tanto autólogos como heterólogos ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

Há dois tipos descritos de morte celular: necrose e apoptose. Na necrose, há alterações precoces da membrana plasmática em resposta rápida a agressões do meio, com aumento da permeabilidade da camada de fosfolípides e ruptura física da membrana plasmática ⁽²⁰⁾. Em contraste, a apoptose ou morte celular programada caracteriza-se pela condensação nuclear e citoplasmática, modificações no citoesqueleto com formação de bolhas e de corpos apoptóticos envoltos por membrana plasmática, sem desintegração de organelas e sem infiltrado leucocitário ^(20, 21). Estudo de Zhu et al. ⁽¹⁷⁾ demonstrou que o aumento da apoptose em tecido hepático criopreservado levou a retardo no desenvolvimento e proliferação das células endoteliais sinusoidais, o que prejudica a qualidade dos enxertos no

transplante. No Brasil, Lee et al. ⁽²⁰⁾ descreveram, em 2004, participação da apoptose na rejeição aguda do transplante intestinal experimental em ratos.

O uso de suíno em pesquisas científicas é prática antiga; na literatura, já estão estabelecidas as semelhanças entre anatomia, fisiologia e fisiopatologia do suíno e do homem ⁽²²⁾. Esse modelo é mais semelhante à fisiologia humana do que outros modelos como cão, rato, camundongo, coelho ou Hamster ⁽²²⁾. Entretanto, o alto custo, o consumo alimentar, a compleição física e o peso representaram, por muito tempo, fatores limitantes para seu uso em protocolos experimentais. O estudo programado para o desenvolvimento de uma população de suínos em miniatura iniciou-se no Instituto Homel da Universidade de Minnesota, em 1949 ⁽²²⁾, o que possibilitou maior viabilidade técnica e econômica para experimentação animal com suínos de menor porte. No Brasil, a raça de suínos em miniatura disponível é a Minipig ⁽²³⁾. Há semelhança fisiológica dos ciclos estrais suínos com a fisiologia ovariana do ser humano ⁽²²⁾.

Com o intuito de utilizar animais de maior porte, conseguir seguimento de longo prazo (superior a 21 dias) e realizar os procedimentos cirúrgicos por via laparoscópica, padrão ouro em humanos, o presente estudo utilizou, como modelo experimental, fêmeas suínas em idade reprodutiva, da raça *Minipig*.

Esta pesquisa tem como propósito avaliar a influência da criopreservação e do local de implante na qualidade e na viabilidade do transplante autólogo de ovário, a fresco e após criopreservação, no tecido celular subcutâneo e na região intraperitoneal peri-infundibular. Avaliaram-se

a quantidade e a densidade folicular dos implantes e os aspectos morfológicos e histomorfométricos, como também a apoptose, por meio da imunexpressão de proteínas proapoptóticas e antiapoptóticas.

2.1 Apoptose

Apoptose, morte celular programada, é um processo essencial para o controle e regulação dos tecidos e organismos, além de participar da eliminação de células defeituosas, supérfluas ou inadequadas ⁽²¹⁾. Pode ocorrer em situações fisiológicas, como na involução do ducto tireoglossos no período embrionário, renovação das células epiteliais, redução nos tecidos endometriais e mamários na pós-menopausa, na ativação de linfócito T citotóxico em casos de infecção, na eliminação de superpopulação de leucócitos após resposta imunológica e nas fibroses. Dentre as causas patológicas de apoptose, pode-se citar a lesão ao material genético celular (estímulos radioativos, químicos ou virais) e danos por hipóxia ou isquemia. Há alterações celulares próprias deste tipo de morte celular, como retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, modificações no citoesqueleto com formação de bolhas (*“blebbings”*), condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos apoptóticos ⁽²⁴⁾.

No mecanismo de controle da apoptose, participam as caspases, as proteínas pró-apoptóticas e as proteínas antiapoptóticas. As vias de ativação da apoptose podem ser divididas, para melhor compreensão, em vias extracelular (extrínseca) e intracelular (intrínseca).

2.1.1 Caspases

As caspases, do inglês “*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*”, possuem uma cisteína no sítio ativo que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas (caspases) apenas quando a célula recebe sinal de morte. Sinalizam para a apoptose e clivam os substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, além de externalização de fosfolípídeos de membrana que ativarão a fagocitose desta célula por macrófagos. Atualmente, são descritas 14 caspases humanas, sendo que seis têm, sabidamente, participação na apoptose (caspases - 3, 6, 7, 8, 9, 10).

As caspases importantes no processo apoptótico dividem-se, basicamente, em dois grupos: executoras e iniciadoras ⁽²⁵⁾. As primeiras são responsáveis pela execução do processo de apoptose e incluem as caspases 6 e 7 e, destacadamente, a caspase 3. O DFF (*DNA fragmentation factor*) está presente na célula na forma inativa, formado pela subunidade inibitória (iCAD) e ativa (CAD). A procaspase 3, ativada pelo aptossomo (Apaf-1 + citocromo C + caspase 9), cliva a subunidade inibitória do DFF também chamada de iCAD, liberando a subunidade ativa desta molécula (CAD-caspase-activated DNase), cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA, gerando os fragmentos oligonucleossomais típicos da apoptose ⁽²⁵⁾. Proteínas do citoesqueleto, como a gelsolina e a PAK2, também são clivadas pela caspase-3, produzindo alterações celulares

características da apoptose, como a formação de “*blebbing*” e corpos apoptóticos ⁽²⁴⁾. As caspases iniciadoras têm papel de ativar as caspases executoras; têm pró-domínios longos e fazem parte deste grupo as caspases -2, 8, 9 e 10 ⁽²¹⁾.

2.1.2 Família Bcl-2

A família Bcl-2 é das proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam na regulação da mesma. Os membros antiapoptóticos são: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1 e Mcl-1, que localizam-se no envelope nuclear e no retículo citoplasmático e inibem a apoptose por prevenir a liberação de citocromo c ⁽²⁴⁾. Os proapoptóticos são: Bax, BID, Bad, Bcl-xS, Box, Bik, Blk, Bim, HrK, BNIP3 e Bak; localizados na membrana externa da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e proapoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam a aumento na expressão das proteínas proapoptóticas, com desencadeamento da apoptose.

As proteínas mais estudadas deste grupo são a Bax (proapoptótica) e a Bcl-2 (antiapoptótica). A Bcl-2 inibe a apoptose direta (por meio do bloqueio das caspases) e indiretamente, por impedir a liberação do citocromo C, proteína participante na ativação da apoptose pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, ou ainda, por sequestro e/ou ocupação dos receptores da Bax ^(21, 25). A Bax pode promover a apoptose pela interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas ⁽²¹⁾.

2.1.3 Proteínas inibidoras da apoptose

As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) são moléculas antiapoptóticas que agem pela inibição da atividade das caspases efetoras -3 e 7, da inibição da caspase iniciadora -9 ou da modulação do fator de transcrição NF-kB. Na atualidade, são descritos cinco tipos: NAIP, XIAP, c- IAP-1, c-IAP-2 e survivina. A survivina é considerada proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência a radio e quimioterapia em vários tipos de câncer ⁽²¹⁾.

A família c-FLIP (FLICE-like inhibitory protein- proteína inibitória de FLICE) também inibe a apoptose, ao prevenir a ativação da caspase-8/FLICE.

2.1.4 Vias de ativação da apoptose

2.1.4.1 Via Intrínseca (Mitocondrial)

Nesta via, os sinais de estresse são provenientes do interior da própria célula por mecanismos como radiação ultravioleta, agentes quimioterápicos, choque térmico, falta de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e concentrações elevadas de corticosteroide ⁽²⁶⁾. Os sinais de estresse gerados, ainda bioquimicamente obscuros, são detectados pelas mitocôndrias que, nos vertebrados, são o centro responsável pela decisão

se a célula deve ou não entrar em processo de morte celular programada-Figura 1 ⁽²⁵⁾.

Caso haja a decisão pela apoptose, as mitocôndrias sofrem um desacoplamento da cadeia respiratória e liberam para o citosol o citocromo C, a proteína SMAC/Diablo (“*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with a Low isoelectric point*”) e a proteína AIF (*Appoptosis-Inducing Factor*) ⁽²⁵⁾. Durante esse processo, há a formação de um megaporo que contém diversas proteinases que abrangem as membranas externa e interna da mitocôndria; através desse poro há a liberação do citocromo c para o citoplasma ⁽²¹⁾. Na regulação desse processo, há a participação das proteínas da família Bcl-2. O citocromo C citoplasmático liga-se à APAF-1 (molécula indutora da ativação da caspase) e, este complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9 que, uma vez ativada, ativará a caspase 3 e, assim, são desencadeados os processos celulares de apoptose. O complexo multimolecular, composto por citocromo C, APAF-1, ATP e caspase 9, constitui o apoptossomo executor.

Figura 1 - Via de ativação intrínseca da apoptose. Adaptado de Grivich⁽²¹⁾

2.1.4.2 Via extrínseca (citoplasmática)

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores dos fatores de necrose tumoral (rTNF)- as moléculas Fas (CD95), TNFRI, DR3, DR5 e DR6, também chamadas de Receptores de Morte (*DR: "Death Receptors"*)- que, quando estimulados, recrutam proteínas adaptadoras (por exemplo, FADD) que associam estes receptores às caspases 8 ou 10. O complexo formado pelo receptor de morte, molécula adaptadora e caspase iniciadora (8 ou 10) é chamado de aptossomo iniciador ^(21, 25).

Neste ambiente molecular, as caspases iniciadoras são ativadas e podem acionar diretamente as caspases executoras e/ou gerar sinais

bioquímicos que estimulam a via intrínseca da apoptose, que culminam na ativação da caspase 3 ⁽²⁴⁾.

Figura 2 - Via de ativação extrínseca da apoptose. Adaptado de Grivich et al. ⁽²¹⁾

2.2 Ciclo reprodutivo- suínos

Ciclo estral é um fenômeno rítmico observado em todos os mamíferos. Corresponde ao regular e limitado período de receptividade sexual que ocorre em intervalos característicos para cada espécie ⁽²⁷⁾. A fêmea suína é poliéstrica anual e apresenta ciclos (estros) com duração aproximada de 21 dias, com variação de 17 a 25 dias ⁽²⁸⁾.

As fases do ciclo estral em suínos são: proestro, estro (cio), metaestro e diestro. No proestro, há regressão do corpo lúteo do ciclo anterior e ocorre a maturação de um ou mais folículos; a duração é de dois dias. As manifestações físicas incluem vulva edemaciada e hiperemiada, apetite diminuído, secreção vulvar abundante e cristalina, inquietação, saltos sobre as companheiras e reflexo de tolerância ao macho negativo ⁽²⁹⁾. O estro ou cio ocorre no final da fase folicular, dura 2 a 3 dias e caracteriza-se por edema e hiperemia de vulva, secreção vaginal abundante e mucoide, o apetite começa a se normalizar, deixa-se saltar pelas companheiras, reflexo de tolerância ao macho positivo (aceita ser montada pelo macho), reflexo de tolerância ao homem positivo (aceita pressão lombar pelo homem) e, sobretudo, imobilidade com arqueamento. No metaestro, há o desenvolvimento do corpo lúteo, a fase dura 3 a 4 dias e as manifestações são vulva sem tumefação, diminuição da secreção vaginal, apetite normal, comportamento tranquilo e reflexo de tolerância ao macho negativo. O diestro é o período entre os cios, com duração de 15 dias e ausência de excitação sexual, com fêmea tranquila, órgãos genitais externos e cornos uterinos relaxados ⁽²⁹⁾.

Fisiologicamente, durante as fases de proestro e estro (fase folicular) há recrutamento de, aproximadamente, 10-20 folículos ovarianos que atingem tamanho pré-ovulatório (8-11 mm), sob ação do FSH. A ovulação ocorre 36-40 horas após um pico de LH, em geral no terço final do estro, o que corresponde a, aproximadamente, 40 horas após o início do reflexo de tolerância ao macho ⁽³⁰⁾. Após a ovulação, no ovário, forma-se o corpo

hemorrágico e 6-8 dias após, o corpo lúteo, uma massa de células luteinizadas com diâmetro de 8-11 mm. Não havendo fecundação, haverá formação do corpo albicante.

2.2.1 Indução e sincronização do cio em suínos

A variabilidade da duração de cada fase e do momento de ocorrência da ovulação é um estímulo a inúmeras pesquisas sobre indução e sincronização do cio em porcas, para estudos e inseminação artificial. Os métodos utilizados podem ser naturais ou artificiais. Dentre os naturais, pode-se citar estresse por mudança de ambiente, transporte, reagrupamento de fêmeas, jejum e presença de macho vasectomizado ⁽²⁹⁾. Os métodos artificiais baseiam-se na administração de hormônios, como gonadotrofinas, estrogênios e progestagênios.

Na prática de suinocultura, é bastante utilizado o método da aplicação de progestagênios (altrenogest, Regumate [®]). Nesse método, o progestagênio é administrado na ração por 18 dias e, 5 dias após, mais de 85% das fêmeas apresentam ovulação ⁽²⁹⁾. O altrenogest é comercializado como Regumate [®] solução 0,22%, contendo o referido progestagênio, cujo nome químico é 17 α -alil-17 β -hidroxiestra-4,9,11-trien-3-one, fórmula C₂₁H₂₆O₂ (Figura 3). O uso continuado deste progestagênio sintético leva a supressão do estro, permitindo previsível ocorrência de estro, após a suspensão da droga. A ovulação ocorre por efeito rebote, em mais de 85% das fêmeas, 5 dias após a suspensão do altrenogest ⁽³¹⁾.

