



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Vinculada à Universidade de São Paulo

**TRANSFERÊNCIA OVARIANA COMO ALTERNATIVA PARA A
RESTAURAÇÃO DAS FUNÇÕES REPRODUTIVAS EM FÊMEAS DE
CAMUNDONGOS IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA DE CO-60.**

ANDRÉIA RUIS SALGADO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientador:
Prof.^o Dr.^o. Luiz Augusto Corrêa Passos**

**São Paulo
2010**

Dedico este trabalho...

Aos meus filhos, Lucas e Vítor que são razão da minha vida e fonte de estímulo e de luta diária para me tornar uma pessoa melhor. Amo vocês.

...Desculpas ... pelos momentos de ausência durante este período.

Aos meus pais, Oberlandes e Lucínda pelo apoio incondicional, amor eterno e pelos ensinamentos que formaram os alicerces da minha história.

...Obrigada ... por estarem tão presentes nesse momento.

A minha irmã Lucilene, ao cunhado Túlio e a sobrinha Juliana (estrela da nossa vida), por todo incentivo e amor doados á distância.

...Força ... que sempre motivou minha vida.

AGRADECIMENTOS

...A Deus por me dar força interior, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades...

Ao meu orientador, **Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos**, pelo carinho e amizade, pela oportunidade de concretizar esta etapa da minha vida profissional me incentivando constantemente, por ter me conduzido com calma necessária para me ajudar a transpor os momentos difíceis, admiro o seu profissionalismo, a sua disposição, a sua competência e por ser tão humano, exemplo de cordialidade e justiça em todos os seus atos, minha eterna gratidão e admiração.

A **Dra. Nanci do Nascimento**, por permitir e apoiar a realização desse trabalho, obrigada por sua competência e presteza pelo seu incentivo em importantes etapas da elaboração, pelas enriquecedoras sugestões e inestimável apoio.

Ao **Dr. Patrick Jack Spencer**, pelo apoio e ajuda para que fosse possível a realização desse trabalho, não foi meu orientador de fato, mas sim de coração.

À **Dra. Valdeez B.V. Lapichick**, por todo carinho e amizade e principalmente por ter me apresentado ao mundo da "Ciência em animais de Laboratório".

À direção do CEMIB, **Dra. Delma Pegolo Alves** e **Armando Ferreira Lima Filho** pelo apoio na realização desse estudo.

Ao Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Unicamp – **CEMIB / UNICAMP**.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – **IPEN-CNEN/SP**.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga **Viviane Liotti Dias** por todo desabafo e pelo companheirismo em nossas “idas e vindas”.

À minha querida amiga **Ana Paula Gimenes**, pelo apoio no que fosse preciso e no apoio incondicional dos PCRs.

À amiga **Jéssica Maria Inácio Madoenho**, pela ajuda incansável e extrema atenção com os animais utilizados neste trabalho.

Ao meu amigo **Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat**, pela participação em momentos importantes e também por todo apoio experimental.

À querida **Danielle Maria Silva Yahn**, pela alegria e disposição em me ensinar fazer a perfusão e as lâminas para análise histológica dos grupos experimentais.

Ao meu amigo **Rodrigo Labello Barbosa**, pelo apoio em tudo e principalmente à ajuda nas disciplinas de Física Nuclear.

A todos os **amigos do laboratório**, pela agradável convivência e momentos de descontração em particular para a **Jéssica Moreno** por toda colaboração.

Ao amigo **Marcos Zanfolin** pelo profissionalismo e apoio para realização dos grupos experimentais.

À querida **Alda José Antonio** pela dedicação na manutenção dos animais utilizados nesse trabalho.

À **Dr. Ana Maria Aparecida Guaraldo**, pelo incentivo e estímulo em cada conquista.

Ao meu amigo **André Pires Benevides**, do departamento de informática do CEMIB, por ser tão solícito sempre que precisei.

AGRADECIMENTOS

*Aos **colegas do Controle Sanitário** e particularmente ao **Dr. Rovilson Gilioli**, pelos estímulos e parceria.*

*Aos **colegas da Secretaria do CEMIB** pela ajuda em vários momentos deste trabalho.*

*Aos **amigos da Manutenção** em especial ao **Roberto da S. Pazotto**, por tantos "soquetes".*

*Às **colegas da expedição, Érika T.P.S. Martins e Regina Maria P.S.M. Vinagre** pela organização na entrega dos animais.*

*A todos os **funcionários e amigos do CEMIB** que apoiaram a realização deste trabalho, pelo profissionalismo, amizade e apoio constantes.*

*As **colegas do IPEN, Neide e Rute**, pela competência e presteza.*

*Ao **Dr. Renato Flora** médico patologista do HC/UNICAMP, pela orientação e laudo na análise da leitura das lâminas.*

*À **Elizabeth S.R. Somessarie** e ao **Carlos Gaia da Siveira**, do CTR-IPEN, que foram tão prestativos todas as vezes que precisei para a realização da irradiação dos animais.*

*A todos os **funcionários da secretaria de Pós-Graduação do IPEN**, pela competência e dedicação.*

*A todos os **professores e colegas da pós-graduação do IPEN**, que de diferentes maneiras colaboraram para a viabilização deste trabalho.*

A todos que me ajudaram e me apoiaram nessa investida, meus sinceros agradecimentos...

“Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, e há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada...”

Antoine de Saint-Exupéry

TRANSFERÊNCIA OVARIANA COMO ALTERNATIVA PARA A RESTAURAÇÃO DAS FUNÇÕES REPRODUTIVAS EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co .

Andréia Ruis Salgado

RESUMO

Apesar dos inúmeros grupos de pesquisa de todo o mundo investigando o câncer, esta doença tem se ampliado significativamente. No caso do câncer de ovário, a despeito dos notáveis avanços observados nos tratamentos atuais, um desafio persiste: a incapacidade da preservação de oócitos em tratamento com quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia, nos quais são freqüentes os efeitos colaterais tais como a perda folicular, a infertilidade, a menopausa precoce e as falências ovarianas pós-quimioterapia, decorrentes da irradiação e pós-cirurgia. Neste sentido, o transplante de tecido ovariano pode representar uma alternativa na recuperação da capacidade fértil da mulher, bem como uma terapia de reposição hormonal após tratamento. No presente estudo, foram utilizadas linhagens de camundongos para avaliar a viabilidade do transplante ovariano antes e após a irradiação, como alternativa para a restauração das funções reprodutivas. Para tanto, fêmeas das linhagens isogênicas C57BL/6/Unib e híbridas B6C-F1/Unib, foram acasaladas com machos da linhagem C57BL/6/Unib, empregando-se diferentes protocolos com fêmeas submetidas ou não aos efeitos da radiação gama de Co-60 nas doses de 4 Gy e 6 Gy. Os resultados demonstram que a transferência ovariana restabeleceu a capacidade reprodutiva dos animais para níveis muito próximos dos normais; que o tamanho médio da ninhada, não revelou diferenças significativas após a transferência ovariana; que os fragmentos do ovário da receptora permanecem funcionais em períodos próximos pós à irradiação com 4 Gy e 6 Gy e que a irradiação nas doses de 4 Gy e 6 Gy destroem as células germinativas comprometendo a reprodução.

Palavras-chave: Reprodução; Radiação Gama; Transplante de Ovários; Animais de Laboratório.

**OVARIAN TRANSFER AS AN ALTERNATIVE TO RESTORE THE
REPRODUCTIVE FUNCTIONS IN MICE FEMALES IRRADIATED WITH
GAMA RADIATION FROM ^{60}CO .**

Andréia Ruis Salgado

ABSTRACT

Despite numerous research groups, around the world, investigating the cancer, the disease has expanded significantly. In the case of the ovarian cancer, in spite of the notable advances seen in current treatments, a challenge remains: the incapacity to cryopreserve the oocyte in cancer chemotherapy, radiotherapy or surgery, in which side effects are frequent such as follicular loss, infertility, early menopause and ovarian bankruptcy after chemotherapy, after irradiation and post-surgery. In this regard, the transplant of ovarian tissues may be an alternative in recovering the women fertility, as well a hormone replacement therapy after treatment. In our study, we used inbred strains and hybrid mice to assess the viability of ovarian transplantation before and after irradiation, as an alternative for the restoration of the reproductive functions. For that female from the C57BL/6/Unib inbred strain and from the hybrid, B6C-F1/Unib mated with C57BL/6/Unib males, employing different protocols with irradiated and non irradiated females with doses of 4 Gy and 6 Gy of Co—60 gamma radiation. The results demonstrate that the ovarian transfer restored the reproductive capacity of the females to almost the normal levels; that the litter size average (production index) showed no significant differences after the ovarian transfer; that the fragments from the ovary of the recipient female are functional in periods coming after irradiation with 4 Gy and 6 Gy and that the irradiation with 4 Gy and 6 Gy destroys the germ cells, compromising the reproduction.

Keywords: *Reproduction; Gamma Radiation; Transplantation of Ovaries; Laboratory Animals.*

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	7
3.1. O câncer de ovário	8
3.1.2. Distribuição histopatológica e etária do câncer de ovário	9
3.2. Terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer	9
3.3. Outros tipos de enfermidades que acometem as funções ovarianas ..	11
3.4. Efeitos biológicos da radiação	12
3.4.1. Sensibilidade da célula à radiação	14
3.4.2. Sensibilidade do tumor à radiação	15
3.4.3. Doses recomendadas para tratamentos de tumores	15
3.5. Fisiologia da reprodução - controle hormonal	16
3.5.1. Ciclo ovariano	17
3.6. Uso de modelos animais na experimentação científica	19
3.6.1. Fisiologia da reprodução do camundongo	20
3.6.2. Ciclo estral	21
3.7. A reprodução assistida e sua importância na vida das pessoas	21
3.7.1. Transplante ovariano	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Animais	25
4.2. Reagentes, meios e soluções	25
4.3. Ovários	26
4.4. Irradiação dos animais	26
4.5. Transplante ovariano (TO)	27
4.6. Condições utilizadas na irradiação dos grupos formados pelas fêmeas C57BL/6/Unib (doadora) e B6C F1/Unib (receptora)	28
4.7. Grupos experimentais	29
4.8. Acasalamento das linhagens doadoras e receptoras antes dos tratamentos	31
4.9. Acasalamento dos filhos de fêmeas irradiadas	31

4.10. Genotipagem das progênes de transplante ovariano -----	32
4.11. Análise macroscópica dos ovários irradiados e não irradiados -----	33
4.12. Análise histológica dos ovários: perfusão cardíaca; inclusão do material e preparo das lâminas -----	33
4.13. Análise Estatística -----	34
5. RESULTADOS -----	35
5.1. Avaliação pré-cirúrgica dos ovários -----	36
5.2. Sobrevivência das fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy -----	36
5.3. Resultados observados com o acasalamento das linhagens doadoras e receptoras antes dos tratamentos -----	36
5.3.1. Desempenho reprodutivo de fêmeas não irradiadas da linhagem C57BL/6/Unib utilizada como doadora dos ovários (G6) -----	36
5.3.2. Desempenho reprodutivo de fêmeas não irradiadas: linhagem híbrida B6C-F1/Unib utilizada como receptora dos ovários (G5) -----	37
5.4. Controle da técnica: remoção e reintrodução dos ovários (autoenxerto) -----	37
5.5. Análise estatística dos grupos controle: linhagem doadora; receptora e autoenxerto -----	38
5.6. Efeitos da irradiação no desempenho reprodutivo das linhagens utilizadas (grupos controle da irradiação) -----	38
5.6.1. Irradiação e acasalamento de fêmeas da linhagem doadora (C57BL/6/Unib): Resultados e análise estatística observados com os acasalamentos realizados 7 dias e 30 dias após a irradiação -----	39
5.6.2. Irradiação e acasalamento de fêmeas da linhagem receptora (B6C F1/Unib): Resultados e análise estatística observados com os acasalamentos realizados 7 dias e 30 dias após a irradiação -----	40
5.7. Grupos experimentais submetidos ao transplante ovariano (TO) -----	42
5.7.1. Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 7 dias após o transplante -----	42
5.7.2. Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 30 dias após o transplante -----	43

5.7.3. Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 30 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento com 7 dias após o transplante -----	43
5.8. Análise estatística dos efeitos do transplante ovariano bilateral -----	44
5.9. Resultados observados com o transplante ovariano unilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 7 dias após o transplante -----	45
5.9.1. Resultados observados com o transplante ovariano unilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 30 dias após o transplante -----	46
5.9.2. Análise estatística dos efeitos do transplante ovariano unilateral----	47
5.10. Acasalamento dos filhos de fêmeas irradiadas -----	48
5.11. Resultados observados com os marcadores moleculares de DNA: genotipagem dos animais nascidos do transplante ovariano -----	48
5.12. Análise macroscópica dos ovários irradiados e não irradiados -----	54
5.13. Resultados observados nas lâminas de cortes histológicos dos ovários -----	55
6. DISCUSSÃO -----	59
7. CONCLUSÕES -----	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	73
9. ANEXOS 1, 2 e 3-----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores Moleculares Polimórficos para as linhagens: B - BALB/c Unib e C – C57BL/6 Unib -----	32
Tabela 2: Taxa de sobrevivência das fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy ---	36
Tabela 3: Desempenho reprodutivo dos animais dos grupos controle -----	38
Tabela 4: Desempenho reprodutivo da linhagem doadora (C57BL/6/Unib) antes e após a irradiação e avaliação estatística dos efeitos da radiação sobre a reprodução -----	40
Tabela 5: Desempenho reprodutivo da linhagem receptora (B6C-F1/Unib) antes e após a irradiação e avaliação estatística dos efeitos da radiação sobre a reprodução-----	41
Tabela 6: Avaliação do desempenho reprodutivo após o transplante ovariano bilateral-----	45
Tabela 7: Avaliação do desempenho reprodutivo após o transplante ovariano unilateral-----	47
Tabela 8: Fêmeas irradiadas com 6 Gy e submetidas ao transplante ovariano unilateral (TOU), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias após a cirurgia-----	49
Tabela 9: Fêmeas irradiadas com 6 Gy e submetidas ao transplante ovariano unilateral (TOU), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias após a cirurgia -----	50
Tabela 10: Fêmeas irradiadas com 4 Gy e submetidas ao transplante ovariano unilateral (TOU), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias após a cirurgia-----	51

Tabela 11: Fêmeas irradiadas com 4 Gy e submetidas ao transplante ovariano bilateral (TOB), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias e 30 dias após a cirurgia -----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fonte Panorâmica de Cobalto 60 (⁶⁰ Co) -----	27
Figura 2: Suporte e alojamento dos animais para irradiação -----	27
Figura 3: Média e desvio padrão do grupo controle da linhagem C57BL/6/Unib não irradiado e irradiados com 4 e 6 Gy, acasalados com 7 e 30 dias após a irradiação-----	40
Figura 4: Média e desvio padrão do grupo controle da linhagem B6C-F1/Unib não irradiado e irradiados com 4 e 6 Gy, acasalados com 7 e 30 dias após a irradiação-----	42
Figura 5: Média e desvio padrão da recuperação reprodutiva após o transplante ovariano bilateral-----	45
Figura 6: Média e desvio padrão da recuperação reprodutiva após o transplante ovariano unilateral-----	47
Figura 7: Fêmea C57BL/6 irradiada (esquerda) e macho não irradiado (direita) -----	48
Figura 8: Fêmea receptora B6C-F1 irradiada -----	48
Figura 9 : Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo - 6 Gy – TO 1Ld – 1º Parto (Primers: D7Mit 310 e D11Mit 38) -----	49
Figura 10: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo - 6Gy – TO 1Ld – 1º Parto (Primer: D19Mit 19) -----	49
Figura 11: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 6 Gy – TO 2Lds – 1º, 2º e 3º Parto (Primer: D11Mit 38) -----	50
Figura 12 : Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 6 Gy – TO 2 Lds – 1º Parto (Primers: D 7Mit 310 e D 19mit 19) -----	51
Figura 13 : Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 4 Gy – TO 1	

Ld – 1º Parto (Primers: D 7Mit 310 e D 11Mit 38) -----	52
Figura 14: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 4 Gy – TO 1	
Ld – 1º Parto (Primer: D 19Mit 19)-----	52
Figura 15: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 4 Gy – TO 2	
Lds – 1º, 2º e 3º Parto (Primer: D11Mit 38) -----	53
Figura 16: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 4 Gy – TO 2	
Lds – 1ºParto (Primer: D 19Mit 19) -----	53
Figura 17: Foto do gel de agarose/eletroforese do grupo – 4 Gy – TO 2	
Lds – 1ºParto (Primer: D 7Mit 310) -----	54
Figura 18: Ovários de fêmeas irradiadas com 4 Gy e Ovários não irradiados transplantados em fêmeas irradiadas com 4 Gy -----	54
Figura 19: Ovários não irradiados transplantados em fêmeas irradiadas com 6 Gy e Ovários de fêmeas irradiadas com 6 Gy -----	55
Figura 20: Ovário não irradiado de fêmea B6C-F1 (receptora) – (HE 4X) ----	55
Figura 21: Ovário não irradiado de fêmea C57BL/6 (doadora) - (HE 4X) ----	56
Figura 22: Ovários (B6C-F1) irradiados com 4 Gy - 07 dias após a irradiação - (HE 4X) -----	56
Figura 23: Ovários (C57BL/6) irradiados com 6 Gy - 07 dias após a irradiação - (HE 4X) -----	57
Figura 24: Ovário (B6C-F1) irradiado com 4 Gy - 30 dias após a irradiação - (HE 4X) -----	57
Figura 25: Ovário (C57BL/6) irradiado com 6 Gy - 30 dias após a irradiação – (HE 4X) -----	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Avertin - 2,2,2,Tribromoethanol
B6 - C57BL/6/Unib (Linhagem Isogênica)
Bq - Bequerel
°C – Graus Célsius
CGy - Centigray
⁶⁰CO – Cobalto 60
CO₂ – Gás Carbônico
CEUA – Comitê de Ética no Uso de animais
d.a.i. = Dias Após a Irradiação
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
F1 - B6C-F1/Unib (Linhagem Híbrida)
FIV - Fertilização *in Vitro*
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
G – Grupo Experimental
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
Gy - Gray
Gy/h – Gray/ hora
HE - Hematoxilina e Eosina
HCG - Hormônio Gonadotrofina Coriônica
ICSI - *Intracitoplasmatic Sperm Injection*
INCA - Instituto Nacional do Câncer
LH - Hormônio Luteinizante
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
SI – Sem Irradiar
SPF - *Specific Pathogen Free*
TMN - Tamanho Médio da Ninhada
TO - Transplante Ovariano
TO 1Ld - Transplante Ovariano de um lado
TO 2Lds - Transplante Ovariano dos dois lado
T.O.B. - Transplante Ovariano Bilateral
T.O.U. - Transplante Ovariano Unilateral

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

Recentemente, pesquisadores da Universidade de Manchester divulgaram dados que sugerem que o câncer é uma doença moderna e provocada pela ação humana. O excesso no consumo de produtos industrializados, aliado ao estilo de vida e fatores externos como poluição e estresse, seriam os principais fatores predisponentes para o surgimento deste mal. Segundo os autores, os primeiros relatos de tumores remontam os últimos 200 anos e os órgãos comprometidos seriam o escroto de limpadores de chaminé em 1775, e o nariz em usuários de rapé, em 1761 (David & Zimmerman, 2010 e Revista Galileu, 2010). Desde então, o número de casos tem crescido significativamente e estimulou o surgimento de inúmeros grupos de pesquisa nesta área. Entretanto, a despeito dos esforços e dos significativos resultados obtidos por estes grupos, o número de casos desta doença tem se ampliado significativamente.

No caso do câncer de ovário, a incapacidade da preservação de oócitos em pacientes candidatas ao tratamento com quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia, constitui um desafio a ser vencido e contrasta com os notáveis progressos observados com as terapias atuais. É a patologia ginecológica mais difícil de ser diagnosticada, bem como de maior letalidade, onde cerca de 3/4 dos tumores malignos deste órgão apresentam-se em estágio avançado no momento de sua descoberta. Nos tratamentos utilizados, são freqüentes os efeitos colaterais observados tais como a perda folicular, a infertilidade, a menopausa precoce e também as falências ovarianas após tratamento.