Figura 3 - Estrutura química do altrenogest

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade e a qualidade do transplante autólogo de ovário em porcas, a fresco e após criopreservação, no tecido celular subcutâneo e na região intraperitoneal peri-infundibular.

3.2 Objetivos Específicos

- 1 Analisar os aspectos morfológicos e histomorfométricos do tecido ovariano transplantado;
- 2 Quantificar a população folicular no tecido transplantado;
- 3 Investigar a ocorrência de apoptose nos tecidos transplantados, por meio da expressão imunoistoquímica de Bcl-2, Bax e Caspase 3-clivada.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-HCFMUSP, com o número 0862/09 (Anexo 1).

Foi também aprovado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa- IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein- HIAE, protocolo número 270-07, tendo sido realizada a acomodação dos animais e experimentos cirúrgicos nas dependências do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia - CETEC, da instituição.

Todos os procedimentos respeitaram as normas vigentes de respeito à ética e ao bem estar dos animais (Anexo 2). Na instituição, onde os animais foram acomodados, submetidos aos procedimentos e sacrificados, há regimento interno do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA, que segue os padrões internacionais e normas nacionais na pesquisa com animais.

4.1 Locais

Os animais foram acomodados e operados no Centro de Treinamento e Experimentação em Cirurgia - CETEC do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa - IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein. O material coletado foi preparado e armazenado no mesmo local.

Os procedimentos prévios para definição do protocolo de congelação foram realizados na Clínica Huntington Medicina Reprodutiva em São Paulo - SP.

As lâminas foram preparadas, analisadas, fotografadas e interpretadas na Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP e no Laboratório de Investigação Médica (LIM-58) da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A padronização da técnica imunoistoquímica foi efetuada no Setor de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A fabricação dos anticorpos a serem utilizados, as reações de imunoistoquímica, bem como a documentação fotográfica e a respectiva análise foram feitas na empresa IMUNY Biotechnology, em Campinas, São Paulo.

4.2 Animais de experimentação

Quarenta fêmeas da espécie suína (*Sus escropha*), raça minipig.br1, procedentes da empresa Minipig, Pesquisa & Desenvolvimento Ltda, localizada na Fazenda Três Marias, município de Campina do Monte Alegre, Estado de São Paulo, foram utilizadas.

Os animais apresentavam idade entre 6 meses e 1 ano, peso médio de 24,5 quilogramas e ocorrência prévia de, pelo menos, um estro no ambiente da fazenda. Todos foram identificados com brincos de látex e acomodados nas baias do biotério do CETEC (Figura 4), em ciclos alternados de 12 horas-dia e 12 horas-noite, com higiene e ambientação adequadas e receberam água a livre demanda e alimentação com ração balanceada comercial, com teor proteico-calórico apropriado.

Após 3 dias de ambientação, os animais iniciaram o uso de progesterona sintética para a sincronização do ciclo, como será descrito a seguir e foram submetidos aos procedimentos, de acordo com o grupo a que pertenciam.

Figura 4 - Fotografia da baia de acomodação dos animais no Centro de Treinamento e Experimentação em Cirurgia- CETEC do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa - IIEP do Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE

4.3 Grupos de estudo

Para o presente estudo, os animais foram divididos em cinco grupos (Quadro 1), com oito animais cada, distribuídos aleatoriamente, sem prévia seleção:

- Grupo I: Grupo controle (Gc) - animais nos quais foi realizada ooforectomia bilateral por videolaparoscopia;
- Grupo II: Grupo Transplante a Fresco Subcutâneo (TFSC) - neste grupo, realizou-se ooforectomia bilateral por videolaparoscopia, com posterior transplante autólogo de tecido ovariano fresco, fatiado (fatias corticais de 2 mm), em tecido celular subcutâneo da região inguinal, no mesmo ato cirúrgico;
- Grupo III: Grupo Transplante a Fresco Intraperitoneal (TFIP) - realizou-se ooforectomia bilateral por videolaparoscopia, com posterior transplante autólogo de tecido ovariano fresco, fatiado (fatias de 2 mm), em localização intraperitoneal peri-infundibular, no mesmo ato cirúrgico;
- Grupo IV: Grupo Transplante Criopreservado Subcutâneo (TCSC) - neste grupo, realizou-se ooforectomia bilateral por videolaparoscopia, com posterior transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado (protocolo de congelação lenta), mantido em nitrogênio líquido por 7 dias e, após esse período, implantado em tecido subcutâneo da região inguinal.
- Grupo V: Grupo Transplante Criopreservado Intraperitoneal (TCIP) - neste grupo, realizou-se ooforectomia bilateral por videolaparoscopia, com posterior transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado (protocolo de congelação lenta), mantido em nitrogênio líquido por 7 dias e, após esse período, implantados em região intraperitoneal peri-infundibular do ovário.

Quadro 1 - Grupos de Estudo

Grupo	Ooforectomia Bilateral	Ovários	Conservação	Transplante	Reimplante (tempo)
I	Realizada	Fatiados	Não	Não	-
II	Realizada	Fatiados	Não	Fresco, em subcutâneo	Imediato
III	Realizada	Fatiados	Não	Fresco, intraperitoneal	Imediato
IV	Realizada	Fatiados	Congelação lenta	Criopreservado, subcutâneo	Após 7 dias
V	Realizada	Fatiados	Congelação lenta	Criopreservado, intraperitoneal	Após 7 dias

4.4 Anestesia

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados. Para a sedação inicial, utilizou-se Dormonid®, 15 mg/Kg, por via intramuscular e Acepromazina a 1% 01 ml, por via intramuscular. Na anestesia, usou-se Tionembutal, 0,5 mg (25 mg/Kg), por via endovenosa. Procedeu-se a intubação com sonda orotraqueal número 6,5, com “cuff”, e manutenção anestésica com Isoflurane® 0,5% e oxigênio 1,5 litros por minuto, durante todo o procedimento cirúrgico. Foram utilizados aparelhos de anestesia marca Takaoka Origami Ergo®. Os animais permaneceram controlados em monitores portais não invasivos da marca Dixtal® DX 2021, para controle de pressão arterial média, frequência cardíaca, saturação de oxigênio e capnografia. Colheu-se sangue para gasometria pré e pós-

operatória de controle em aparelho Radiometer Copenhagen ABL 700 Series.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal em mesa cirúrgica, com fixação das patas traseiras. Realizou-se assepsia e antissepsia com clorexidina alcoólica na região abdominal e pélvica e colocação de campos cirúrgicos estéreis. A equipe cirúrgica fez os procedimentos padrões de lavagem das mãos, antissepsia e paramentação.

4.5 Sincronização do ciclo estral

Para garantir que os animais estivessem na mesma fase estral, realizou-se a sincronização do ciclo com o uso de progestagênio (altrenogest - Regumate[®], Intervet do Brasil), por via oral, por 18 dias, com o intuito de bloquear o crescimento folicular e colocar todos na mesma fase do ciclo. Dentre todas as opções de sincronização por meio de tratamento hormonal, a que melhor resultado apresenta, com boa relação custo-benefício, é o uso deste progestagênio, que deve ser empregado em leitoas já cíclicas (com atividade ovariana), podendo ser iniciado em qualquer fase do ciclo estral, o que já representa grande vantagem sobre outras opções ⁽³²⁾. A prostaglandina F, por exemplo, só atua na lise de corpos lúteos responsivos, ou seja, no mínimo 12 dias após a ovulação, o que a torna sem vantagens na rotina de sincronização ⁽³²⁾.

Os procedimentos laparoscópicos iniciais e as avaliações funcionais e histológicas, após o transplante foram realizados 5 dias após o último dia de ingestão do progestagênio. Na literatura específica para o uso do altrenogest (progestagênio) em “*minipigs*”, a taxa de ovulação com este esquema é superior a 80% ^(33, 34).

O início do uso do progestagênio após a ooforectomia foi 7 dias após o transplante, por ser o tempo hábil descrito para a revascularização ⁽³⁵⁾.

4.6 Ooforectomia

Os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos videolaparoscópicos em equipamento Stryker® Endoscopy. Para a ooforectomia bilateral por via laparoscópica, realizou-se a identificação, pinçamento, cauterização e secção do pedículo ovariano e do ligamento útero-ovário.

As ligaduras foram realizadas com sistema bipolar para selagem de vasos Ligasure®. Durante e, imediatamente, após os procedimentos cirúrgicos, foi feita antibioticoterapia profilática por tratar-se de experimento de longo prazo, com Flotril® 2,5% (1 ml/10 Kg), por via intramuscular, em dose única diária, durante 4 dias. A analgesia intra e pós-operatória foi realizada com Tramal® injetável 2 ml, por via intramuscular, em dose única. Após a cirurgia, os animais foram higienizados e limpos, diariamente, com banho em solução HIG-MED High (dietalonamina de ácido 12

hidroxiesteárico; digluconato de clorexidina). As feridas operatórias foram borrifadas com Bactrovet® Prata AM , 250 mg/250 ml, três vezes ao dia (König, Germany) ^(34,35,36). Durante o experimento, os animais foram observados diariamente para controle de frequência cardíaca e temperatura. O útero foi mantido em todos os grupos.

4.7 Preparo dos fragmentos de ovário

Depois de retirado, o tecido ovariano foi dissecado, separando-se a região cortical da medular. A porção cortical foi cortada em fatias de, aproximadamente, 2 mm x 4 mm x 4 mm de espessura, sob condições estéreis. As fatias não excediam 2 mm de espessura, para facilitar a ação dos crioprotetores e diminuir o potencial dano celular e, no caso do reimplante a fresco, facilitar a neovascularização.

Os ovários foram coletados e a região cortical dissecada do tecido adjacente e da região medular à temperatura ambiente, em meio de Leibovitz L-15, suplementado com albumina sérica bovina a 0,1% (BSA), em ambiente estéril. As fatias de córtex ovariano foram então armazenadas (GI), transplantadas a fresco (GII e GIII) ou submetidas a processo de congelação lenta (GIV e GV).

4.8 Criopreservação

No protocolo de congelação, o processo de congelação lenta, modificado de Gosden ⁽³⁶⁾ foi usado. O ovário retirado do animal foi colocado inteiro em Placa de Petri previamente resfriada em geladeira, contendo crioprotetor; as fatias ovarianas foram dissecadas do tecido adjacente e o córtex dissecado da região medular em meio contendo um crioprotetor (Leibovitz L-15), albumina sérica bovina a 0,1% (BSA), soro (5% a 10%) e 0,1 mol/ml de sacarose/manitol. Os fragmentos foram colocados em criotubos –tubos para criogenia- (*Cryogenic vial: CORNING self-standing O-ring internal thread, marking spot*) de 1,2 ml com DMSO 1,5 molar como crioprotetor e, então, os tubos foram fechados, identificados com caneta para criogenia (Sigma-Aldrich) e colocados em freezer com taxas programáveis (*Cryobath, CL-8800, Cryogenesis Software, Freezer Control*).

A sequência de congelação lenta em *cryobath* foi a seguinte: as fatias ovarianas foram colocadas em um freezer, automaticamente programado, no início, a zero grau Celsius. Posteriormente, o tecido foi congelado diminuindo a temperatura em 2°C/minuto até -7°C. Nesse ponto, a cristalização extracelular (“*seeding*”) foi induzida manualmente, tocando a parte externa do vial com fórcepe previamente colocado no nitrogênio líquido. O tecido ovariano, então, foi congelado a 0,3°C/ minuto, até -40°C. Depois, o tecido ovariano foi congelado na velocidade de 10° C/min. até -140°C. Todo o tecido foi transferido para galões com nitrogênio líquido a -196°C.

Figura 5 - Procedimento de congelação das fatias de tecido cortical ovariano. Detalhe da solução de crioprotetor utilizada no experimento

Figura 6 - Fotografia do freezer de congelação lenta com taxas programáveis (CL-8800, Cryogenesis software, Freezer Control), utilizado na criopreservação dos ovários

4.9 Descongelção

Para a descongelção, os tubos de criopreservação foram retirados do nitrogênio líquido, colocados em temperatura ambiente por 40 segundos (Figura 7) e, então, imersos em banho-maria a 37°C (Figura 8) por 2 minutos, até que todo o gelo estivesse derretido. Os fragmentos corticais de ovário foram retirados dos tubos de criopreservação e submetidos a lavagens sucessivas em PBS suplementado com 1.000 mg / l D-glicose e 36 mg / l piruvato (Gibco) em temperatura ambiente e lavados sete vezes (1 min cada lavagem) para remover o agente crioprotetor. Os tecidos ovarianos foram mantidos em PBS até a implantação ⁽¹⁶⁾.

Figura 7 - Fotografia da primeira etapa da descongelação dos fragmentos de ovário, com exposição à temperatura ambiente por 40 segundos

Figura 8 - Fotografia da segunda etapa da descongelação dos fragmentos de ovário, com banho-maria com temperatura controlada em 37°C

4.10 Transplante a fresco subcutâneo

Na realização do transplante autólogo em região subcutânea, optou-se pelo local da prega da virilha, recomendado pelos veterinários por ser local de fácil acesso médico e difícil lesão pelo próprio animal ou companheiros de gaiola ⁽³⁰⁾. Além disso, a incisão nessa região tem apresentação favorecida pela posição para a laparoscopia. Uma vez dissecado o sítio (Figura 9), foram colocadas as fatias de tecido ovariano, de acordo com a especificação do grupo, com fechamento da região subdérmica com vycril 3.0 e da pele com sutura de nylon 3.0 (Figuras 10 e 11).