No caso das falências ovarianas pós-quimioterapia, os agentes alquilantes utilizados têm efeitos gonadotóxicos atuando sobre a reserva folicular ovariana, comprometendo o órgão e conduzindo a uma perda dos folículos, proporcional à dose utilizada, sendo muito importante em mulheres mais velhas (mais de 40 anos) que possuem reserva ovariana menor. Por outro lado, mulheres jovens que não experimentam uma falência ovariana imediata podem desenvolver infertilidade e menopausa precoces, onde, mesmo com a restauração de ciclos menstruais regulares, não terão a garantia de uma fertilidade normal (Sonmezer & Oktay, 2004).

Já nos tratamentos com irradiação (radioterapia), as falências ovarianas advêm do dano gonadal induzido pelos efeitos citotóxicos diretos e indiretos no DNA. Estima-se que doses próximas a 2 Gy são capazes de destruir até 50% da reserva oocitária. Por outro lado, enquanto um total de 20 Gy induz falência ovariana em mulheres abaixo de 40 anos, em mulheres acima desta idade, 6 Gy são suficientes para promover o mesmo efeito. Além disso, mesmo o uso da radiação para o tratamento de outros males, bem como aquela empregada em procedimentos como o transplante de células tronco, estão fortemente associadas com a falência endócrina ovariana e podem comprometer a fertilidade (Wallace, 2003).

A terceira e importante causa para a falência ovariana é a cirurgia, onde doenças menos agressivas como os cistos ovarianos, cistos mucinosos e teratomas, podem ter indicação de ovariectomia bilateral, o que leva à perda da função endócrina ovariana e de 100% da reserva folicular (Sonmezer & Oktay, 2004).

Desta forma, fica claro que não somente os resultados, mas as conseqüências dos tratamentos utilizados constituem-se preocupações para estas mulheres e seus familiares e exigem o aprofundamento das pesquisas neste tema.

No presente trabalho utilizamos camundongos isogênicos e híbridos para um estudo de viabilidade do transplante ovariano como alternativa para a restauração das funções reprodutivas após a radioterapia.

Para tanto, foram empregados machos e fêmeas, das linhagens C57BL/6/Unib (isogênicas) e B6C-F1/Unib (híbridas), as quais atuaram, respectivamente, como doadoras e receptoras dos ovários. Nos ensaios, fêmeas de ambas as linhagens foram acasaladas com machos da linhagem C57BL/6/Unib, empregando-se diferentes protocolos: sem tratamento (controle da reprodução normal) e auto-enxerto (controle da técnica); após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy (controle da irradiação); e os grupos experimentais que foram irradiados e submetidos à transferência ovariana. Os acasalamentos foram programados para acontecerem 7 e 30 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy e 7 e 30 dias após a TO.

Os resultados observados com os diversos experimentos representam uma esperança para a restauração das funções reprodutivas e endócrinas nos casos de câncer de ovário, principalmente para pacientes jovens onde a remoção do órgão

afetado é a principal recomendação, o que conduz a perturbações tanto físicas como psicológicas e emocionais.

Feitas essas considerações, fica evidente a importância de estudos que busquem alternativas para minimizar os impactos da doença e melhorem a qualidade de vida das doentes por meio do restabelecimento das funções reprodutivas.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

Geral:

Avaliar a viabilidade do transplante ovariano (TO) antes e após a irradiação, como alternativa para a restauração das funções reprodutivas.

Específicos:

- Avaliar a influência das doses de 4 Gy e 6 Gy sobre a reprodução;
- Avaliar a recuperação fisiológica da reprodução das fêmeas irradiadas após a transferência ovariana, por meio de parâmetros reprodutivos;
- Realizar uma análise histológica para avaliar o comprometimento dos ovários 7 dias e 30 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy;
- Avaliar a influência de resíduos de tecido ovariano da receptora, na reprodução após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy.

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA:

3. 1 - O câncer de ovário:

O câncer de ovário, especificamente o tumor epitelial ou carcinoma, é uma doença de baixa incidência, com uma taxa bruta anual de 40 casos novos por 100.000/mulheres (Nossov *et al.*, 2008). Sabe-se que o risco de uma mulher vir a desenvolver essa neoplasia ao longo de sua vida varia, entre países, de 0,5% a 1,6% (Tangjitgamol *et al.*, 2009). Em comparação, aproximadamente 11%, desenvolverão câncer de mama. É o mais letal tipo de câncer e está entre as quatro maiores causas de morte entre as mulheres.

O câncer de ovário também apresenta a maior taxa de mortalidade entre as neoplasias ginecológicas, em razão de somente ser diagnosticado, na maioria dos casos, quando se encontra em estágio avançado. Desta forma o diagnóstico precoce é passo fundamental no manejo e controle da doença. Entretanto as estratégias de rastreamento populacional não têm se mostrado efetivas para a redução da mortalidade. O rastreamento em população de alto risco (histórico familiar), é recomendado por comitês especializados. A associação entre a dosagem sérica de CA 125 e a ultra-sonografia transvaginal, feita de forma periódica e sequencial, é o método mais utilizado em programas de rastreamento (Appel *et al.*, 2009).

Estimou-se que, em 2009, 21.550 mulheres americanas teriam diagnóstico de câncer de ovário e 14.600 morreriam em decorrência da doença. No Brasil, os dados divulgados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) não definem a exata situação da neoplasia maligna do ovário, mas a deixa entre as de baixa incidência; a mesma fica além do 11º lugar dentre aquelas que acometem as mulheres (INCA 1999).

Porém, de forma geral, tanto dados observados com a Campanha Nacional de Combate ao Câncer (Brumini *et al.*, 1982), como os do INCA de 1999, são unânimes em situar a neoplasia maligna do ovário como sendo a 3ª em ordem de incidência dentre aquelas que acometem os órgãos pélvicos femininos, ficando atrás apenas das lesões do colo e do corpo do útero. Seu patamar fica junto com as neoplasias de alta mortalidade anual (esôfago, pulmão e estômago), com taxas acima de 50% (INCA, 1999).

Sabe-se que 70% dos tumores epiteliais de ovário são diagnosticados quando a doença já está avançada e ultrapassou os limites da pelve. A taxa de sobrevivência, em 5 anos, neste grupo, é de aproximadamente 25%, enquanto que a do grupo em que a doença está confinada ao ovário é de mais de 95% (Ozols *et al.*, 2001).

Comprovadamente, o decréscimo na mortalidade somente será obtido com a identificação da doença em estádios iniciais (Rivoire *et al.*, 2006).

3.1.2. - Distribuição histopatológica e etária do câncer de ovário:

O acometimento neoplásico dos ovários acontece em diferentes linhagens histológicas, sendo clássica e de literatura mundial a frequência relativa das três principais, nas seguintes porcentagens: epitelial 85 a 90 %; cordão sexual 5 a 10 % e germinativa 3 a 5 %. Estas mesmas linhagens têm incidências variáveis na população, com relação à idade; epitelial 40 a 60 anos; cordão sexual 20 e 70 anos e a germinativa 1 a 30 anos e após os 50 anos (Brumini *et al.*, 1982 e Murta *et al.*, 1996).

A incidência diferente das linhagens histológicas relacionados à idade mostra claramente que o câncer do ovário nem sempre tem a mesma apresentação clínica, apesar de ocorrer no mesmo órgão. Isso obriga os profissionais especializados à avaliação específica de cada acometimento, pois o comportamento biológico tumoral muda em cada grupo, bem como seus índices de resposta às terapêuticas instituídas, sejam a cirurgia, a quimioterapia ou a radioterapia (Brumini *et al.*, 1982).

3.2. - Terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer:

A dificuldade do tratamento do câncer consiste em fazer a distinção entre as células malignas e as células normais do corpo. Ambas são provenientes da mesma origem e são muito semelhantes. Por isso pode não haver reconhecimento significativo por parte do sistema imunológico.

O câncer pode ser tratado de diversas maneiras, dependendo do tamanho do tumor, da sua localização, do tipo e de outros fatores. Existem três terapêuticas instituídas normalmente para o tratamento do câncer que são: cirurgias, radiações e quimioterapias (terapia com medicamentos). Em vários casos, estes métodos são combinados para obter resultados mais eficazes (Laboratório Roche, 2010).

A cirurgia é o método mais antigo para tratar o câncer, localizado, que pode ser removido cirurgicamente, uma borda de tecido saudável ao redor do tumor também é retirada para garantir que todas as células malignas foram removidas.

A cirurgia é geralmente combinada com a quimioterapia e/ou radiação para melhorar os resultados.

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito (Como funciona o câncer, 2009).

A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada (Como funciona o câncer, 2009).

A Radioterapia se baseia no emprego da radiação para tratamento das células cancerígenas com aplicação programada de doses elevadas de radiação, que podem atingir o local dos tumores ou áreas do corpo, onde se alojam as enfermidades, com a finalidade de destruir suas células, causando o menor dano possível aos tecidos. As células cancerosas crescem e se multiplicam muito mais rapidamente do que as células normais que as rodeiam (IOV, 2010).

A escolha da radioterapia depende do tipo de câncer e da profundidade em que se encontra o tumor (Prates, 2008).

A metade dos pacientes de câncer é hoje tratada com esse método e é cada vez mais expressivo o número daqueles que são curados. Milhares de pacientes se curam unicamente com o uso da radioterapia, ou usando combinações desse método com cirurgia e a quimioterapia (Prates, 2008).

Antes da cirurgia esta técnica pode ser utilizada para reduzir o tamanho dos tumores e, depois da cirurgia, pode destruir qualquer célula cancerosa que tenha ficado no leito do tumor. Além disso, a radioterapia pode ser usada para dar alívio ao paciente e melhorar a qualidade de vida, reduzir o tamanho dos tumores, diminuir ou estancar hemorragias, sedar dores ou atuar sobre outros sintomas (IOV, 2010).