Figura 9 - Fotografia do local de implante subcutâneo. Preparo do local

Figura 10 - Fotografia do local de implante subcutâneo. Preparo do local

Figura 11 - Fotografia do local de implante subcutâneo. Pós-operatório imediato

4.11 Transplante a fresco intraperitoneal

O animal foi posicionado em decúbito dorsal horizontal, com fixação das patas dianteiras e traseiras. Realizaram-se assepsia, antissepsia e colocação de campos estéreis. Após incisão longitudinal de 1,0 cm na região umbilical e passagem da agulha de Veres, foram realizados os testes de segurança da localização da agulha de Veres: aspiração, colocação de uma gota de soro fisiológico e verificação da pressão menor que 4 milímetros de mercúrio (mmHg). Após testes de segurança, foram realizados o pneumoperitônio até 18 mmHg e a passagem de trocarte umbilical de 10 mm e feita a passagem da óptica pelo trocarte umbilical. O sítio intraperitoneal utilizado foi em abertura da dobra de peritônio parietal próximo às tubas uterinas: as fatias de tecido ovariano foram fixadas à tela de Surgicell® com suturas de vycril 4.0 (Figura 12), e a tela foi fixada com sutura de vycril 3.0 ao peritônio parietal à esquerda do animal, próximo à tuba uterina (Figura 13).

A literatura ressalta os dois principais desafios da reimplantação do tecido ovariano: o desenvolvimento de técnicas com menor destruição e a minimização do tempo de isquemia ⁽⁹⁾.

Figura 12 - Fotografia da técnica de implante intraperitoneal. Detalhe da fixação na tela de Surgicell®

Figura 13 - Fotografia do local de implante intraperitoneal. Aspecto inicial

4.12 Transplante criopreservado subcutâneo

Após a descongelação realizada como descrito anteriormente, o transplante foi efetuado com técnica semelhante à do transplante a fresco subcutâneo.

4.13 Transplante criopreservado intraperitoneal

Após a descongelação, realizada como descrito anteriormente, foi executado com técnica similar à do transplante a fresco intraperitoneal.

4.14 Protocolo por grupos

O protocolo adotado nos animais do Grupo I - Grupo controle (Gc) foi o seguinte: após a ambientação no CETEC, os animais receberam Regumate[®] por 18 dias e, respeitado o intervalo de 5 dias (27º dia), realizou-se a primeira cirurgia - ooforectomia bilateral. Os ovários retirados foram submetidos à dissecação, exame histológico e depois conservados. Após intervalo de 7 dias para recuperação, repetiu-se o esquema de 18 dias de Regumate[®] e 5 dias de intervalo, e os animais, então, foram sacrificados no 58º dia.

No Grupo II - Grupo Transplante a Fresco Subcutâneo (TFSC), a sincronização do ciclo procedeu-se da mesma forma. No 27º dia, realizou-se a ooforectomia bilateral videolaparoscópica, fatiamento do tecido ovariano (média de 2 mm) e transplante dessas fatias na região subcutânea (prega inguinal). Aguardou-se o período de 7 dias para recuperação do procedimento cirúrgico. Para avaliação na mesma fase do ciclo, as porcas receberam novamente 18 dias de altrenogest via oral e, após 5 dias (fase estral), foram submetidas a segunda cirurgia com biópsia dos implantes e reavaliação (58º dia).

O procedimento no Grupo III - Grupo Transplante a Fresco Intraperitoneal (TFIP) foi semelhante ao do Grupo II. Após a sincronização do ciclo estral, procedeu-se à ooforectomia videolaparoscópica bilateral no 27º dia, fatiamento do tecido ovariano cortical (média de 2 mm de espessura) e transplante das fatias na região peri-infundibular do ovário, em janela peritoneal. Aguardou-se o período de 7 dias para recuperação do procedimento cirúrgico. Para avaliação na mesma fase do ciclo, as porcas receberam novamente 18 dias de altrenogest®, por via oral e, após 5 dias (fase estral), foram submetidas a segunda cirurgia com biópsia dos implantes e reavaliação (58º dia).

No Grupo IV - Grupo Transplante Criopreservado Subcutâneo (TCSC), após o recebimento dos animais, realizou-se a sincronização do ciclo estral a ingestão de altrenogest (Progesterona, Regumate®) por 18 dias. Depois de 5 dias, na fase estral, foi feita a cirurgia videolaparoscópica com ooforectomia bilateral, fatiamento do tecido cortical ovariano (média de

2 mm de espessura) e congelamento dessas fatias pelo protocolo de congelação lenta. As fatias de córtex ovariano foram mantidas em nitrogênio líquido por 7 dias, coincidindo com o tempo padronizado para a recuperação do procedimento cirúrgico. Nova cirurgia foi realizada, após esse período, com colocação das fatias de tecido ovariano no sítio subcutâneo, após descongelação. Para fins de padronização, também foi dado intervalo de 7 dias após este procedimento e, para avaliação na mesma fase do ciclo, as porcas receberam novamente 18 dias de altrenogest, por via oral e, após 5 dias, foram submetidas a segunda cirurgia com biópsia dos implantes e reavaliação (66º dia).

No Grupo V - Grupo Transplante Criopreservado Intraperitoneal (TCIP). Inicialmente, realizou-se a sincronização do ciclo estral à ingestão de altrenogest (Progesterona, Regumate[®]) por 18 dias. Após 5 dias, fase estral, foi feita a cirurgia videolaparoscópica com ooforectomia bilateral, fatiamento do tecido cortical ovariano (média de 2 mm de espessura) e congelamento dessas fatias pelo protocolo de congelação lento. As fatias de córtex ovariano foram mantidas em nitrogênio líquido por 7 dias, coincidindo com o tempo padronizado para recuperação do procedimento cirúrgico. Após esse período, nova cirurgia foi realizada com colocação das fatias de tecido ovariano em região intraperitoneal próxima ao infundíbulo pélvico, após descongelação. Para fins de padronização, também foi dado intervalo de 7 dias após este procedimento e, para avaliação na mesma fase do ciclo, as porcas receberam novamente 18 dias de altrenogest, por via oral e, após 5

dias, foram submetidas a segunda cirurgia com biópsia dos implantes e reavaliação (66º dia).

4.15 Análise Histomorfológica

Os tecidos retirados foram armazenados em formol e, para preparação histológica, transferidos para álcool etanol a 70% e armazenados em temperatura ambiente até o processamento. Os tecidos fixados foram incluídos em parafina e seccionados em fragmentos de 4 micrômetros de espessura. Uma lâmina representativa do implante ovariano ou da ooforectomia de cada animal foi preparada e corada por técnica habitual de hematoxilina e eosina; as demais foram destinadas às análises imunoistoquímicas.

Realizou-se detalhada descrição histológica do tecido ovariano de cada animal, caracterizando os grupos com base nos aspectos do epitélio germinativo, córtex e estroma.

4.16 Análise Histomorfométrica

As lâminas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina foram utilizadas para avaliação da qualidade e densidade folicular dos implantes de tecido ovariano, bem como dos aspectos gerais de organização do tecido e

vascularização. A contagem de folículos e classificação obedeceu a critérios da literatura estabelecidos por Israely et al., em 2006 ⁽¹¹⁾ e por Maciel et al., em 2004 ⁽³⁷⁾.

Os folículos ovarianos foram classificados em três categorias: folículos primordiais, folículos em crescimento pré-antrais e folículos antrais; foram contados também os corpos lúteos e os corpos albicantes.

Considerou-se folículo primordial (*nongrowing*), o que apresentava apenas oócito e uma camada de células pavimentosas achatadas ⁽³⁷⁻³⁹⁾. Os folículos em crescimento pré-antrais eram todos os posteriores ao primordial e sem formação de antro, incluídos os primários, com oócito e uma camada única de células pavimentosas cuboides; os secundários, com oócito e duas a oito camadas de células da granulosa, sem cavidade antral, e os terciários, com mais de 8 camadas de células da granulosa e sem cavidade antral ^(37, 40). Quando, em razão da posição do corte histológico, não foi possível identificar o oócito, mas, apenas as camadas de células da granulosa sem antro, os folículos foram categorizados como pré-antrais não classificados. Os folículos com cavidade antral, independente de seu tamanho, foram considerados folículos em desenvolvimento antrais ⁽³⁷⁾. O corpo lúteo era o que apresentava células lúteas características, com núcleo volumoso e vasos na periferia ^(38, 41). Corpo albicante foi considerado como o tecido hialino amorfo resultante da degeneração do corpo lúteo ⁽⁴²⁾.

As contagens foliculares foram realizadas na totalidade das lâminas com Contador Manual de Volumes com oito teclas, modelo "Digitimer" com totalizador e confirmadas em amostras aleatórias de cada grupo em

programa de imagem computadorizado. A captura e as medições foram realizadas em microscópio de luz (Carl Zeiss), acoplado à câmera de alta resolução (Axio Cam MRC da Carl Zeiss) e monitor de vídeo colorido. Utilizou-se o programa de análise de imagens AxionVision REL 4.6 da Carl Zeiss.

4.17 Análise imunoistoquímica

Inicialmente, os cortes histológicos de 5 μ m foram submetidos à desparafinização em série de xilol e álcool, com posterior recuperação dos sítios antigênicos em vapor fluente (panela de valor) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos em agitador com tampão Tris Salino 0,1M, pH 7.5 (TBS) e, posteriormente, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito por imersão em peróxido de hidrogênio a 1%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em TBS (2x, 5 minutos) e o bloqueio dos sítios não específicos foi realizado com soro normal de cabra diluído em Tampão Fosfato Salino 0,2M, pH 7,4 (PBS). Após incubação “*overnight*” a 4° C em câmara escura com os anticorpos primários anti-Bcl-2 (monoclonal) e anti-Bax e anti-caspase-3-clivada (policlonais) (IMUNY Biotechnology, Campinas, Brasil), diluídos 1:400 em PBS, as amostras foram submetidas a repetidas lavagens em TBS contendo 0,1% de “Tween” 20 e, em seguida, incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo

conjugado com biotina na diluição de 1:400 para o anticorpo anti-Bcl-2, e com anti-IgG de coelho conjugado com biotina na diluição de 1:400 para os anticorpos anti-Bax e antiCaspase-3-clivada. Posteriormente, incubados com reagente AB (complexo avidina-biotina) por 30 minutos, à temperatura ambiente (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA, USA), e revelados com DAB (Sigma Chemical Co, Saint Louis MO, USA) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os cortes foram então corados com solução de hematoxilina.

A imunoexpressão foi avaliada usando ocular com aumento de 10x e objetiva de 40X acopladas ao microscópio ótico (Nikon Eclipse E200). A análise da quantidade relativa de perfis celulares por área foi obtida pela análise de dez campos distintos de cada animal (oito animais por grupo).

Os dados de imunoistoquímica foram avaliados com o software de captura de imagem Image Pro Plus e o de análise ImageJ Plus.

4.18 Análise Estatística

A pesquisa realizada foi do tipo experimental, controlada, prospectiva em animais de médio porte (raça suína), acompanhados por período variável entre 56 e 67 dias para sincronização do ciclo estral e realização dos procedimentos cirúrgicos.

Por tratar-se de procedimento experimental e piloto, o tamanho da amostra foi calculado baseado nas informações obtidas em publicações

prévias e em estudo inicial com cinco animais para determinação das técnicas cirúrgicas, viabilidade do mesmo e orientado pelo Teorema Central dos Limites, assim, qualquer que seja a forma da distribuição original, suas médias resultarão em uma distribuição normal e, para encontrarmos a distribuição da média, basta conhecermos a média da população e o desvio-padrão. Estes dogmas são aplicáveis para grupos com cinco elementos ou mais ⁽⁴³⁾.

Para avaliação dos dados de histomorfologia e da intensidade da expressão imunoistoquímica, os dados foram expressos em média e desvio padrão.

4.19 Análise Inferencial

Para os dados de histomorfometria, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn para avaliar as diferenças entre os grupos. Na análise da imunoexpressão do Bcl-2, Bax e Caspase 3-clivada foram usados o ANOVA e a avaliação transversal intergrupo pelo Teste de Tukey. Fixou-se o valor de $\alpha < 5\%$, como significativo. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism, versão 5.0.

5.1.1 Histomorfológicos

GI - Grupo controle – O ovário apresenta-se revestido por epitélio cúbico ou cilíndrico simples, e é formado por duas regiões bem delimitadas: a medular e a cortical. Na região cortical, foram observados inúmeros folículos ovarianos em todas as fases de desenvolvimento, predominando os folículos primordiais organizados em “*clusters*” (Figura 14). Nesta região, havia ainda folículos ovarianos pré-antrais em vários estágios do desenvolvimento e alguns folículos antrais (Figura 15), e a maioria destes últimos continha infiltrado leucocitário e desarranjo da teca externa. Alguns corpos albicantes e alguns corpos lúteos, bem volumosos, com intensa vascularização foram notados (Figuras 16 e 17). A região medular mostrou-se rica em vasos sanguíneos e tecido conjuntivo bem organizado.

Figura 14 - Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar inúmeros folículos primordiais formando “clusters”. H.E.

Figura 15 - Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar folículo maduro com ovócito no seu interior (seta) e folículo degenerado (*). H.E.

Figura 16 - Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar parte de corpo lúteo (*). H.E.