3.3. - Outros tipos de enfermidades que acometem as funções ovarianas:

Com a evolução dos recursos terapêuticos e o aumento das taxas de sobrevivência dos pacientes oncológicos do sexo feminino, as repercussões tardias destas terapias, que antes eram infrequentes, assumem um papel importante quando se fala em qualidade de vida (Silva, 2006).

Dentre as complicações tardias apresentadas por estas pacientes está a perda de função ovariana, havendo relação direta com a cirurgia, o tipo e a dose da droga ou da irradiação utilizada.

Muitas pacientes com câncer sofrem a perda da função ovariana, mesmo sem o ovário estar envolvido na doença, em decorrência de tratamento radioterápico e quimioterápico (Stiff *et al.*, 1997). Essa conduta resulta em menopausa precoce e distúrbios funcionais, tais como disfunção sexual, níveis alterados de lipoproteínas, maior risco de osteoporose e de doenças cardíacas (Albert *et al.*, 2002).

Em casos de transplante de medula óssea a falência ovariana prematura acomete praticamente todas as pacientes imediatamente após o transplante. O restabelecimento da atividade ovariana está relacionado à idade da paciente no momento do tratamento, e não costuma ocorrer em pacientes que receberam irradiação de corpo inteiro (Schimmer *et al.*, 1998). Além da falência ovariana a radioterapia pode prejudicar a vascularização e o desenvolvimento uterino dependendo da idade da paciente no momento da irradiação (Holm *et al.*, 1999).

Por outro lado, algumas condições tidas como benignas, mesmo quando multifatoriais e geneticamente de trato complexo como o lúpus eritematoso sistêmico; a artrite reumatóide, a doença de Behçet e outras auto-imunes podem, ser tratadas com quimioterapia e ou radioterapia nos dias atuais e também levam à perda da função endócrina ovariana em decorrência do tratamento instituído (Mattle *et al.*, 2005).

Além da radioterapia pélvica e abdominal utilizada em tumores pélvicos e doença de Hodgkin, a irradiação crânio-espinal em tumores cerebrais e leucemia linfoblástica aguda e irradiação total usada conjuntamente aos procedimentos de transplante de células tronco também estão intimamente associadas à falência endócrina ovariana, ainda que o fracionamento da dose total permita uma menor toxicidade (Wallace, 2003).

A irradiação gama pélvica é sabidamente oncogênica. Os estudos experimentais feitos com irradiação de ovários de ratas confirmam esta pressuposição. Como ressalva, devemos lembrar que ao irradiarmos as gônadas, estas perdem as capacidades ovopositora e de produção hormonal e que esta última, poderia ser a causa da oncogênese (Novak *et al*, 1979).

A quimioterapia, além de indicada em casos de câncer, como por exemplo, o de mama, a leucemia e a doença de Hodgkin, também é utilizada em casos de doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico. O impacto da quimioterapia sobre a função ovariana pode ser evidenciado em curto prazo, por distúrbios de maturação folicular e, conseqüentemente, por alterações menstruais. Em longo prazo, podem ocorrer falência ovariana precoce e fibrose ovariana. A agressão ao ovário depende do tipo de quimioterápico escolhido, dose utilizada, duração do tratamento e, também, da idade da paciente no momento do tratamento (Hospital Santa Lúcia, 2010).

Os mecanismos do dano reprodutivo, no que tange ao tratamento de radioterapia, incluem, depleção folicular e atrofia ovariana, com conseqüente indução de um estado hipo-estrogênico; redução do volume e fluxo vascular uterino; redução da receptividade endometrial e, na vigência de gravidez, possíveis complicações obstétricas. Os fatores determinantes do dano ovariano, após irradiação da região pélvica, incluem: dose da mesma, a idade da paciente, e a associação da radioterapia com a quimioterapia (Hospital Santa Lúcia, 2010).

Atualmente, poucas são as técnicas de reprodução assistida que podem ser oferecidas de maneira concreta para estas pacientes, porém mesmo as técnicas em fase de experimentação devem estar disponíveis (Silva 2006).

3.4. - Efeitos biológicos da radiação:

No final do século XIX, com a descoberta dos raios-X por Wilhelm Conrad Röntgen, iniciou-se uma nova era na qual o desenvolvimento tecnológico, decorrente desta e de outras descobertas, propiciou a ampla utilização das radiações ionizantes em diferentes áreas. Na medicina, as radiações têm sido aplicadas na pesquisa, diagnóstico e no tratamento de doenças, principalmente as neoplásicas (Segreto & Segreto, 1997).

A radiação ionizante são ondas eletromagnéticas formadas a partir de transições nucleares; têm alta energia, ausência de massa, possuem um alto poder

de penetração e apresentam a capacidade de promover ionização e excitação nos meios (Grosh & Hoopywood, 1979). Seus efeitos podem ser diretos como uma consequência da interação direta com componentes celulares como o DNA, proteínas e lipídeos, provocando alterações estruturais em suas moléculas. Este efeito corresponde a cerca de 30% do efeito biológico das radiações; ou indiretos, quando a radiação interage com as moléculas de água presentes no meio intracelular, produzindo os chamados produtos da radiólise da água (OH•, H•, elétron aquoso, etc...). O efeito indireto corresponde a cerca de 70% do efeito biológico produzido pelas radiações, devendo-se este fato, à grande presença de água na célula (Michaels & Hunt, 1978). No caso das proteínas, o principal efeito se dá pela interação dos produtos da radiólise da água com aminoácidos das cadeias protéicas promovendo uma desaminação (Butler *et al*, 1987; Garrison, 1987). Apesar de estes efeitos serem estocásticos, alguns sítios podem ser mais favoráveis, devido à transmissão de energia intramolecular (Farragi *et al*, 1978).

Neste sentido, os efeitos sobre as proteínas poderão comprometer a fisiologia de processos metabólicos importantes. Destruição de aminoácidos e rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica, por agregação, são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer e que conduzem às mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas (Adams *et al*, 1972; Dertinger & Jung, 1970; Garrison, 1987; Turner, 2004).

Um outro evento importante sobre os seres vivos é a influência da radiação sobre as células. As células quando expostas à radiação sofrem ação de fenômenos físicos, químicos e biológicos (Efeitos da Radiação em Seres Vivos, 2010). O corpo humano é constituído por cerca de 5×10^{12} células, muitas das quais altamente especializadas para o desempenho de determinadas funções. Quanto maior o grau de especialização, isto é, quanto mais diferenciada for a célula, mais lentamente ela se dividirá. Uma exceção significativa a essa lei geral é dada pelos linfócitos, que, embora só se dividam em condições excepcionais, são extremamente radiosensíveis (Efeitos da Radiação em Seres Vivos, 2010).

Desta forma, um organismo complexo exposto às radiações sofre determinados efeitos somáticos, que lhe são restritos e outros, genéticos, transmissíveis às gerações posteriores. Os fenômenos físicos que intervêm são

ionização e excitação dos átomos. Estes são responsáveis pelo compartilhamento da energia da radiação entre as células (Michaels & Hunt, 1978).

Os fenômenos químicos sucedem aos físicos e provocam rupturas de ligações entre os átomos formando radicais livres num intervalo de tempo pequeno.

Além destas alterações funcionais os efeitos biológicos caracterizam-se também pelas variações morfológicas. Entendem-se como variações morfológicas as alterações em certas funções essenciais ou a morte imediata da célula, isto é, dano na estrutura celular. É assim que as funções metabólicas podem ser modificadas ao ponto da célula perder sua capacidade de efetuar as sínteses necessárias à sua sobrevivência (Efeitos da Radiação em Seres Vivos, 2010).

3.4.1. - Sensibilidade da célula à radiação:

Nem todas as células vivas têm a mesma sensibilidade à radiação. As células que tem mais atividade são mais radiosensíveis, por exemplo, as células da pele, do revestimento intestinal ou dos órgãos hematopoiéticos, em uma interação direta com a radiação podem resultar na morte ou mutação destas células, enquanto que em outra célula o efeito pode obter menor conseqüência (Revista Ciência Hoje, 2000).

Assim, as células vivas podem ser classificadas segundo suas taxas de reprodução, que também indicam sua relativa sensibilidade à radiação. Isto significa que diferentes sistemas celulares têm sensibilidades diferentes. Desta forma, linfócitos e células que produzem sangue estão em constante reprodução e são altamente sensíveis; células reprodutivas e gastrintestinais não se reproduzem tão rápido, e são, portanto, muito sensíveis e células nervosas e musculares são as mais lentas e, portanto, são as menos sensíveis (Efeitos da Radiação em Seres Vivos, 2010).

As células têm uma incrível capacidade de reparar danos, por isto, nem todos os efeitos da radiação são irreversíveis. Em muitos casos, as células são capazes de promoverem um reparo e funcionarem normalmente. Em outros, no entanto, o dano é sério demais, levando a célula à morte. Por vezes, embora a célula danificada consiga se reproduzir, as células filhas terão falta de algum componente e morrerão. Finalmente, também ocorre da célula ser afetada de tal forma que não morre, mas fica modificada, se reproduz e perpetua a mutação, o

que poderá significar o começo de um tumor maligno (Efeitos da Radiação em Seres Vivos, 2010).

3.4.2. - Sensibilidade do tumor à radiação:

A taxa de reprodução das células que formam um órgão não é o único critério para determinar a sensibilidade geral. A importância relativa do órgão para o bem estar do corpo também é importante (energia atômica, 2010).

De certa forma, um cenário favorável ao tratamento com a radiação é um tumor maligno, uma vez que se constitui em um sistema celular muito sensível a este tipo de terapia. Isto porque a camada externa de células se reproduz rapidamente e também tem um bom suprimento de sangue e oxigênio. As células são mais sensíveis quando estão se reproduzindo e a presença de oxigênio aumenta a sensibilidade à radiação (energia atômica, 2010).

Células com oxigênio insuficiente tendem a ser inativas, tais como as células localizadas no interior do tumor maligno (Revista Ciência Hoje, 2000).

Quando o tumor é exposto à radiação, a camada externa de células que estão se dividindo é destruída, fazendo com que o tumor diminua de tamanho. Se o tumor receber uma alta dose para destruí-lo completamente, o paciente também poderá morrer. Assim, é aplicada uma dose baixa no tumor a cada dia, possibilitando que os tecidos não afetados tenham a chance de se recuperar de qualquer dano enquanto, gradualmente, diminui o tumor que é significativamente mais sensível (Revista Ciência Hoje, 2000).