Figura 17 - Fotomicrografia mostrando parte da região cortical de ovário de porca. Notar parte de corpo albicante (*). H.E.

5.2 Grupos Experimentais

GII - Transplante a fresco subcutâneo. Neste grupo, notou-se que os fragmentos do ovário encontravam-se íntegros, identificando-se a região periférica com vasos e tecido conjuntivo adjacentes e outra, em contato com a derme, rica em vasos sanguíneos. A morfologia da região periférica é muito parecida com a região cortical do grupo controle, ou seja, identificaram-se oócitos formando “*clusters*” e folículos ovarianos em várias fases de desenvolvimento (Figuras 18 e 19). Neste grupo, a presença de vasos sanguíneos de grosso calibre ao redor dos corpos lúteos e dos corpos albicantes chama a atenção (Figuras 20 e 21).

Figura 18 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região subcutânea. Notar folículos ovarianos em vários estágios do desenvolvimento. H.E.

Figura 19 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região subcutânea. Notar inúmeros folículos ovarianos primordiais formando “Clusters”. H.E.

Figura 20 - Fotomicrografia mostrando parte de corpo lúteo de ovário de porca implantado a fresco em região subcutânea. Notar vasos de grande calibre na porção periférica. H.E.

Figura 21 - Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante de ovário de porca implantado a fresco na região subcutânea. Notar vasos de grande calibre na porção periférica. H.E.

GIII - Transplante a fresco intraperitoneal - A histologia dos ovários deste grupo mostrou-se muito parecida com a do grupo de transplante ovariano a fresco no subcutâneo; no entanto, foi observada menor concentração de folículos primordiais (Figura 22) e maior concentração de folículos atrésicos ou albicantes (Figuras 23 e 24).

Figura 22 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca implantado a fresco em região intraperitoneal. Notar folículos ovarianos primordiais, alguns formando “clusters” (setas). H.E.

Figura 23 - Fotomicrografia mostrando parte do ovário de porca implantado a fresco na região intraperitoneal. Notar a presença de folículos ovarianos primordiais (setas) e em crescimento na porção periférica (C). H.E.

Figura 24 - Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante (*) de ovário de porca implantado a fresco em região intraperitoneal. H.E.

GIV - Transplante congelado subcutâneo- Neste grupo, os fragmentos dos ovários encontravam-se íntegros, identificando-se uma região periférica contendo vasos sanguíneos e tecido conjuntivo adjacentes (Figura 25). Na região periférica, notou-se a presença de alguns “*clusters*” contendo poucos folículos ovarianos primordiais (Figuras 25 e 26). É comum a presença de células arranjadas de forma concêntrica no estroma ovariano. Verificou-se, ainda, a presença de corpos lúteos, alguns contendo área central mais clara, ao lado de corpos albicantes (Figuras 27 e 28).

Figura 25 - Fotomicrografia mostrando porção periférica de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar no estroma ovariano áreas de células arranjadas de forma concêntrica (setas) e folículos ovarianos primordiais.(*) H.E.

Figura 26 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar área contendo folículos ovarianos em várias fases do desenvolvimento. H.E.

Figura 27 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado implantado na região subcutânea. Notar área contendo folículo ovariano em crescimento. H.E.

Figura 28 - Fotomicrografia mostrando parte de corpo lúteo de ovário de porca congelado e implantado na região subcutânea. Notar área central mais clara no centro do corpo lúteo (*). H.E.

GV - Transplante congelado peritoneal - Neste grupo, os fragmentos de ovário também se encontravam íntegros, identificando-se uma porção mais periférica com inúmeros vasos sanguíneos e tecido conjuntivo adjacente. Na região periférica, identificaram-se folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento (Figura 29). Havia alguns folículos primordiais localizados entre as células do tecido conjuntivo que, em alguns locais, estavam arranjadas de forma concêntrica. Raros “*clusters*” ou aglomerados podem ser observados, além disso, contêm menor concentração de folículos ovarianos primordiais (Figura 30). Observaram-se alguns corpos lúteos na região bem periférica, com área central fibrosada mais clara. Na região de contato com o peritônio, observaram-se alguns corpos albicantes no meio do tecido conjuntivo adjacente (Figuras 31 e 32).

Figura 29 - Fotomicrografia mostrando porção periférica de ovário de porca congelado implantado na região intraperitoneal. Notar no estroma ovariano áreas de células arranjadas de forma concêntrica (setas), raros folículos primordiais (*) e um corpo albicante (A). H.E.

Figura 30 - Fotomicrografia mostrando parte de ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar a presença de alguns folículos primordiais (*), um folículo em crescimento (F) e um corpo albicante (CA). H.E.

Figura 31 - Fotomicrografia mostrando parte de corpo albicante (*) de ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar na área periférica vasos sanguíneos de grosso calibre. H.E.

Figura 32 - Fotomicrografia mostrando parte do ovário de porca congelado e implantado em região intraperitoneal. Notar folículos ovarianos em crescimento (*) e alguns folículos primordiais (setas). H.E.

5.2 Histomorfométricos

Os dados das contagens dos folículos ovarianos encontram-se expressos na Tabela 1. Com o uso do teste de Kruskal-Wallis, comparou-se a distribuição por tipo de folículos nos grupos e não houve diferença na distribuição de folículos primordiais ($p=0,96$), folículos primários ($p=0,7$), folículos secundários ($p=0,99$), folículos terciários ($p=0,74$), folículos em crescimento não classificados ($p=0,89$), folículos antrais degenerados ($p=0,14$), corpos lúteos ($p=0,20$) e corpos albicantes ($p=0,98$). Houve diferença na distribuição dos folículos antrais não degenerados ($p=0,044$), com diferença dos grupos IV e V (criopreservados) em relação ao grupo I.

Tabela 1 - Histomorfometria do ovário de porcas (Minipig) nos grupos estudados

	GI (M±DP)	GII (M±DP)	GIII (M±DP)	GIV (M±DP)	GV (M±DP)
Primordiais	388,17±508,53	440,88±431,28	442,21±49,80	376,81±164,78	317,63±168,66
Primários	19,50±15,46	18,38±13,64	16,74±2,68	14,40±6,11	11,99±6,22
Secundários	10,33±18,53	12,75±13,29	13,73±3,45	12,01±4,97	10,03±4,57
Terciários	3,25±3,30	4,38±3,66	3,65±0,52	3,13±1,34	2,78±1,51
NC	18,17±25,39	27,25±29,43	25,06±4,88	21,70±9,06	19,56±10,17
Antrais bons	3,00±0,82	1,75±1,49	1,76±0,91	1,62±0,79 ^a	1,39±0,43 ^a
Antrais degenerados	11,67±5,43	8,13±4,94	7,54±3,09	6,80±3,00	5,58±2,24
Corpo lúteo	4,67±2,34	2,88±2,80	3,17±1,03	2,81±1,18	2,31±0,95
Albicantes	1,67±1,97	1,88±2,17	1,92±0,21	1,63±0,72	1,42±0,78
Total	458,17±567,20	516,88±478,49	505,18±47,98	428,98±190,32	361,30±195,26

Código: M = Média, DP = Desvio Padrão, NC=Não classificado
(a → p < 0,05 comparado com GI)

5.3 Imunoistoquímicos

5.3.1 Qualitativos

5.3.1.1 Bcl-2

Na avaliação qualitativa da imunoexpressão do Bcl-2, no grupo controle, observamos a ausência de marcação nos folículos e o estroma revelou-se levemente marcado, conforme se observa na Figura 33. No grupo II, houve marcação leve em alguns folículos, somente na teca externa e também no estroma (Figura 34). No grupo III, a marcação de folículos e do estroma apresentou-se intensa, com aparecimento de marcação na teca interna (Figura 35). No grupo IV, verificamos folículos marcados e folículos não marcados, além de clusters e estroma, todos com marcação leve a moderada (Figura 36). No grupo IV, houve marcação leve nos folículos e no estroma e, no Grupo V, evidenciamos reação interfolicular mais intensa, com células da teca interna marcadas em alguns folículos (Figura 37).

Figura 33 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica

Figura 34 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica

Figura 35 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco intraperitoneal. Notar a menor intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica

Figura 36 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica

Figura 37 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Imunoistoquímica

5.3.1.2 Bax

Na avaliação qualitativa da imunoexpressão do Bax, no grupo controle, observamos ausência de marcação no estroma, porém, as células foliculares mostravam-se marcadas levemente e houve moderada intensidade de coloração nos corpos lúteos que haviam sido previamente avaliados, à histologia, como tendo áreas de degeneração e/ou fibrose (Figura 38). No grupo II, o estroma também não revelou marcação, e a marcação de células foliculares externas foi moderada com mais folículos marcados em relação ao Grupo I (Figura 39). No grupo III, a marcação de folículos e do estroma foi moderada, inclusive na teca interna. Observou-se a presença de folículos marcados e não marcados, com predominância destes últimos (Figuras 40 e 41). No grupo IV, registramos mais folículos marcados em relação aos grupos anteriores e presença de marcação leve em clusters e no estroma (Figura 42). No grupo V, a reação interfolicular foi mais intensa, com células da teca interna marcadas em alguns folículos, além da presença de menor quantidade de folículos sem marcação (Figura 43).

Figura 38 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a intensidade da reatividade em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

Figura 39 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante ovariano a fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

Figura 40 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante a fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

Figura 41 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante a fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

Figura 42 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

Figura 43 - Fotomicrografia mostrando corte histológico do tecido ovariano de fêmea suína no grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Imunoistoquímica

5.3.1.3 Caspase 3-clivada

Na avaliação qualitativa da imunoexpressão da Caspase 3-clivada, no grupo controle, observamos ausência de marcação no estroma; nas células foliculares e em alguns corpos lúteos, a marcação foi leve (Figura 44). No grupo II, o estroma também se apresentou sem marcação, e a das células foliculares externas foi moderada (Figura 45). O aspecto geral era semelhante ao do grupo I, exceto pela maior intensidade de marcação de alguns corpos lúteos. No grupo III, a marcação de folículos apresentou-se moderada, com aparecimento de marcação na teca interna também e o estroma apresentou fraca coloração (Figura 46). No grupo IV (Figura 47), registramos folículos marcados e folículos não marcados, além de clusters e estroma, todos com marcação leve a moderada, sendo nitidamente mais fraca a intensidade da coloração do que no grupo III. No grupo V, também notamos folículos marcados e folículos não marcados, além de clusters e estroma, todos com marcação leve a moderada, aspecto bastante semelhante ao do grupo IV. A imunoexpressão da caspase 3-clivada no grupo V encontra-se representada na Figura 48.

Figura 44 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo controle. Notar a baixa intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica. 100x.

Figura 45 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica

Figura 46 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante fresco intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica

Figura 47 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado subcutâneo. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica

Figura 48 - Fotomicrografia mostrando cortes histológicos do tecido ovariano de fêmea suína pertencente ao grupo transplante criopreservado intraperitoneal. Notar a intensidade da reatividade, em marrom-acastanhado, nos folículos e no estroma, que corresponde à expressão da Caspase 3-clivada. Imunoistoquímica

5.3.2 Quantitativos

A imunoexpressão de Bcl-2, Bax e Caspase 3-clivada, além da relação Bcl-2/Bax foram avaliadas quantitativamente pelo software Image J Plus®, em intensidade por pixels, e os resultados encontram-se expressos nos dados da Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das médias e desvio - padrão da imunoexpressão de Bcl-2, Bax e caspase 3-clivada nos grupos estudados

	GI	GII	GIII	GIV	GV
Bcl-2	143,24±23,77 ^a	68,36±12,05	40,66±23,96	49,47±13,56	50,93±12,53
Bax	75,69±24,80	97,18±34,22 ^b	125,30±15,68 ^c	107,79±20,09	97,98±24,98
Bcl-2/Bax	2,17±1,11 ^a	0,77±0,27	0,32±0,17	0,38±0,22	0,45±0,32
Caspase 3-clivada	121,1±25,50	159,30±26,1	151,0±28,9	135,0±22,30	170,09±23,60 ^d

Código: M = Média, DP = Desvio-Padrão.
(a → p < 0,01 comparado com os grupos II, III, IV e V)
(b,c → p < 0,05 comparado com o grupo I)
(d → p < 0,01 comparado com o grupo I)

Existem várias situações clínicas, malignas e benignas, que colocam a preservação da fertilidade e da função ovariana em evidência e trazem diversos questionamentos. Em casos de neoplasias malignas, como por exemplo, osteossarcoma, câncer de mama, melanoma, sarcomas, cânceres ginecológicos, linfomas e leucemias, a conservação do tecido ovariano pode permitir a fertilidade no futuro e a restauração das funções endócrinas após o tratamento completo da neoplasia.

De forma semelhante, as funções hormonais e reprodutivas podem ser reassumidas em casos de afecções não malignas, como nas ooforectomias unilaterais ou bilaterais por tumores benignos de ovário, na endometriose severa, em pacientes com mutações dos genes BRCA1 e BRAC2 e naquelas com alto risco de ocorrência de câncer; no risco de falência ovariana prematura por síndrome de Turner ou outras síndromes genéticas; nos casos de história familiar; na imunossupressão em doenças autoimunes e nos casos de transplante de medula óssea, dentre outros^(5, 10). O aumento da sobrevida de pacientes com câncer torna esse tema ainda mais relevante e, indubitavelmente, a fertilidade e a reposição hormonal são importantes na qualidade de vida⁽⁴⁴⁾.