3.4.3. - Doses recomendadas para tratamentos de tumores:

A radioterapia é o método de tratamento local ou loco-regional, do câncer, que utiliza equipamentos e técnicas variadas para irradiar áreas do organismo humano, prévia e cuidadosamente demarcadas (Doses do Governo, 2010).

Os seres vivos não são igualmente sensíveis às radiações. Com base em experiências realizadas em laboratório, as doses equivalentes letais para os diferentes seres vivos foram estimadas e para os mamíferos situa-se entre 2 e 10 Gy (Okumo, 2009).

Os efeitos da radiação também dependem da porcentagem do organismo que é exposto. Por exemplo, mais de 6 Gy costumam provocar a morte quando a radiação se distribui sobre toda a superfície corporal. No entanto, quando se limita

a uma pequena área, como acontece na terapia contra o câncer é possível aplicar 3 ou 4 vezes esta quantidade sem que se produzam danos graves no organismo. A distribuição da radiação no corpo também é importante. As porções em que as células se multiplicam rapidamente, como o intestino e a medula óssea, são mais danificados pela radiação do que os tecidos cujas células se reproduzem mais lentamente, como os músculos e os tendões. Durante a radioterapia contra o câncer, faz-se todo o possível para proteger as partes mais vulneráveis do organismo, com o fim de poder utilizar doses mais elevadas (Laboratórios Merck, 2010).

A radioterapia externa, ou seja, aquela cuja fonte de radiação está localizada longe do organismo como a contatoterapia, a roentgenterapia superficial, a roentgenterapia profunda, a cobaltoterapia e a radioterapia por acelerador linear, consiste na aplicação diária de uma dose de radiação, expressa em centigray (cGy) ou em gray (Gy), durante um intervalo de tempo pré-determinado. Esta dose varia de 180 a 200 cGy/dia e o tempo médio de tratamento é de 4 a 5 semanas, o que perfaz uma dose total de 4.500 a 5.000 cGy, ou 45 a 50 Gy. É possível utilizar-se tanto intervalos de tempo como doses menores (700 a 2.000 cGy) ou maiores (7.000 a 8.000 cGy) (Doses do Governo, 2010).

A variação da dosagem está relacionada com a finalidade do tratamento, com a localização e o tipo histológico do tumor (Doses do Governo, 2010).

3.5. - Fisiologia da Reprodução - Controle Hormonal:

A atividade do ciclo reprodutivo feminino é controlada pelo hipotálamo e pela hipófise, duas pequenas glândulas pertencentes ao sistema endócrino, localizadas na base do cérebro, que produzem hormônios, cujos efeitos sobre os ovários controlam o seu funcionamento (Fisiologia da reprodução, 2010).

O aparelho genital feminino permanece inativo durante toda a infância e apenas começa a funcionar a partir da puberdade, quando o hipotálamo começa a elaborar, de maneira cíclica, hormônios, denominados de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), os quais atuam sobre a hipófise e estimulam a produção, nesta glândula, dos hormônios que controlam o funcionamento dos ovários. Esta influência hormonal faz com que a hipófise libere, de forma cíclica, dois hormônios designados como gonadotrofinas: o hormônio

folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) (McDonald, 1989; Fisiologia da reprodução, 2010).

Estes hormônios controlam a atividade dos ovários através da estimulação cíclica do crescimento de determinados folículos ovarianos, da síntese de hormônios sexuais femininos (estrógenos e progesterona) e da ovulação, num processo denominado "ciclo ovariano". Por sua vez, os hormônios produzidos pelos ovários, entre outros efeitos, preparam ciclicamente o útero para que, em caso de fecundação, possa acolher o embrião e possibilitar o desenvolvimento de uma gravidez (McDonald, 1989 e Hafez, 1993).

3.5.1. - Ciclo ovariano:

No momento do nascimento, os ovários humanos são constituídos por cerca de 400 000 folículos primários, cada um dos quais composto por um ovócito primário, que corresponde a uma célula reprodutora imatura. A partir da puberdade, o estímulo das gonadotrofinas hipofisárias que chegam aos ovários através da circulação proporciona o amadurecimento progressivo dos folículos. Visto que as gonadotrofinas são produzidas em quantidades oscilantes, a atividade dos ovários desenvolve-se em ciclos (Fisiologia, 2010)

Cada ciclo inicia-se através do aumento dos níveis da gonadotrofina FSH, um hormônio que proporciona o desenvolvimento de vários folículos primários e o amadurecimento dos ovócitos primários presentes no seu interior. O crescimento de um folículo primário começa com o aumento de volume e multiplicação das células foliculares, o que proporciona a formação da denominada camada granulosa. Ao mesmo tempo, o ovócito primário inicia um processo de amadurecimento, no qual aumenta de tamanho e forma uma membrana denominada zona pelúcida à sua volta, rodeada por uma camada de células foliculares designada coroa radiada (Fisiologia, 2010).

O progressivo crescimento do folículo origina um acúmulo de líquido no seu centro, proporcionando a formação de uma cavidade, o que provoca a deslocação do ovócito e das células que o rodeiam, para um pólo. Entretanto, o estroma ovariano que rodeia o folículo constitui uma espécie de membrana diferenciada em duas camadas: a teca interna, formada essencialmente por células e abundantes capilares sanguíneos, e a teca externa, composta essencialmente por fibras conjuntivas. A influência do FSH faz com que as células da teca interna comecem

a elaborar estrogênios (hormônios femininos), que passam para a circulação, de modo a aumentar progressivamente os seus níveis. A partir do momento em que os níveis de estrogênios já são elevados, a hipófise começa igualmente a segregar LH, uma gonadotrofina que estimula a última fase do crescimento do folículo.

Todos estes eventos proporcionam a transformação dos folículos primários em folículos maduros, denominados folículos De Graaf, enquanto que a interrupção do desenvolvimento dos folículos restantes nas fases intermédias, provoca a atrofia dos mesmos e são por isso denominados de folículos atrésicos. O folículo De Graaf por sua vez, alcança uma proeminência na superfície do ovário, em cujo interior o processo de diferenciação do ovócito primário origina a formação de uma célula reprodutora feminina madura denominada óvulo. Nesta fase, o óvulo e as células da coroa radiada que o rodeiam desunem-se da parede do folículo e começam a flutuar no líquido folicular, provocando um aumento tão significativo da sua quantidade que as camadas celulares que o acolhem ficam muito distendidas e finas, ocorrendo o rompimento do folículo De Graaf, que se abre na superfície do ovário e expulsa para o exterior, o líquido folicular, onde o óvulo flutua, e as células da coroa radiada; este é o processo da ovulação.

Após a ovulação, a influência do LH proporciona a transformação da camada granulosa e da teca interna, que permanecem no ovário numa estrutura denominada corpo lúteo ou amarelo, cujas células continuam a segregar estrogênios e, a partir desse momento, começam igualmente a produzir um outro tipo de hormônio feminino, a progesterona, cuja principal função consiste em preparar o útero para a eventual chegada de um óvulo fecundado. Caso não se produza a fecundação, devido ao fato de a hipófise apenas segregar LH durante alguns dias, o corpo lúteo vai progressivamente deixando de elaborar hormônios, atrofia-se e transforma-se, em uma estrutura cicatricial inativa denominada corpo branco. Por outro lado, em caso de fecundação e conseqüente gravidez, o hormônio gonadotrofina coriônica (HCG), secretada em razão da gestação, mantém o corpo lúteo em funcionamento, de modo a continuar produzindo progesterona durante alguns meses, acabando posteriormente por se atrofiar deixando uma pequena cicatriz no ovário (Fisiologia, 2010, McDonald, 1989 e Hafez, 1993).

3.6. - Uso de modelos animais na experimentação científica:

O crescimento exponencial da pesquisa biomédica no último século revelou importantes descobertas nas diversas áreas do conhecimento humano e foi decisivo para a sociedade, induzindo alterações profundas em suas concepções e conduta (Passos, 2003).

Muitas das mudanças observadas atualmente decorrem dos avanços na área médica, onde a eficácia das vacinas, soros e fármacos passaram a influenciar a qualidade de vida das pessoas, e decorreu do uso intensivo de animais de laboratório como modelo experimental (Passos, 1996).

Embora o emprego de animais com propósitos científicos tenha se iniciado na Grécia antiga, foi somente no século XVII com a “Revolução Científica”, que seu uso se acentuou estimulando a transferência para os serviços médicos, da confiança até então depositada no curandeirismo (Passos 1996).

Desta forma, a investigação científica ocupando animais de experimentação, passou a ser determinante para a confiança na terapêutica médica, por se saber que antes de utilizadas nos seres humanos, as drogas são investigadas em várias espécies de animais de laboratório, sendo atualmente exigidas condições que não provoquem dor ou sofrimento desnecessário (Rivera, 2002). Assim sendo, o emprego de modelos animais na investigação biomédica é fundamental e tem contribuindo para reduzir o sofrimento das pessoas e dos animais.

Por meio da experimentação biomédica com modelos animais, tem sido possível a descoberta de novas tecnologias e a inserção de medidas profiláticas e terapêuticas de enfermidades que acometem os seres humanos e os animais. Para tanto, animais de várias espécies são empregados sendo, entretanto, os camundongos, os modelos mais utilizados e por conseguinte, os mais conhecidos cientificamente.

Os animais foram indispensáveis nas descobertas que permitiram o uso terapêutico de antibióticos e o tratamento de diversas doenças, evitando assim epidemias e epizootias, bem como proporcionaram o desenvolvimento e otimização de técnicas de transplantes de órgãos e o uso de fármacos com analgésico, anestésicos e antidepressivos, entre outros (Fagundes & Taha, 2004; Andrade, 2006).

Embora existam atualmente diversos grupos de pesquisa envolvidos com a descoberta e aplicação de métodos alternativos em substituição aos animais

de laboratório, os modelos animais, como os camundongos, ainda são indispensáveis e apresentam a vantagem de fornecerem informações sobre o organismo como um todo, fato impossível de ser observado em processos isolados, nos quais não se pode reproduzir a integração entre tecidos, órgãos e sistemas (Heywood, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995; Salén, 1995; Snitkoff, 2004).

Contudo, os impactos negativos do uso de modelos animais na experimentação científica podem ser reduzidos e para isso deve ser dada atenção aos critérios éticos e de bem estar animal. Neste sentido, o uso adequado de modelos animais exige a formação de profissionais qualificados para atender tanto às necessidades e exigências dos procedimentos experimentais bem como às atividades relacionadas aos propósitos didático-científicos e ao desenvolvimento e inovações tecnológicas (Chorilli *et al.*, 2007).

3.6.1. - Fisiologia da reprodução do camundongo:

De acordo com McDonald (1989) a puberdade na fêmea é definida com o início do ciclo reprodutivo e é a consequência de uma série cumulativa de eventos hormonais. Para JAINUDEEN & HAFEZ (1993) a puberdade é a idade quando ocorre o primeiro estro acompanhado de ovulação.

Após a puberdade, a fêmea desenvolve um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem alterações morfológicas no sistema reprodutivo e mudanças comportamentais no animal. Estas modificações fisiológicas e de comportamento são cíclicas e contínuas, sendo interrompidas pela gestação ou alguma condição patológica (McDonald, 1989 e Hafez, 1993).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que são os hormônios hipotalâmicos, as gonadotrofinas produzidas pela adenohipófise e os esteróides secretados pelos ovários. O controle da secreção das gonadotrofinas durante o ciclo estral exige um delicado balanço entre as complexas interações hormonais (Fisiologia, 2010).

Núcleos hipotalâmicos secretam hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que através de um sistema circulatório especial, chamado sistema porta hipotalâmico-hipofisário, estimulam a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que na corrente circulatória promovem a síntese de estrógeno e progesterona pelos ovários (Fisiologia da Reprodução, 2010).

Estes dois últimos exercem influências, através de mecanismos de *feedback* positivo ou negativo, diretamente na hipófise ou no hipotálamo, tornando possível a continuidade dos eventos cíclicos que caracterizam o ciclo estral (Fisiologia da Reprodução, 2010).

3.6.2. - Ciclo estral:

O camundongo torna-se apto à reprodução aos 30 dias de idade, quando os efeitos hormonais iniciais já estão presentes em ambos os sexos, evidenciados externamente pela abertura da vagina nas fêmeas e pela descida e aumento dos testículos nos machos (Andrade, 2006).

O ciclo estral completo dura de quatro a cinco dias, ou seja, a cada cinco dias ocorre ovulação e é dividido nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro começa com a fase folicular do ovário, que culmina no estro (cio). O metaestro e diestro caracterizam-se pela fase luteínica do ovário (Salgado & Passos, 2009).

Quando agrupadas, as fêmeas podem permanecer em anestro (ausência de ciclo estral) de uma maneira continuamente até que sejam expostas a um macho e ou sua urina. A partir desse momento o estro retorna no prazo de até 48 horas, sendo que a este fenômeno dá-se o nome de Efeito de Whitten (Santos, 2002).

Por vezes pode-se observar a presença de um *plug* ou tampão vaginal após o estro, indicativo da ocorrência da cópula e início da gestação que dura entre 19-21 dias (Santos, 2002 e Andrade, 2006).

É importante salientar que o camundongo é extremamente susceptível a mudanças nas condições ambientais. Pequenas flutuações na temperatura, alojamento, ritmo circadiano, dieta entre outros fatores podem causar modificações em sua fisiologia. Além disso, aspectos relacionados ao microambiente (tipo de cama, ração, ventilação, etc) e macroambiente (ruídos, temperatura, umidade, luminosidade) quando inadequados atuam como agentes causadores de um desequilíbrio fisiológico e metabólico, comprometendo o resultado experimental interferindo na reprodução (Benavides & Guenet, 2005).

3.7. - A reprodução assistida e sua importância na vida das pessoas:

Com o sucesso advindo após o nascimento do primeiro bebê de proveta em 1978, muitas mulheres com dificuldades reprodutivas passaram a alimentar o sonho

da maternidade. Neste sentido, a possibilidade da fertilização acontecer fora do organismo, em condições de laboratório serviu de alento para pacientes em tratamentos que reduziam as possibilidades da concepção. Desde então, diversas técnicas têm sido desenvolvidas evidenciando a importância do estudo de fatores que podem interferir na fertilização do óvulo pelo espermatozóide (Petroianu, *et al*, 2006).

Desta forma, as tecnologias de reprodução assistida permitem atualmente, a reversão de problemas como aqueles decorrentes da perda da função ovariana após tratamentos cirúrgicos, quimioterápicos e ou radioterápicos, bem como de déficits de fertilidade adquiridos com o uso prolongado de drogas que alterem a fisiologia normal do aparelho reprodutor (Petroianu, *et al*, 2006).

Para tanto, diversas tecnologias são empregadas, tais como a fertilização *in vitro* (FIV); a ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) e a transferência de tecido ovariano (Trounson, 1996; Hogan, *et al*, 1994).

Além das questões relacionadas com a viabilização da gestação, outras são também igualmente importantes e assumem um caráter acadêmico e ou biotecnológico com reflexos diretos na vida das pessoas (Benavides, 2005).

3.7.1. - Transplante ovariano:

A preocupação com o futuro reprodutivo de pacientes que serão submetidos a diversos tratamentos oncológicos, merece cada vez mais espaço.

Apesar dos avanços terapêuticos, os tratamentos oncológicos ainda são incapazes de combater a doença sem interferir na capacidade reprodutiva da paciente.

A princípio, a preocupação dos pesquisadores era prolongar a vida destas pessoas sendo secundárias outras questões. Contudo, estudos realizados em modelos animais permitiram investigar o emprego do transplante ovariano como alternativa para a redução dos efeitos dos tratamentos. Atualmente, transplantes de ovário são raros e realizados com o objetivo de preservar a fertilidade de algumas mulheres após o tratamento de câncer (Transplante de ovário, 2010).

Na tentativa de incrementar o potencial reprodutivo humano associado às técnicas de reprodução assistida, contamos com constantes avanços disponíveis nas técnicas de criopreservação - descongelamento de espermatozoides e embriões conseguindo-se sucesso com estas tecnologias.

Outro enfoque na manutenção do potencial reprodutivo e que recentemente tem tido maior interesse é o transplante ovariano. Isso ocorre devido às taxas de sobrevivência em longo prazo de pessoas jovens com doenças malignas, devido aos tratamentos com terapias oncológicas modernas incluindo quimioterapia e radioterapia. Como resultado, um grande número de pacientes jovens é curado de seus cânceres e podem realizar o sonho da maternidade (Blatt, 1999).

A preservação ovariana através de transplante de tecido ovariano à fresco ou criopreservado tem várias vantagens teóricas. Por exemplo, o transplante ovariano autólogo (mesma paciente) à fresco em local heterotópico (outro local, que não o originário do ovário) pode permitir remoção do tecido ovariano do campo de radiação terapêutica, mantendo dessa forma, o tecido ovariano e promovendo uma terapia estrogênica a longo prazo além da preservação de gametas (Clínica Conceber, 2010).

Por fim, o estudo do transplante das gônadas com modelos animais, demonstrou que ele pode ocorrer de quatro maneiras: entre um mesmo indivíduo, onde o doador e o receptor são únicos (autotransplante); entre animais geneticamente idênticos (isotransplantes); entre animais da mesma espécie, mas com características genéticas diferentes (alotransplantes) e também entre animais de espécie diferente, como por exemplo, quando um pedaço de ovário de vaca é transplantado para um camundongo (xenotransplante). Neste caso, o corpo do camundongo vai manter e favorecer o crescimento do óvulo da vaca até que este esteja pronto para ser fecundado em laboratório, e depois de produzido, o embrião poderá ser implantado na vaca (transplante autólogo, 2010).

A lesão de isquemia é uma causa importante de falha no transplante de órgãos. No caso do transplante de ovário, estudos experimentais mostraram que a isquemia que ocorre no transplante, prévia à revascularização, é o principal fator responsável pela perda de grande quantidade da população folicular (cerca de 35 a 50% dos folículos primordiais), amplificando os prejuízos citotóxicos observados com a quimioterapia (transplante autólogo, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4- MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Animais:

Foram utilizados como reprodutores, camundongos machos, com 10 a 12 semanas de idade, da linhagem isogênica C57BL/6/Unib e fêmeas com idade entre 10 e 12 semanas, também da linhagem C57BL/6/Unib, como doadoras dos ovários. Esta linhagem possui o fenótipo preto, é a mais utilizada nas pesquisas biomédicas e suas condições de manejo e reprodução estão bem estabelecidas.

Como receptoras dos ovários transplantados, foram utilizadas fêmeas da linhagem híbrida B6C-F1/Unib de pigmentação agouti. Esta linhagem é formada a partir de fêmeas da linhagem isogênica C57BL/6/Unib (fenótipo preto) acasaladas com machos da linhagem isogênica BALB/c/Unib (fenótipo albino). Este modelo possui 50% da constituição genética da fêmea doadora, excluindo a possibilidade de rejeição dos ovários implantados bem como o seu uso facilita a análise das progênes.

Os animais foram produzidos em condições SPF - *Specific Pathogen Free* (Cunliffe-Beamer,1987) no CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Animais de Laboratório da UNICAMP. Os animais foram mantidos na Unidade de Quarentena, distribuídos em grupos experimentais e mantidos em unidades isoladoras flexíveis e em Racks Ventiladas - ALESCO, proporcionando maior bem estar e a preservação de seu *status* sanitário (ALESCO Ind. e Com.).

A sala possui sistema de purificação de ar mantendo o ambiente controlado, e toda a manipulação dos animais foi realizada em cabines de troca padrão fluxo laminar vertical CLII A1 – biológica.

Os animais foram submetidos à fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os experimentos envolvendo animais de laboratório foram aprovados pelo CEUA do IPEN – Protocolo nº 63 em anexo.

4.2. Reagentes, meios e soluções:

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise e a água purificada em sistema Milli-Q.