Apesar da maioria das publicações e experimentos priorizarem as pacientes oncológicas, calcula-se que, atualmente, aproximadamente 20%

das indicações de preservação da fertilidade são para mulheres com condições ou doenças não oncológicas ⁽⁵⁾.

Várias são as alternativas descritas para preservar a fertilidade, sobretudo em pacientes com câncer. Quanto à proteção medicamentosa, uns dos primeiros agentes utilizados foram os anticoncepcionais orais combinados, baseados na premissa de que as drogas citotóxicas atingem, sobretudo, os folículos em desenvolvimento e em maturação ⁽⁴⁴⁾.

Todavia, os resultados foram desanimadores, provavelmente, pela supressão gonadal incompleta e pela ação citotóxica nas diversas fases do desenvolvimento folicular. Da mesma forma, o uso de agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e da progesterona não mostraram resultados promissores na proteção gonadal, na inibição da atresia folicular ou na preservação da fertilidade ^(44, 45). Potencialmente, mas, ainda em fase de estudos, os inibidores da apoptose podem vir a se constituir em agentes medicamentosos protetores para a perda folicular e a falência ovariana prematura em pacientes expostas à quimioterapia ⁽⁴⁴⁾.

Por mais de três décadas, a transposição cirúrgica dos ovários foi estudada e utilizada como alternativa para a proteção ovariana dos efeitos imediatos e tardios da irradiação pélvica. Com a dose padrão utilizada na radioterapia pélvica para o tratamento do câncer de colo uterino, carcinoma anorretal, disgerminoma de ovário, linfoma de Hodgkin ou tumores do sistema nervoso central, a falência ovariana é usual, pois atinge os níveis de radiação indutores de dano ovariano, ou seja, a partir de 250 centigrays (cGy).

As técnicas utilizadas são variadas, desde a sutura dos ovários na região posterior do útero, mobilização lateral para fora da cavidade pélvica e transposição lateral com dissecação do ligamento útero-ovárico até a mobilização do ovário para as goteiras parietocólicas. Com estes procedimentos, há diminuição da dose de radiação no ovário, mas nem sempre o suficiente para evitar a lesão celular. Além disso, a injúria isquêmica pela alteração na vascularização também pode comprometer a função ovariana; há risco aumentado de cistos ovarianos sintomáticos e a estratégia tem resultados limitados em pacientes com mais de 40 anos ⁽⁴⁴⁾. Apesar dessas limitações, ainda é hoje uma das opções para a proteção ovariana nos casos em que há indicação de radioterapia pélvica.

Recentemente, estuda-se a possibilidade do emprego da criopreservação de oócitos, embriões e tecido ovariano. Os procedimentos já estabelecidos para a preservação da fertilidade, com boas taxas de sucesso, são a criopreservação de espermatozoides e a de embriões. A criopreservação de embriões é, de acordo com a Associação Americana de Medicina Reprodutiva (2005), o único método estabelecido para se preservar a fertilidade feminina; entretanto, deve estar de acordo com a legislação vigente em cada país (não é regulamentada no Brasil), requer paciente no período reprodutivo, disponibilidade de parceiro ou doador de sêmen e possibilidade de estimulação ovariana, antes do tratamento da condição de base ⁽⁴⁶⁾.

A criopreservação de oócitos, ao contrário da de espermatozoides, é de difícil execução. O principal fator que influencia os resultados é a alta

complexidade estrutural dos oócitos, pois há de se considerar e preservar as organelas subcelulares, os elementos do citoesqueleto e as funções da membrana plasmática para permitir, posteriormente, desenvolvimento e maturação adequados ⁽⁴⁴⁾. Além disso, ainda não está estabelecida a incidência de alterações genéticas, pois o fuso mitótico e os cromossomos podem ser afetados durante o procedimento ⁽⁴⁷⁾.

A criopreservação de oócitos pode, em teoria, ser utilizada em mulheres sem parceiro, cuja doença de base permita um ciclo de estimulação ovariana e captação de oócitos antes da terapêutica, por exemplo, de uma neoplasia. As taxas de sucesso com essa técnica vêm apresentando aumento considerável nos últimos 5 anos, com cerca de 1% - 2% predominantes nos estudos iniciais para os relatos atuais de mais de 20% de oócitos viáveis no descongelamento ⁽⁴⁷⁾.

A conservação de embriões é bastante discutida mundialmente e sem regulamentação ética definida. Em nosso país, há Projeto de Lei que visa a normatizar as técnicas de reprodução assistida. Estabelece punição para a congelção de embriões, com pena privativa da liberdade de 6 a 20 anos, e limita a coleta de oócitos para, apenas, três a quatro por ciclo de tratamento. Outros projetos em tramitação defendem o congelamento de embriões e divergem quanto ao número e condições para tal ⁽⁴⁷⁾. Essa discussão acentuou-se, em 2005, com a Lei de Biossegurança (Lei no 11.105, publicada em 28 de março de 2005), com as especificações das condições para uso de embriões congelados remanescentes de técnicas de reprodução

humana assistida para fins de pesquisa e terapia, sobretudo de células-tronco embrionárias ⁽⁴⁸⁾.

A criopreservação de tecido ovariano, ao que parece, é bastante promissora. É a única alternativa para crianças, na fase pré-puberal, e para mulheres que não podem retardar a quimioterapia ou não podem ser submetidas a estimulação do ciclo em programas de reprodução assistida ⁽⁹⁾. É um procedimento ainda experimental; para seu uso, é preciso proceder-se ao transplante autólogo ortotópico ou heterotópico do tecido ovariano ⁽⁵⁾.

As vantagens em relação à criopreservação de oócitos são a possibilidade de ser realizada sem estímulo ovariano, a proteção dos oócitos pelo tecido cortical ovariano e a abundância de oócitos em várias fases de desenvolvimento, inclusive folículos primordiais, menos suscetíveis aos danos provocados pela isquemia e criopreservação ^(47, 49).

Os folículos primordiais são mais resistentes à crioinjúria, pois o oócito em seu interior encontra-se em relativa inatividade de metabolismo, não apresenta os frágeis fusos meióticos, zona pelúcida e granulações corticais e tem tamanho reduzido, o que facilita a penetração e ação do crioprotetor ⁽¹⁰⁾.

Além disso, há a possibilidade de se restaurar a função hormonal, adicionalmente ao potencial reprodutivo ⁽⁴⁶⁾. Como desvantagem, e ainda temida, é a possibilidade de transmissão ou reimplante de células malignas ⁽⁴⁷⁾, sobretudo nas neoplasias hematológicas e nas que apresentam alto risco de metástase ovariana. A preocupação com a reintrodução de células malignas tem estimulado a utilização e o desenvolvimento de técnicas de

rastreamento de células cancerosas nos fragmentos de tecido ovariano, além de pesquisas no campo do xenotransplante ^(10, 13, 46).

Dentre as diversas técnicas utilizadas até o momento para a criopreservação do tecido ovariano em estudos experimentais e em humanos - fragmentos do córtex ovariano, ovário inteiro com ou sem pedículo vascular e preservação isolada dos folículos primordiais - o único procedimento que teve como resultado gestações a termo em humanos após transplante autólogo foi a criopreservação ou o transplante a fresco de fragmentos corticais do ovário sem pedículo vascular ^(10, 50, 51).

Na atualidade, as várias etapas envolvidas vêm sendo estudadas, como a retirada e preservação de tecido ovariano; as técnicas de criopreservação; o local apropriado para o reimplante e as formas para reduzir a perda folicular ⁽⁵²⁾. Aspecto interessante do transplante de ovário é que os estudos iniciais demonstram que ele pode ser implantado sob a forma de pequenos fragmentos corticais, prescindindo de anastomoses vasculares cirúrgicas ⁽¹¹⁾.

A hipótese vigente, atualmente, é de que há maior perda folicular em decorrência da isquemia sofrida durante o preparo e o transplante do que pelo eventual dano produzido pela criopreservação ^(11, 53).

O potencial de aplicação clínica do transplante autólogo de tecido ovariano vem aumentando rapidamente nos últimos 5 anos. Inicialmente utilizado em crianças e pacientes jovens com câncer, pelo comprometimento da fertilidade pelos tratamentos cirúrgico e/ou adjuvante, a preservação de tecido ovariano é hoje uma realidade em alguns centros norte-americanos e

europeus. Estes são reconhecidos como referência em tratamento da infertilidade e têm ampliado as indicações de preservação da fertilidade para doenças neoplásicas e não neoplásicas ^(9, 46), como se pode observar nos dados do Quadro 2.

Quadro 2 - Indicações atuais de preservação de tecido ovariano. Adaptado de Oktay ⁽⁹⁾

Câncer em crianças

Linfoma de Hodgkin
Linfoma não-Hodgkin
Sarcoma de Ewing
Tumor de Wilms
Neuroblastoma
Rabdomiossarcoma
Osteossarcoma pelvico

Câncer de mama

Subtipo histológico ductal e infiltrativo
Estádios I-III

Câncer de colo uterino

Doenças autoimunes

Doenças hematológicas tratadas com Quimioterapia ou Transplante de Medula Óssea

Cirurgia para tratamento de doenças ovarianas benignas

Endometriose
Tumores benignos

Pacientes que serão submetidas à Radioterapia pélvica

Tumores sólidos em órgãos pélvicos
Sarcoma de Ewing
Osteossarcoma
Tumores da medulla
Sarcoma retroperitoneal
Câncer de reto

Tumores ósseos benignos

Ooforectomia profilática

BRCA 1-2 positivo

Pacientes que serão submetidas à cirurgia ginecológica radical

Embora as alternativas hoje existentes de preservar a fertilidade em mulheres jovens sujeitas à perda da capacidade reprodutiva sejam consideradas boa prática médica, a retirada e a conservação de tecido ovariano ainda são consideradas procedimento experimental ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Várias dúvidas persistem quanto ao método com melhores e mais seguros resultados ⁽⁴⁶⁾: ainda é necessário estabelecer, com segurança, qual a diferença entre as técnicas mais relatadas; a viabilidade do transplante autólogo e heterólogo; a influência da criopreservação e do local de reimplante nas taxas de morte celular e qual a aplicabilidade, na espécie humana, das diversas técnicas e táticas descritas em estudos com animais de laboratório ⁽⁵⁷⁾.

O ponto crucial para a criopreservação é que os oócitos amadureçam e estejam aptos para a fertilização ⁽¹⁾. Fundamentalmente, há dois principais mecanismos de criopreservação de tecido biológico: congelação lenta clássica ou vitrificação por rápido resfriamento ⁽¹⁰⁾. Do ponto vista teórico, na técnica de congelação lenta, utiliza-se a velocidade de resfriamento pouco danosa para a célula, mas poderia produzir cristais de gelo extracelulares possivelmente maléficos para o tecido adjacente. Aplica-se, potencialmente, para se preservar células (por exemplo, espermatozoides) e camadas teciduais finas ⁽¹⁾.

Com a vitrificação, todas as soluções aquosas do tecido extracelular podem ser congeladas rapidamente, pela colocação imediata em nitrogênio líquido (-196 °C), prevenindo assim a formação de cristais de gelo ⁽⁵⁸⁾. Pode também causar dano celular. Teoricamente, estaria indicada para a

preservação de sistemas mais complexos, como, por exemplo, o ovário inteiro ^(55, 58, 59).

No método de congelação lenta, o córtex ovariano é isolado e cortado em fatias com espessura de, aproximadamente, 2 milímetros, o que permite a ação dos crioprotetores e assegura a preservação da maioria dos folículos primordiais ⁽¹⁾. Diferentes crioprotetores são utilizados, como dimetilsufóxido, 1,2-propanodiol e etilenoglicol, em associação com substâncias não permeáveis como sucrose e albumina sérica ⁽¹⁾. O método requer a utilização de freezer programável que, gradual e lentamente, resfrie o tecido ovariano até -40 °C, quando então os tubos podem ser transferidos para o armazenamento em nitrogênio líquido ⁽¹⁾.

Na técnica de vitrificação, o tecido é exposto a altas concentrações de crioprotetores permeáveis por alguns minutos, sendo então mergulhado diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C), o que induz um “estado semelhante a vidro” (“*glass-like state*”) nas células e impede a formação de cristais de gelo ⁽¹⁾. À microscopia eletrônica, há a preservação folicular e também de estroma e vasos. Ao que parece, fornece bons resultados, porém requer maiores investigações ^(1, 46, 58).

Em novembro de 2009, Gosden et al. ⁽⁶⁰⁾ realizaram estudo com microscopia eletrônica para avaliar a localização dos cristais de gelo em fatias de ovário de coelhas submetidas à criopreservação por protocolo de congelação lenta e por vitrificação. Apesar da distorção macroscópica, observaram, com a técnica de congelação lenta, melhores resultados em

relação à viabilidade celular, pelo maior grau de desidratação e ausência de cristais de gelo intracelulares.

O método padrão usado para a criopreservação de tecido ovariano, desde a concepção deste trabalho, em 2008, até o presente momento, é o de congelamento lento programada, que utiliza meio contendo albumina humana ou similar com propanodiol, dimetilsulfóxido ou etilenoglicol como crioprotetor, combinado ou não com sucrose ^(7, 9). Já a vitrificação permanece ainda em fase experimental de aplicação para a espécie humana, mas possivelmente terá promissores resultados ^(46, 55, 61-63).