Os meios foram preparados próximo à realização das técnicas, filtrados, aliquotados e conservados por 1 mês a -20°C ou 1 semana em geladeira.

Anterior ao uso, os meios foram equilibrados *overnight* em estufa a 5% de CO_2 , 37°C , e 95% de umidade.

4.3. Ovários:

Foram utilizados ovários removidos de fêmeas C57BL/6/Unib (doadora), não irradiada.

Os ovários foram removidos cirurgicamente e mantidos em meio Witthen, em estufa com 5% de CO_2 a 37°C e 95% de umidade relativa até o momento da cirurgia (Salgado & Passos, 2009).

Foram transplantados ovários inteiros em grupos experimentais formados por fêmeas receptoras híbridas B6C-F1/Unib.

4.4. Irradiação dos animais:

Foram irradiadas 154 fêmeas receptoras da linhagem híbrida B6C-F1/Unib. A irradiação foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em fonte de Cobalto 60 (^{60}Co - GAMMACELL, *Atomic Energy of Canadá, Ltda.*), de forma homogênea, em presença de oxigênio (Figuras 1 e 2). Os animais foram irradiados com as doses de 4 Gy e 6 Gy, a uma distância de 40 cm da fonte (Atividade da fonte = 1,8559 Bq) e uma taxa de dose 28,4 Gy/h. Estas doses simulam nos animais, condições próximas àquelas empregadas na radioterapia para tratamento de tumores nos humanos (DL50% igual a 4 Gy), e uma vez que os camundongos suportam doses maiores (DL50% igual a 8 Gy) foi utilizado também a dose de 6 Gy (Junior, et al., 2004).

As fêmeas foram acompanhadas por um período de até 48hs após o tratamento e a mortalidade foi registrada.



Figura 1: Fonte Panorâmica de Cobalto 60 (^{60}Co)

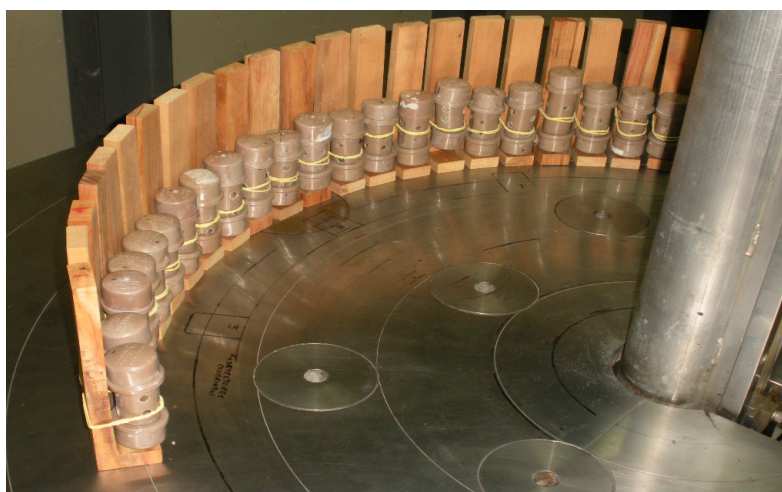


Figura 2: Suporte e alojamento dos animais para a irradiação

4.5. Transplante ovariano:

Para a realização dos transplantes ovarianos as fêmeas doadoras (C57BL/6/Unib) foram sacrificadas por deslocamento cervical e os ovários rapidamente removidos e mantidos em estufa de CO_2 , conforme descrito no item 4.3.

O transplante ovariano foi realizado em fêmeas receptoras híbridas, anestesiadas com 0,2mL de Avertin (2,2,2,tribromoethanol), injetados intraperitonealmente.

No procedimento cirúrgico, com a fêmea anestesiada, foi realizada a tricotomia e assepsia dorsal, a cavidade peritoneal foi aberta e os cornos uterinos expostos para o transplante.

No procedimento a bolsa ovariana é aberta, o ovário original é removido e substituído pelo ovário da fêmea doadora. Em seguida a bolsa é suturada e o conjunto é devolvido ao seu sítio de origem no peritônio.

Finalmente a parede do peritônio e a pele são suturadas e a fêmea é mantida, com analgesia, em manta aquecida para acompanhamento do pós-operatório (Salgado & Passos, 2009).

4.6. Condições utilizadas na irradiação dos grupos formados pelas fêmeas C57BL/6/Unib (doadora) e B6C-F1/Unib (receptora):

Fêmeas das linhagens receptoras e doadoras e dos grupos experimentais foram submetidas às seguintes condições de irradiação:

1º Grupo: Irradiação com 4 Gy e uma taxa de dose igual a 28,4 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 507 segundos. A atividade da fonte foi de 1,8559 Bq.

2º Grupo: Irradiação com 4 Gy e uma taxa de dose igual a 28,1 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 513 segundos. A atividade da fonte foi de 1,8354 Bq.

3º Grupo: Irradiação com 6 Gy e uma taxa de dose igual a 27,5 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 785 segundos. A atividade da fonte foi de 1,7952 Bq.

4º Grupo: Irradiação com 4 Gy e uma taxa de dose igual a 26,9 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 535 segundos. A atividade da fonte foi de 1,7560 Bq.

5º Grupo: Irradiação com 4 Gy e uma taxa de dose igual a 24,6 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 585 segundos. A atividade da fonte foi de 1,6110 Bq.

6º Grupo: Irradiação com 6 Gy e uma taxa de dose igual a 24,6 Gy/h. Os animais foram posicionados a uma distância de 40 cm da fonte e irradiados por 878 segundos. A atividade da fonte foi de 1,6110 Bq.

4.7. Grupos experimentais:

Apresentamos abaixo, os grupos experimentais e os tratamentos ao qual eles foram submetidos.

Cada grupo experimental foi formado de 5 a 10 fêmeas, todos os grupos permaneceram por um período de 4 meses, tempo suficiente para acompanhar 3 gestações.

As fêmeas receberam marcação individual (permanente), anterior aos acasalamentos.

Foram formados 11 grupos, sendo que cada grupo foi dividido em A, B e C de acordo com o período do acasalamento de cada grupo, perfazendo um total de 184 fêmeas:

G1A: Fêmeas B6C-F1/Unib Irradiada com 4 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos imediatos da radiação com 4 Gy no genótipo receptor);

G1B: Fêmeas B6C-F1/Unib Irradiada com 4 Gy e acasaladas 30 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos tardios da radiação com 4 Gy no genótipo receptor);

G2A: Fêmeas B6C-F1/Unib Irradiadas com 6 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos imediatos da radiação com 6 Gy no genótipo receptor);

G2B: Fêmeas B6C-F1/Unib Irradiadas com 6 Gy e acasaladas 30 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos tardios da radiação com 6 Gy no genótipo receptor);

G3A: Fêmeas C57BL/6Unib Irradiadas com 4 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos imediatos da radiação com 4 Gy no genótipo doador);

G3B: Fêmeas C57BL/6Unib Irradiadas com 4 Gy e acasaladas 30 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos tardios da radiação com 4 Gy no genótipo doador);

G4A: Fêmeas C57BL/6Unib Irradiadas com 6 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos imediatos da radiação com 6 Gy no genótipo doador);

G4B: Fêmeas C57BL/6Unib Irradiadas com 6 Gy e acasaladas 30 dias após a irradiação (grupo controle sobre os efeitos tardios da radiação com 6 Gy no genótipo doador);

G5: Acasalamento das fêmeas B6C-F1/Unib, não irradiadas (controle do acasalamento da linhagem receptora) com idade entre 8 e 10 semanas;

G6: Acasalamento das fêmeas C57BL/6/Unib, não irradiadas (controle do acasalamento da linhagem doadora) com idade entre 8 e 10 semanas;

G7: Remoção e re-introdução dos ovários (controle da técnica) acasaladas 7 dias após a TO;

G8A: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 4 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G8B: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 4 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 30 dias após a T.O.;

G8C: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 4 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 30 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G9A: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 6 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G9B: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 6 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 30 dias após a T.O.;

G9C: Transplante bilateral de ovário inteiro realizado em receptora irradiada com 6 Gy. A transferência ovariana (T.O.) foi realizada 30 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G10A: Transplante unilateral de ovário inteiro e preservação unilateral do ovário da receptora irradiada com 4 Gy. A transferência ovariana foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G10B: Transplante unilateral de ovário inteiro e preservação unilateral do ovário da receptora irradiada com 4 Gy. A transferência ovariana foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 30 dias após a T.O.;

G11A: Transplante unilateral de ovário inteiro e preservação unilateral do ovário da receptora irradiada com 6 Gy. A transferência ovariana foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 7 dias após a T.O.;

G11B: Transplante unilateral de ovário inteiro e preservação unilateral do ovário da receptora irradiada com 6 Gy. A transferência ovariana foi realizada 7 dias após a irradiação. Os animais foram acasalados 30 dias após a T.O.

Todos os animais, exceto os grupos controle G5, G6 e G7, foram acasalados com machos da linhagem C57BL/6/Unib nos intervalos de 07 dias e 30 dias após a irradiação e ao transplante ovariano.

Os machos foram empregados apenas para a reprodução, podendo ser fornecidos para a comunidade posteriormente, corroborando os objetivos dos 3Rs (Russell et al,1959).

4.8. Acasalamento das linhagens doadoras e receptoras antes dos tratamentos:

O desempenho reprodutivo das linhagens utilizadas nos experimentos foi registrado para posterior comparação com os grupos experimentais.

O registro destes dados permitirá descartarem-se interferências na reprodução, decorrentes do alojamento, dieta e manuseio.

As fêmeas foram acompanhadas até o terceiro parto por ser este prazo suficiente para a estabilização reprodutiva dos animais.

A análise de desempenho foi realizada tomando-se por base o tamanho médio da ninhada (índice de produção). Este cálculo permitirá a comparação entre os diferentes grupos, pois ele considera a participação apenas das fêmeas que pariram.

4.9. Acasalamento dos filhos de fêmeas irradiadas:

A fim de se investigar os efeitos da radiação sobre a progênie, foram promovidos acasalamentos com os filhos das fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy e que foram acasaladas 07 e 30 dias após a irradiação.