Na base de dados Pubmed, o primeiro artigo publicado sobre o transplante ovariano (critérios de busca: *ovarian transplantation (all fields)*), em 08/11/2009, data de 1903. O autor realizou o transplante de fragmentos de tecido ovariano de duas pacientes sabidamente férteis para outras duas que seriam submetidas à ooforectomia. Este primeiro relato já considerava questões que ainda são indefinidas e palpitantes até os dias atuais: técnica cirúrgica, preservação tecidual, local de implantação e repercussões endócrinas, menstruais e na fertilidade ⁽⁶⁴⁾.

Desde então, várias técnicas e estratégias e possibilidades vêm sendo pesquisadas com o propósito de melhorar os resultados, como também a execução e a viabilidade do transplante de tecido ovariano. Mais de 65% das publicações são posteriores a 1991, o que demonstra crescente interesse científico e o potencial de aplicabilidade clínica desse procedimento nas últimas duas décadas. Apesar do número de trabalhos publicados (3.520 no total, desde 1903; 2.287 após 1991), o tema é ainda

controverso e as técnicas ideais ainda não estão definitivamente estabelecidas. O crescimento do número de publicações sobre transplante ovariano em cada década pode ser visualizado nos dados do Gráfico 5.

Fonte: Pubmed

Gráfico 1 - Evolução dos trabalhos indexados no Pubmed sobre o tema: “transplante ovariano” (*search: ovarian transplantation*). Novembro, 2009

A possibilidade de aplicação clínica do transplante de ovário passou a ser realmente considerada, a partir de 1994, após o primeiro relato bem-sucedido de restauração da fertilidade, após o transplante de fatias de córtex ovariano criopreservado em ovelhas ^(35, 36).

No Brasil, Von Eye Corleta et al., em 1998, comprovaram a viabilidade do transplante autólogo de tecido ovariano em tecido subcutâneo dorsal de ratas ⁽¹⁴⁾. Depois de entrarem na fase de estro, os animais foram sacrificados, e os implantes dorsais retirados e preparados para exame

histológico. Neste experimento, os autores relataram que mais de 80% dos implantes tiveram preservada a produção de esteroides sexuais. O fato foi confirmado pela análise citológica cervicovaginal efetuada após os transplantes. Nosso estudo demonstrou viabilidade do transplante autólogo de tecido ovariano em tecido celular subcutâneo e em região intraperitoneal próxima ao infundíbulo pélvico.

Para pesquisar os efeitos da criopreservação, Chen et al. (2006) realizaram estudo com 12 coelhas da raça Nova Zelândia. Após a ooforectomia bilateral e a conservação de um dos ovários intacto em formol como controle, o outro ovário, com microcirculação mantida, foi submetido à criopreservação ⁽⁶⁵⁾.

O protocolo de congelação utilizado foi o de congelação lenta modificado de Gosden (1994). Após uma semana, os ovários criopreservados foram descongelados e transplantados na região inguinal de cada coelha ooforectomizada (transplante autólogo), com anastomoses microvasculares entre os vasos ovarianos remanescentes e os vasos epigástricos. Inicialmente, a análise estatística considerou a diferença do número de folículos primordiais entre os ovários controles e os experimentais. Seis meses após o transplante, a densidade folicular foi significativamente menor no grupo experimental do que nos ovários do grupo controle (13,99 x 18,68 folículos por campo). Das 12 coelhas estudadas, dez tiveram retorno da função ovariana, evidenciada por anastomose microvascular funcionante, produção de estrogênio e progesterona e presença de células intermediárias e superficiais na citologia vaginal.

O presente trabalho também utilizou o protocolo de Gosden de congelação lenta para a criopreservação e na contagem folicular não houve diferença entre os grupos de transplante a fresco e após criopreservação em relação a folículos primordiais, folículos primários, folículos secundários, folículos terciários, corpos lúteos e corpos albicantes. Destacamos o achado de menor quantidade de folículos antrais não degenerados nos grupos criopreservados (GIV e GV) em relação ao grupo controle (GI).

Quanto a experimentos em animais de maior porte, Harrison realizou transplantes ovarianos em suínos ⁽⁶⁶⁾. Efetuou ooforectomia bilateral e posterior autotransplante, imediatamente, após a retirada. O implante foi feito em topografia abdominal direita entre a aorta e a veia cava. Obteve êxito, com reativação funcional ovariana manifestada por ciclos estrais e a ocorrência de gestação a termo em 76% dos animais.

Oktay et al. procederam ao primeiro transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado em humanos, em 2000 ⁽⁶⁷⁾, que foi realizado em paciente de 29 anos que já havia sido submetida à anexectomia esquerda aos 17 anos por teratoma cístico benigno, que apresentou posteriormente amenorreia hipotalâmica induzida por exercício e, aos 28 anos, foi submetida à anexectomia direita por metrorragia incoercível e rebelde ao tratamento clínico. Na ocasião da segunda anexectomia, múltiplos fragmentos do córtex ovariano, com dimensões de 2x2 mm a 5x10 mm, foram criopreservados, de acordo com o protocolo de congelação lenta em 1,5M de propanodiol. Seis meses após, efetuou-se o transplante do tecido ovariano criopreservado por persistir com sintomas menopausais, mesmo

com a terapia de reposição com estrogênio e progestagênio. A técnica para o reimplante ovariano consistiu em implante peritoneal em bolsa de membrana de celulose absorvível (Surgicel®, Ethicon, Sommerville, N.J.). Posteriormente, este tecido foi estimulado com gonadotrofinas, ocorrendo ovulação, confirmada por dosagem sérica de progesterona na segunda fase do ciclo e pelo exame ultrassonográfico ⁽⁶⁸⁾.

Em humanos, até a presente data, há 30 casos relatados de autotransplante ortotópico de tecido ovariano criopreservado em todo o mundo, alguns com menção a nascidos vivos ^(1, 9, 10, 46, 69-74). São considerados implantes ortotópicos aqueles colocados em janela especialmente criada no peritônio, próxima ao infundíbulo pélvico, classicamente fixados em tela de Surgicell® como descrito por Donnez em 2006 ⁽¹⁰⁾ e também os fragmentos suturados diretamente no ovário remanescente ⁽⁴⁶⁾.

As principais vantagens deste tipo de transplante são a possibilidade teórica de ocorrência de gravidez espontânea e a semelhança do meio ambiente em relação, sobretudo, às variações de temperatura. Entretanto, a localização ortotópica dos reimplantes não é a mais adequada quando há risco de metástase ovariana e também não permite fácil monitorização do tecido nem cómodo acesso aos folículos ovarianos ⁽⁹⁾. Nesta pesquisa, para o implante ortotópico, utilizamos os fragmentos de ovário fixados em tela de Surgicell colocados em janela no peritônio, próximo ao infundíbulo pélvico, com resultados de apoptose inferiores aos implantes heterotópicos.

A utilização de local heterotópico para autotransplante de tecidos humanos é um conceito bem conhecido e estabelecido, com excelentes

resultados, há mais de 30 anos, para o implante de fragmentos a fresco ou após criopreservação de paratireoide após paratireoidectomia total ⁽⁷⁵⁾. Em meio a tantas dúvidas sobre a correta utilização dos fragmentos obtidos do tecido ovariano, podemos usar o exemplo do transplante autólogo de paratireoide. As semelhanças são várias como: as glândulas endócrinas com dois tipos de células no parênquima celular funcionantes (células principais e células oxífilas na paratireoide e células da teca e da granulosa no ovário), estroma com células não produtoras de hormônios (adipócitos na paratireoide e tecido conjuntivo no ovário), além da produção hormonal dependente do eixo hipotálamo-hipofisário e do retrocontrole negativo, de acordo com a concentração do seu produto final ⁽⁷⁵⁾.

Após anos de pesquisa, a técnica do auto-transplante de glândulas paratireoideas tem as seguintes recomendações formais: contato com a lâmina muscular no leito de implantação; local de fácil acesso técnico; acessibilidade e superficialidade para facilitar a monitorização; menor tempo possível fora do leito, antes da criopreservação ou reimplante, em solução fisiológica fria a 4 °C; dissecação imediata do tecido a ser transplantado; utilização de fatias do parênquima superficial e produção de fragmentos com espessura entre 1-2 mm ^(76, 77).

Desse modo, as proposições depreendidas da experiência clínica atual e de sucesso do autotransplante de paratireoide foram utilizadas nesta pesquisa e motivaram a investigação da viabilidade e da significância das diferenças entre os locais de implantação, como contribuição à pesquisa e utilização do transplante heterotópico de tecido ovariano.

As possíveis vantagens do transplante autólogo heterotópico de tecido ovariano são a possibilidade de utilização em pacientes com pelve comprometida por radioterapia ou fibrose intensa; maior facilidade de acesso cirúrgico; monitorização e captação de oócitos e o uso no mesmo ato cirúrgico em casos selecionados de reimplante a fresco ^(5, 9, 78). Em teoria, as principais desvantagens são o meio diferente, o que pode alterar o desenvolvimento e a maturação folicular e a dificuldade de assegurar a neovascularização ^(9, 46).

Em 2001, Oktay descreveu trabalho pioneiro sobre o transplante de tecido ovariano humano previamente criopreservado em localização heterotópica, no subcutâneo e entre as fáscias do músculo reto abdominal ⁽⁷⁹⁾. Até o momento, apenas dois autores referiram reimplante de tecido ovariano criopreservado em local exclusivamente heterotópico, sem nenhum relato de ocorrência de gravidez ⁽⁹⁾. A experiência com transplante heterotópico do ovário ainda é bastante limitada na espécie humana, de tal modo que não se pode tirar conclusões definitivas até o presente momento, sendo preciso ainda maiores investigações ⁽³⁵⁾.

A duração média do funcionamento hormonal do tecido ovariano reimplantado após criopreservação em humanos (11 estudos) é de 9 meses após o reimplante ⁽⁹⁾. Em 2006, o estudo de Sánchez et al. revelou resultados hormonais compatíveis com adequado funcionamento do tecido ovariano reimplantado a fresco em 12 mulheres submetidas à histerectomia por causas benignas até 2 anos após o transplante, sem relato de gravidez ⁽⁸⁰⁾.

A baixa expectativa de duração do funcionamento do tecido ovariano após o transplante pode não ser suficiente para se restaurar a fertilidade e a função hormonal. Pode-se vislumbrar a possibilidade de serem necessários novos reimplantes, sendo a localização heterotópica, em especial a subcutânea, a que apresentaria potencial de evitar múltiplos procedimentos invasivos ⁽³⁵⁾.

De acordo com Kim et al., em estudo multicêntrico, quatro pacientes receberam transplante de fragmentos corticais de seus próprios ovários previamente criopreservados pela técnica de congelamento lento, após completo tratamento da neoplasia inicial, em tecido celular subcutâneo. Houve retorno da função ovariana, evidenciado pelo aumento dos níveis de estradiol e queda das taxas de FSH, além de elevação ocasional da progesterona sérica e do LH, e da presença de folículos dominantes evidenciados ao ultrassom na localização heterotópica e protuberância palpável no local do transplante, em todas as pacientes. Entretanto, a produção hormonal durou apenas 3 a 5 meses.

Assim, a opção de repetir o transplante foi discutida e três das quatro pacientes realizaram segundo transplante de tecido ovariano. Em contraste com os resultados obtidos após a primeira intervenção, notaram estabelecimento da função ovariana por tempo mais prolongado de, aproximadamente, 15 a 36 meses, com todas as pacientes apresentando níveis de FSH inferiores a 15 mIU/ml, durante todo o período de acompanhamento ⁽³⁵⁾.

Em nosso estudo, para o transplante ortotópico, utilizamos a localização subcutânea, no caso do modelo animal utilizado, na prega da virilha, pelo fácil acesso cirúrgico e proteção contra a manipulação pelo próprio animal e pelos companheiros de baia. Os resultados de contagem folicular foram semelhantes e os de apoptose foram superiores aos encontrados nos transplantes ortotópicos.

O uso do modelo suíno e da técnica cirúrgica laparoscópica teve como objetivo suprir a falta de estudos experimentais em mamíferos de maior porte. A maioria dos estudos publicados foi feita em animais de pequeno porte ^(10, 14, 16). Os mamíferos maiores (vaca, ovelha, porca, primatas e gatas) são mais semelhantes à espécie humana, sobretudo no tamanho do ovário, na técnica cirúrgica, na consistência e resistência à manipulação do córtex ovariano e na fisiologia ovariana ⁽²⁷⁾. Em camundongos, por exemplo, os folículos de recém-nascidos atingem rapidamente o estágio secundário, e em mamíferos maiores a tendência dos fragmentos de ovário é conservar os folículos em estágio primordial ^(27, 46, 81).

A principal diferença da fisiologia ovariana em suínos, quando comparada à humana e que podem, de certa maneira, facilitar a manutenção e resposta dos folículos neste estudo, é o fato de as fêmeas suínas serem consideradas “super-férteis”, sendo classicamente poliovulatórias e facilmente responsivas ao estímulo ovariano, o que pode ser evidenciado pela contagem de corpos lúteos nos grupos, sempre superior a dois ^(29, 63, 66, 82-84). Outro aspecto importante é que não podemos, de forma alguma, diminuir a importância dos estudos sobre fisiologia e transplante de ovário

em roedores, fundamentais para nossa atual compreensão do funcionamento ovariano ⁽⁴⁶⁾. Ressaltamos a necessidade de se buscar novos horizontes para a pesquisa nessa área, o que motivou a escolha de nosso modelo animal.

De acordo com nossos achados, o transplante autólogo de tecido ovariano no modelo suíno foi viável com as técnicas propostas para a ooforectomia laparoscópica e ulterior reimplante subcutâneo e intraperitoneal, a fresco e após criopreservação por protocolo de congelamento lento adaptado de Gosden ⁽³⁶⁾.

O sucesso e a viabilidade das técnicas, estudadas em pesquisas distintas e predominantemente em animais de pequeno porte, mostram, pelos aspectos já discutidos, probabilidade maior e mais segura de prosseguir as pesquisas e iniciar projetos pilotos em seres humanos.

O início da capacitação de profissionais e o desenvolvimento da metodologia de fatiamento, criopreservação e transplante autólogo de ovário em nosso centro universitário constituem importante contribuição de nosso trabalho.

Todavia, observamos que em nosso estudo há várias limitações. Assim, podemos ressaltar que a presença e a contagem dos folículos e corpos lúteos não são garantia de que a função hormonal é satisfatória ou houve desenvolvimento adequado de oócitos para a fertilização.

Em nossa pesquisa, houve a preocupação com a sincronização do ciclo estral para padronizar a contagem e a avaliação da apoptose no tecido ovariano, antes e após o transplante, que foi resolvida com a utilização de

progesterona sintética, o pode interferir nas dosagens hormonais. Optamos, pois, por não realizar a análise hormonal, mas, sim, consistente análise histomorfométrica na mesma fase do ciclo estral.

Outra limitação deste estudo foi termos finalizado-o no momento da reavaliação dos implantes, pois, não foi possível, no protocolo aprovado, reencaminhar os animais à fazenda e avaliar a resposta dos implantes por prazo mais prolongado, bem como verificar a possibilidade de captação de oócitos e da fertilização. Neste caso, o principal empecilho foi a acomodação e monitorização adequada após os procedimentos, pois somente atendendo a todas as prerrogativas da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Anexo 2), isto seria possível. A completa adequação às exigências da Lei Federal tornaria o projeto, aprovado antes da publicação da Lei, inviável. Sem dúvida, o seguimento a longo prazo e o comportamento *in vivo* dos implantes são pontos interessantes a serem pesquisados no futuro.

Nesta pesquisa, destacam-se a viabilidade e a resposta ao estímulo do tecido ovariano em todos os implantes, tanto a fresco como após criopreservação, quer na região subcutânea quer intraperitoneal. Em todos os grupos, foram encontrados folículos em diferentes fases de desenvolvimento, folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos, em número e morfologia semelhantes ao observado no grupo controle. Tal achado traduz adequado funcionamento e resposta dos implantes de fatias corticais de ovário com as duas técnicas usadas, tanto na região subcutânea como na intraperitoneal, para os implantes a fresco e àqueles que foram preservados em nitrogênio líquido, utilizando-se protocolo de congelação lenta.

A apoptose é o principal mecanismo de morte celular no ovário e constitui marcador fundamental na avaliação do sucesso dos transplantes⁽⁸⁵⁾. Avaliar a imunoexpressão de proteínas representantes da família pró-apoptótica (Bax) e da família antiapoptótica (Bcl-2), complementada pela etapa final e irreversível das vias extrínseca e intrínseca do processo de apoptose, por meio da caspase 3-clivada, permitiu a análise global do processo de morte celular programada nos tecidos ovarianos transplantados.

Na avaliação da contagem folicular e marcação de apoptose, na região intraperitoneal observamos resultados inferiores, tanto com o transplante a fresco como no criopreservado. Considerando-se o objetivo desta pesquisa, ou seja, verificar se há equivalência entre os resultados dos transplantes ortotópicos e heterotópicos de tecido ovariano, estes dados são animadores. Nas pesquisas em humanos, 63,63% das 11 publicações disponíveis utilizaram o reimplante ortotópico. Acreditamos que, à semelhança do bem-estabelecido transplante autólogo de paratireoide, as vantagens que registramos devem ser valorizadas. A marcação de apoptose ocorreu em todos os tecidos transplantados, notadamente, nos implantes intraperitoneais, o que nos leva a defender a pesquisa e a utilização do implante heterotópico como alternativa viável e equiparável ao ortotópico no transplante ovariano.

Observamos taxa de apoptose significativamente mais elevada nos transplantes intraperitoneais, tanto a fresco como após criopreservação. Pode ser relacionada a alterações estruturais e perdas foliculares em razão do maior tempo de isquemia após a retirada e ao maior tempo empregado

na preparação e fixação dos fragmentos para serem colocados na região intraperitoneal. Após a dissecação e preparo dos fragmentos, o tempo para o reimplante na região subcutânea foi, em média, de 2,2 minutos e, na região intraperitoneal, de 4,8 minutos. Este tempo maior é inerente à técnica de fixação laparoscópica na janela peritoneal dos fragmentos de ovário previamente suturados em Surgicell®, além de haver maior manipulação e traumatismo dos fragmentos teciduais.

Estudos complementares são necessários para referendar esses resultados e aquilatar o potencial reprodutivo e hormonal dos implantes de ovário, tanto em animais como também na espécie humana.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo em modelo experimental suíno permitiu concluir que:

- 1 - O transplante ovariano autólogo em tecido celular subcutâneo e na região intraperitoneal peri-infundibular mostrou-se viável;
- 2 - Registramos a presença de folículos em desenvolvimento e corpos lúteos em todos os tecidos transplantados, independente da técnica empregada;
- 3 - A contagem de folículos antrais não degenerados foi menor nos tecidos transplantados após criopreservação em relação ao grupo controle;
- 4 - Ocorreu menor imunoexpressão do Bcl-2 (antiapoptótico) e maior imunoexpressão do Bax (proapoptótico) nos grupos transplantados em comparação ao grupo controle;
- 5 - A imunoexpressão de caspase 3-clivada foi maior no grupo com transplante criopreservado intraperitoneal comparativamente ao grupo controle.

Anexo 1 – Aprovação do Comissão de Ética HCFMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/09/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0862/09**, intitulado: **"TRANSPLANTE EXPERIMENTAL SUBCUTÂNEO E INTRAPERITONEAL DE OVÁRIO EM PORCAS: ESTUDO ENDÓCRINO, HISTOMORFOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO"** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Edmund Chada Baracat**
Pesquisador (a) Executante: **Lia Cruz Vaz da Costa Damásio**

CAPPesq, 03 de Setembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

ANEXO 2 - Lei 11.794 de 08/08/2008- Regulamentação do uso científico de animais

**Presidência da
República
Casa Civil**

Subchefia para Assuntos Jurídicos

LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.

Mensagem de veto

Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I

DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

§ 1º A utilização de animais em atividades educacionais fica restrita a:

I – estabelecimentos de ensino superior;

II – estabelecimentos de educação profissional técnica de nível médio da área biomédica.

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 2º O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo **Chordata**, subfilo **Vertebrata**, observada a legislação ambiental.

Art. 3º Para as finalidades desta Lei entende-se por:

I – filo **Chordata**: animais que possuem, como características exclusivas, ao menos na fase embrionária, a presença de notocorda, fendas branquiais na faringe e tubo nervoso dorsal único;

II – subfilo **Vertebrata**: animais cordados que têm, como características exclusivas, um encéfalo grande encerrado numa caixa craniana e uma coluna vertebral;

III – experimentos: procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas;

IV – morte por meios humanitários: a morte de um animal em condições que envolvam, segundo as espécies, um mínimo de sofrimento físico ou mental.

Parágrafo único. Não se considera experimento:

I – a profilaxia e o tratamento veterinário do animal que deles necessite;

II – o anilhamento, a tatuagem, a marcação ou a aplicação de outro método com finalidade de identificação do animal, desde que cause apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro;

III – as intervenções não-experimentais relacionadas às práticas agropecuárias.

CAPÍTULO II

DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Art. 5º Compete ao CONCEA:

I – formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;

II – credenciar instituições para criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica;

III – monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;

IV – estabelecer e rever, periodicamente, as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;

V – estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;

VI – estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;

VII – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados ou em andamento no País, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas Comissões de Ética no Uso de Animais - CEUAs, de que trata o art. 8º desta Lei;

VIII – apreciar e decidir recursos interpostos contra decisões das CEUAs;

IX – elaborar e submeter ao Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;

X – assessorar o Poder Executivo a respeito das atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta Lei.

Art. 6º O CONCEA é constituído por:

I – Plenário;

II – Câmaras Permanentes e Temporárias;

III – Secretaria-Executiva.

§ 1º As Câmaras Permanentes e Temporárias do CONCEA serão definidas no regimento interno.

§ 2º A Secretaria-Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio administrativo do Ministério da Ciência e Tecnologia.

§ 3º O CONCEA poderá valer-se de consultores **ad hoc** de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 7º O CONCEA será presidido pelo Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia e integrado por:

I – 1 (um) representante de cada órgão e entidade a seguir indicados:

a) Ministério da Ciência e Tecnologia;

b) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

c) Ministério da Educação;

d) Ministério do Meio Ambiente;

e) Ministério da Saúde;

f) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

g) Conselho de Reitores das Universidades do Brasil – CRUB;

h) Academia Brasileira de Ciências;

i) Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;

j) Federação das Sociedades de Biologia Experimental;

l) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

m) Federação Nacional da Indústria Farmacêutica;

II – 2 (dois) representantes das sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País.

§ 1º Nos seus impedimentos, o Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia será substituído, na Presidência do CONCEA, pelo Secretário-Executivo do respectivo Ministério.

§ 2º O Presidente do CONCEA terá o voto de qualidade.

§ 3º Os membros do CONCEA não serão remunerados, sendo os serviços por eles prestados considerados, para todos os efeitos, de relevante serviço público.

CAPÍTULO III

DAS COMISSÕES DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUAs

Art. 8º É condição indispensável para o credenciamento das instituições com atividades de ensino ou pesquisa com animais a constituição prévia de Comissões de Ética no Uso de Animais – CEUAs.

Art. 9º As CEUAs são integradas por:

I – médicos veterinários e biólogos;

II – docentes e pesquisadores na área específica;

III – 1 (um) representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no País, na forma do Regulamento.

Art. 10. Compete às CEUAs:

I – cumprir e fazer cumprir, no âmbito de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA;

II – examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

III – manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino e pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;

IV – manter cadastro dos pesquisadores que realizem procedimentos de ensino e pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;

V – expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários perante órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI – notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente com os animais nas instituições credenciadas, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º Constatado qualquer procedimento em descumprimento às disposições desta Lei na execução de atividade de ensino e pesquisa, a respectiva CEUA determinará a

paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo da aplicação de outras sanções cabíveis.

§ 2º Quando se configurar a hipótese prevista no § 1º deste artigo, a omissão da CEUA acarretará sanções à instituição, nos termos dos arts. 17 e 20 desta Lei.

§ 3º Das decisões proferidas pelas CEUAs cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 4º Os membros das CEUAs responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 5º Os membros das CEUAs estão obrigados a resguardar o segredo industrial, sob pena de responsabilidade.

CAPÍTULO IV

DAS CONDIÇÕES DE CRIAÇÃO E USO DE ANIMAIS PARA ENSINO E

PESQUISA CIENTÍFICA

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei.

§ 1º [\(VETADO\)](#)

§ 2º [\(VETADO\)](#)

§ 3º [\(VETADO\)](#)

Art. 12. A criação ou a utilização de animais para pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA.

Art. 13. Qualquer instituição legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino e pesquisa deverá requerer credenciamento no CONCEA, para uso de animais, desde que, previamente, crie a CEUA.

§ 1º A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA, é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º Na hipótese prevista no § 1º deste artigo, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e centros de criação sob seu controle.

Art. 14. O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constituem a pesquisa ou programa de aprendizado quando, antes, durante e após o experimento, receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º O animal será submetido a eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, conforme as diretrizes do Ministério da Ciência e Tecnologia, sempre que, encerrado o experimento ou em qualquer de suas fases, for tecnicamente recomendado aquele procedimento ou quando ocorrer intenso sofrimento.

§ 2º Excepcionalmente, quando os animais utilizados em experiências ou demonstrações não forem submetidos a eutanásia, poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios vigentes de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º Sempre que possível, as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º O número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

§ 7º É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas.

§ 8º É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º Em programa de ensino, sempre que forem empregados procedimentos traumáticos, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10. Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pelos organismos internacionais aos quais o Brasil se vincula.

Art. 15. O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se esperam obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão.

Art. 16. Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino será supervisionado por profissional de nível superior, graduado ou pós-graduado na área biomédica, vinculado a entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

CAPÍTULO V

DAS PENALIDADES

Art. 17. As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão às suas disposições e ao seu regulamento, às penalidades administrativas de:

I – advertência;

II – multa de R\$ 5.000,00 (cinco mil reais) a R\$ 20.000,00 (vinte mil reais);

III – interdição temporária;

IV – suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;

V – interdição definitiva.

Parágrafo único. A interdição por prazo superior a 30 (trinta) dias somente poderá ser determinada em ato do Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, ouvido o CONCEA.

Art. 18. Qualquer pessoa que execute de forma indevida atividades reguladas por esta Lei ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA será passível das seguintes penalidades administrativas:

I – advertência;

II – multa de R\$ 1.000,00 (mil reais) a R\$ 5.000,00 (cinco mil reais);

III – suspensão temporária;

IV – interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 19. As penalidades previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas de acordo com a gravidade da infração, os danos que dela provierem, as circunstâncias agravantes ou atenuantes e os antecedentes do infrator.

Art. 20. As sanções previstas nos arts. 17 e 18 desta Lei serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo de correspondente responsabilidade penal.

Art. 21. A fiscalização das atividades reguladas por esta Lei fica a cargo dos órgãos dos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Saúde, da Educação, da Ciência e Tecnologia e do Meio Ambiente, nas respectivas áreas de competência.

CAPÍTULO VI

DISPOSIÇÕES GERAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 22. As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no País antes da data de vigência desta Lei deverão:

I – criar a CEUA, no prazo máximo de 90 (noventa) dias, após a regulamentação referida no art. 25 desta Lei;

II – compatibilizar suas instalações físicas, no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas estabelecidas pelo CONCEA, com base no inciso V do **caput** do art. 5º desta Lei.

Art. 23. O CONCEA, mediante resolução, recomendará às agências de amparo e fomento à pesquisa científica o indeferimento de projetos por qualquer dos seguintes motivos:

I – que estejam sendo realizados sem a aprovação da CEUA;

II – cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 24. Os recursos orçamentários necessários ao funcionamento do CONCEA serão previstos nas dotações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 25. Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 26. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 27. Revoga-se a [Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979](#).

Brasília, 8 de outubro de 2008; 187º da Independência e 120º da República.

LUIZ INÁCIO LULA DA SILVA

Tarso Genro

Reinhold Stephanes

José Gomes Temporão

Miguel Jorge

Luiz Antonio Rodrigues Elias

Carlos Minc

Este texto não substitui o publicado no DOU de 9.10.2008

1. Wolff M von, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy- A technique in its infancy but already successful in fertility preservation. *Eur J Cancer*. 2009;45(9):1547-1553.
2. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P. Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(3):232-238.
3. Live birth after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. [database on the Internet]. *Human Reproduction*. 2011 [cited Mar 28 2011].
4. Redig AJ, Brannigan R, Stryker SJ, Woodruff TK, Jeruss JS. Incorporating fertility preservation into the care of young oncology patients. *Cancer*. 2011;117(1):4-10.
5. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update*. 2009;15(6):649-65.
6. von Wolff M, Montag M, Dittrich R, Denschlag D, Nawroth F, Lawrenz B. Fertility preservation in women-a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPROTEKT. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;Mar 24.
7. Rosendahl M, Schmidt KT, Ernst E, Rasmussen PE, Loft A, Byskov AG, Andersen AN, Andersen CY. Cryopreservation of ovarian tissue for a decade in Denmark: a view of the technique. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(2):162-171.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

8. Committee ASfRMP. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006;86(4):142-147.
9. Sonmezer M, Oktay K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*. 2010;24 (1):113-126.
10. Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Langendonck AV, Demylle D, Dolmans M-M. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update*. 2006;12(5):519-535.
11. Israely T, Nevo N, Harmelin A, Neeman M, Tsafriri A. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1368-1379.
12. Barros FSV, de Oliveira RM, Alves FM, Sampaio M. Sucessful ovarian autotransplant with no vascular reanastomosis in rats. *Transplantation*. 2008;86(11):1628-1630.
13. Soleimani R, Heytens E, Van den Broecke R, Rottiers I, Dhont M, Cuvelier C, De Sutter P. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue into murine back muscle. *Hum Reprod*. 2010;25(6):1458-70.
14. Corleta vEH, Corleta O, Capp E, Edelweiss M, Oheninger S. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril*. 1998;70:16-19.
15. Stubenitsky BM, Booster MH, Brasile L, Araneda D, Haisch CE, Kootstra G. Pretransplantation prognostic testing on damaged kidneys during ex vivo warm perfusion. *Transplantation*. 2001;71(6):716-720.
16. Deng XH, Xu AR, Chao L, Yu HI, Zhen JH, Hashimoto S, Morimoto Y. Effect of different sites for cryopreserved ovarian tissue implantation in rabbit. *Hum Reprod*. 2007;22(3):662-668.
17. Zhu J, Wang S, Bie P, Li X, Zhang Y, Xiong Y, Wang H, Ma Z, Li K, Dong J. Apoptosis and regeneration of sinusoidal endothelial cells after extended cold preservation and transplantation of rat liver. *Transplantation*. 2007 Dec;84(11):1483-1491.
18. Rocha E. Da apoptose e biologia celular ao xenotransplante e zoonoses: alguns desafios para o transplante de órgãos no início do século. *Journal [serial on the Internet]*. 1999 Date; 1(5).

19. Medarova Z, Vallabhajosyula P, Tena A, Evgenov N, Pantazopoulos P, Tchipashvili V, Weir G, Sachs D, Moore A. In vivo imaging of autologous islet grafts in the liver and under the kidney capsule in non-human primates. *Transplantation*. 2009;87(11):1659-1666.
20. Lee ADW, Ribeiro Jr U, Ferreira MA, Sesso A, Bresciani CJC, Gama-Rodrigues J. Participação da apoptose na rejeição aguda do transplante intestinal em ratos. *Arq Gastroenterol*. 2004;41(3):193-198.
21. Grivich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. [Revisão de Literatura]. 2007 25/01/2007;53(3):335-343.
22. Swindle MM, Moody DC, Philips LD. *Swine as Models in Biomedical Research*. 1 ed. Iowa State University Press; 1992.
23. Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental. *O Minipig* br1. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003;18(5):387-391.
24. Coutinho ARS. Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões do DNA em embriões suínos ativados partenogeneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2007.
25. Mendes GPA. Apoptose: programa molecular de morte celular. *Revista Einstein*. 2003;1:15-17.
26. Anazetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*. 2007;1(1):37-55.
27. Santos AV, Ferrazzoli MO. *Ciclo Estral nos Animais*. São Paulo, SP: Universidade Metodista de São Paulo- UMESP-REDEVET- Portal Veterinário; 2001 [updated 2001; cited 2009]; Available from: <http://www.redevet.com.br/artigos/estral1.htm>.
28. Alvarenga MVF. Sensibilidade e especificidade do perfil estral para o diagnóstico de ovulação em fêmeas suínas. [Dissertação de mestrado]. Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas; 2005.
29. Bertolin A. *Suínos*. 1ª ed. Curitiba, PR: Editora Curitiba; 1992.

30. Bortolozzo F. Tendências e inovações na Inseminação artificial em suínos. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Suino.com.br; 1993 [updated 1993; cited 2007]; Available from: <http://www.suino.com.br/fortdodge/evento/palestras/bortolozzo.htm>.
31. Bula Regumate. [cited]; Available from: <http://www.regumate.com/label.asp>.
32. Machado GS. Desafios atuais no manejo da leitoa para reprodução. Belo Horizonte- MG: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG; 2001 [updated 2001; cited 2009 28 de setembro de 2009]; Available from: http://www.acrismat.com.br/arquivos_pesquisas/desafios.pdf.
33. Schmidt M, Raun K. The effect of regumate(R) on the synchronization of the estrous cycle in micropigs Theriogenology. 1995;43(1):316-320.
34. Shimatsu Y, Uchida M, Niki R, Imai H. Effects of a synthetic progestogen, altrenogest, on oestrus synchronisation and fertility in miniature pigs. Vet Rec. 2004;155(20):633-635.
35. Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. Fertil Steril. 2009 June 2009;91(6):2349-2354.
36. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Weeb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees. Hum Reprod. 1994;9:597-603.
37. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang J, Erickson GF. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(11):5321-5327.
38. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2008.
39. Yoshida M, Sanbuisso A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. J Toxicol Sci. 2009;34(SP):189-197.
40. Damous LL. Efeito do condicionamento isquêmico remoto no transplante autólogo de ovário fresco e criopreservado em ratas [Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009.

41. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1986;1(2):81-87.
42. Simoes MJ, Baracat EC, Carbonel AAF, Simoes RS, Lima R, Baracat MCP. [cited 20.08.2009]; Available from: <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/ovario/histologia.htm>.
43. Nixon RM, Wonderling D, Grieve RD. Non-parametric methods for cost-effectiveness analysis: the central limit theorem and the bootstrap compared. *Health Econ.* 2010;19(3):316-333.
44. Falcone T, Attaran M, Bedaiwy MA, Goldberg JM. Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril.* [Modern Trends]. 2004;81(2):243-257.
45. Cruz MRS, Prestes JC, Gimenes DL, Fanelli MF. Fertility preservation in women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy: a systematic review. *Fertil Steril.* 2010;94(1):138-143.
46. Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010;16(4):395-414.
47. Carneiro MM. Criopreservação de oócitos e tecido ovariano: fatos. Belo Horizonte: Portal da Associação de Ginecologistas e Obstetras de Minas Gerais; 2008 [updated 2008; cited 2009 06 de outubro de 2006]; Available from: http://www.sogimig.org.br/saude/reproducao_humana_03.php.
48. Sisembrio - Sistema Nacional de cadastro de Embriões. In: ANVISA, editor. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2008.
49. Oktay K, Oktem O. Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of ongoing experience. *Fertil Steril.* 2010;93(3):762-768.
50. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Tan SL, Gosden RG. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod.* 2003;18(6):1165-1172.

51. Risvanli A, Timurkan H, Akpolat N, Gulacti I, Ulakoglu E. A study of ovarian autotransplantation without vascular a pedicle in rats. *J Assist Reprod Genet.* 2006;23(11-12):401-406.
52. Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yng YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod.* 2006;18(11):2794-800.
53. Yang H, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Kim SS. Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertil Steril.* 2008;90:1550-1558.
54. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med.* 2005;353(1):64-73.
55. Donnez J, Dolmans MM. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue. *Clin Obstet Gynecol.* 2010 Dec;53(4):787-796.
56. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update.* 2009 Nov-Dec;15(6):649-665.
57. Yang H, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Kim SS. Assessment of vascular endothelial growth factor expression and apoptosis in the ovarian graft: can exogenous gonadotropin promote angiogenesis after ovarian transplantation? *Fertil Steril.* 2008 Oct;90(4 Suppl):1550-1558.
58. Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, Massardier J, Mazoyer C, Sale B, Lomager J. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril.* 2006;86(4 Suppl):1243-1251.
59. Lornage J, Courbiere B, Mazoyer C, Odagescu V, Baudot A, Bordes A, Poirel MT, Franck M, Salle B. Ovarian tissue vitrification: cortex and whole ovary in sheep. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006;34(9):746-753.
60. Gosden RG, Yin H, Bodine RJ, Morris GJ. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. *Human Reproduction.* 2009; 25(2): 470-478.
61. Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simón C, Perllicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril.* 2010;93(1):268.e11-.e13.

-
62. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(1):70-80.
63. Moniruzzaman M, Bao RM, Taketsuru H, Miyano T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. 2009;72(2):280-288.
64. Martin FH. Ovarian transplantation and reconstruction of fallopian tubes: with report of two cases and review of literature. *Chic Med Rec*. 1903;25:1-12.
65. Chen C-H, Chen S-G, Wu G-J, Wang J, Yu C-P, Liu J-Y. Autologous heterotopic transplanation of intact rabbit ovary after frozen bankin at -196° C. *Fertil Steril*. 2006;86(Suppl 3):1059-1066.
66. Harrison FA. Reproductive behavior in the pig after autotransplantation of the ovary by vasculart anastomoses. *Q J Exp Physiology*. 1982;67(4):663-670.
67. Oktay K, Karlikaia G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med*. 2000;342:349.
68. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004 Mar 13;363(9412):837-840.
69. Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, Delbaere A, Englert Y. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod*. 2006;21(8):2010-2014.
70. Mhatre P, Mhatre J. The first orthotopic ovarian transplant in Turners syndrome. *Transplantation*. 2004;78(2):452.
71. Donnez J, Dolmans MM, Demyille D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonckt A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004 Oct 16-22;364(9443):1405-14410.
72. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, Andersen AN, Ernst E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2008;23(10):2266-2272.

-
73. Ernst E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen AN. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010;25:1280-1281.
74. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. [database on the Internet]. 2011 [cited. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07853890.2010.546807>].
75. Wells Jr SA, Gunnels JC, Shelburne JD. Transplantation of the parathyroid gland in man: clinical indications and results. *Surgery*. 1975;78:34-44.
76. Carvalho MB. *Tratado de Tireóide e Paratireóides*. Rio de Janeiro-RJ: Editora Rubio; 2007.
77. Echenique-Elizondo M, Diaz-Aguirregoitia FJ, Amondarain JA, Vidaur F. Parathyroid graft function after presternal subcutaneous autotransplantation for renal hyperparathyroidism. *Arch Surg*. 2006;141:33-38.
78. Wang H, Mooney S, Wen Y, Behr B, Polan ML. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(2):370-374.
79. Oktay KH, Yih M. Preliminary experience with orthotopic and heterotopic transplantation of ovarian cortical strips. *Semin Reprod Med*. 2002;20(1):63-74.
80. Sánchez M, Alamá P, Gadea B, Soares SR, Simón C, Pellicer A. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. *Hum Reprod*. 2007;22(3):786-91.
81. Silva CM, Serakides R, Oliveira TS, Ocarino NM, Nascimento EF, Nunes VA. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;56(5):628-639.
82. Knox RV. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in pigs. *Domest Anim Endocrinol*. 2005;29(2):385-397.
83. Hunter MG, Hudson N, Mitchell M, Walker RM, Webb R. Resumption of follicle growth in gilts after ovarian autografting. *Anim Reprod Sci*. 2004 Feb;80(3-4):317-328.

84. Schwarz T, Kopyra M, Nowicki J. Physiological mechanisms of ovarian follicular growth in pigs- a review. *Acta Vet Hung.* 2008;556(3):369-378.
85. Salvetti NR, Panzani CG, Gimeno EJ, Neme LG, Alfaro NS, Ortega HH. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:68-78.