Os acasalamentos foram realizados entre irmãos e possibilitará avaliar os efeitos da radiação na descendência, bem como a taxa de produtividade dos animais.

Após quatro semanas do nascimento, ao desmame, os filhotes foram analisados pelo fenótipo.

4.10. Genotipagem das progênes de transplante ovariano:

Após a transferência dos ovários, testes moleculares foram realizados.

Os resultados indicariam se a progênie é produto dos ovários transplantados ou de resíduos dos ovários da receptora que ainda estejam funcionais.

As técnicas moleculares utilizadas foram as mesmas empregadas nas rotinas do Laboratório de Controle Genético CEMIB / UNICAMP (Passos,1998) e a fonte do DNA foi um fragmento da orelha. Para a realização dos testes, as amostras foram extraídas por precipitação alcoólica e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR).

Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio de acordo com SAMBROOK *et al*,1989.

Foram utilizados 3 marcadores moleculares polimórficos de microsatélites, selecionados para discriminarem as linhagens C57BL/6/Unib e BALB/c/Unib. Estes marcadores estão indicados na tabela 1:

Tabela1: Marcadores Moleculares Polimórficos para as linhagens - **B** – BALB/c Unib e **C** – C57BL/6 Unib.

Marcadores Moleculares Polimórficos para Linhagens C57BL/6 e BALB/c				
Cromossomo	Marcador	Posição (cM)	Sequência	Tamanho (pb)
7	D7mit310	18	Right: ATgTAgTgTTAACgggAACATAACTgg Left: gggCTCgAAAgACACAgAAA	B: 164 C: 118
11	D11mit38	49	Right: TCTgAACCCACAAATgTAAACAAGg Left: CCACTATATCCTTAAAgACACggg	B: 76 C: 112
19	D19mit 19	26	Right: ACCATATCAggAAgCACCATg Left: CCTgTgTCCATACAggCTCA	B: 142 C: 116

As soluções e os protocolos empregados nas técnicas moleculares estão descritas nos anexos 1, 2 e 3.

4.11. Análise macroscópica dos ovários irradiados e não irradiados:

As fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy de ambas as linhagens, tanto doadora como receptora, foram sacrificadas com 7 e 30 dias após a irradiação e seus ovários foram removidos cirurgicamente, inspecionados macroscopicamente e comparados com os ovários das fêmeas de ambas as linhagens que não receberam tratamento.

4.12. Análise histológica dos ovários: perfusão cardíaca; inclusão do material e preparo das lâminas:

Com o propósito de se avaliar outros efeitos da radiação sobre os ovários, que não apenas aqueles relacionados com a reprodução, as fêmeas irradiadas com 4 e 6 Gy, 7 e 30 dias após a irradiação e fêmeas que não receberam tratamento de ambas as linhagens doadoras e receptoras, foram anestesiadas com halotano e em seguida a caixa torácica foi aberta permitindo o preparo do coração para a técnica de perfusão de fixador. Com o coração exposto foram identificadas as suas estruturas e no ventrículo esquerdo foi introduzida uma agulha (13x4) para a infusão de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e em seguida, de paraformaldeído. Na técnica, o átrio direito é cortado permitindo o extravasamento do sangue e das soluções injetadas, que alcançam todos os tecidos do animal. Primeiramente foram injetados 5 mL de PBS para a lavagem de toda a rede circulatória, permitindo a saída do sangue ao mesmo tempo que os vasos ficariam acessíveis à solução fixadora. Após a saída de todo o sangue, foram injetados cerca de 7 mL de uma solução fixadora, composta de paraformaldeído 4% + sacarose 4%. Os ovários foram retirados e cortados cuidadosamente, para que a maior parte do tecido pudesse ser aproveitada para a montagem dos blocos de inclusão em parafina. Os blocos foram mantidos em solução fixadora por 01h30min e após este período foram feitas três lavagens com PBS, com intervalo de 20 minutos, para que o excesso de fixador fosse removido.

Em seguida foi feita a desidratação dos órgãos, por meio de passagens seriadas por alcoóis de concentrações crescentes de 75% a 100%, possibilitando a retirada de toda a água. Após a desidratação as amostras foram diafanizadas com xilol, para que todo álcool remanescente fosse removido facilitando a absorção da parafina pelo tecido através de dois banhos em parafina líquida. Os tecidos foram

então incluídos em parafina líquida e deixados para esfriar e solidificar, formando os blocos utilizados posteriormente na realização das lâminas. Os blocos foram cortados em micrótomo para a espessura de 5 μm formando as lâminas histológicas que foram avaliadas em microscopia ótica comum.

Finalmente, após os cortes histológicos as lâminas foram submetidas a um processo de desparafinização e hidratação (xilol – álcool – água) e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para posterior análise.

4.13. Análise estatística:

Os resultados da análise de sobrevivência dos animais irradiados foram expressos em porcentagem de sobrevivência considerando o número total de animais irradiados para cada uma das doses.

A avaliação do tamanho médio da ninhada ou índice de produção foi obtida a partir da análise de média e desvio padrão para cada um dos três partos.

As análises estatísticas dos grupos experimentais foram realizadas pelo software GraphPad InStat V.3. com análise de variância (ANOVA), assumindo que os valores obedeciam a uma distribuição Gaugassiana para os dados paramétricos. Foi utilizado o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas na avaliação dos diferentes grupos. Foram consideradas significativas as diferenças cuja probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5 – RESULTADOS:

5.1. Avaliação pré-cirúrgica dos ovários:

A avaliação macroscópica dos ovários das fêmeas doadoras (C57BL/6/Unib) utilizados nos diferentes ensaios, quando inspecionados para a realização da técnica, apresentou-se íntegros, sem sinais aparentes de danos.

5.2. Sobrevivência das fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy:

As fêmeas das linhagens doadoras (C57BL/6/Unib) e receptoras (B6C-F1/Unib) foram acompanhadas por um período de 8 meses após a irradiação e apresentaram as seguintes taxas de sobrevivência:

Tabela 2: Taxa de sobrevivência das fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy.

Linhagem	Dose	Nº ♀ irradiadas / sobreviventes	% de sobrevivência
B6C-F1/Unib	4 Gy	51 / 51	100%
	6 Gy	51 / 51	100%
C57BL/6/Unib	4 Gy	26 / 26	100%
	6 Gy	26 / 26	100%

5.3. Resultados observados com o acasalamento das linhagens doadoras e receptoras antes dos tratamentos:

O desempenho reprodutivo das linhagens utilizadas nos experimentos permitiu descartar interferências na reprodução decorrentes do alojamento, dieta e manuseio.

O tamanho médio da ninhada foi observado em cada um dos três partos, e estão indicados a seguir. Todos os grupos permaneceram por um período de 4 meses, tempo suficiente para acompanhar 3 gestações.

5.3.1 – Desempenho reprodutivo de fêmeas não irradiadas da linhagem C57BL/6/Unib utilizada como doadora dos ovários (G6) :

Todas as fêmeas apresentaram 3 partos. O total de nascimentos observados no primeiro parto foi igual a 34 crias e no segundo e terceiro partos 26 e 24 respectivamente.

O tamanho médio da ninhada ou índice de produção, foi igual a 6,8 crias por fêmea no primeiro parto; 5,2 no segundo e 4,8 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, considerado para os três partos apresentou o valor de $5,6 \pm 2,61$ nascimentos por parto, indicado na tabela 3.

5.3.2 – Desempenho reprodutivo de fêmeas não irradiadas linhagem híbrida B6C-F1/Unib utilizada como receptora dos ovários (G5):

Todas as fêmeas tiveram 3 gestações. No primeiro parto, o total de nascimentos foi igual a 59 crias; no segundo 44 e no terceiro 54.

O tamanho médio da ninhada ou índice de produção, foi igual a 11,8 crias por fêmea no primeiro parto; 8,8 no segundo e 10,8 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, considerado para os três partos apresentou o valor de $10,46 \pm 2,16$ nascimentos por parto, conforme indicado na tabela 3.

5.4. Controle da técnica: remoção e reintrodução dos ovários (autoenxerto):

Para a análise do controle da técnica, tanto as fêmeas C57BL6/Unib (doadoras) acasaladas 7 dias após as transferências ovarianas, quanto aquelas acasaladas 30 dias após o procedimento foram acompanhadas (grupo G7).

As fêmeas que foram acasaladas 7 dias após a cirurgia, estavam com 8 semanas de idade no momento da realização da técnica, e tiveram 14 crias no primeiro parto; 16 no segundo e 22 no terceiro. Por outro lado, as fêmeas acasaladas 30 dias após o procedimento, e que estavam com a idade de 12 semanas, apresentaram 25 crias no primeiro parto; 15 no segundo e 18 no terceiro.

A avaliação reprodutiva tomando-se por base o tamanho médio da ninhada resultou em 3,5 neonatos por fêmea no primeiro parto; 4 no segundo e 5,5 no terceiro, no grupo acasalado 10 dias após a cirurgia, e, 5 neonatos por fêmea no primeiro parto; 3,75 no segundo e 4,5 no terceiro no grupo acasalado 30 dias após o transplante, indicado na tabela 3.

5.5. Análise estatística dos grupos controle: linhagens doadora, receptora e autoenxerto:

Indicamos abaixo, na tabela 3, os resultados obtidos com o desempenho reprodutivo dos grupos controle formado pelas linhagens doadora (C57BL/6Unib); receptora (B6CF1/Unib) e controle da técnica.

Tabela 3: Desempenho reprodutivo dos animais dos grupos controle

Grupo	Linhagem	Tratamento	T. M. N. (*)
G5	B6C-F1/Unib	Controle não irradiado	10,46 ± 2,16
G6	C57BL/6/Unib	Controle não irradiado	5,6 ± 2,61
G7	C57BL/6/Unib	Controle da cirurgia (**)	3,86 ± 2,29

(*) TMN – Tamanho médio da ninhada

(**) Controle da cirurgia = remoção e reinserção dos ovários

A comparação entre os animais híbridos (G5) com os animais isogênicos (G6) realizada pelo software GraphPad InStat V.3. com análise de variância (ANOVA), apresenta um resultado estatístico significativo, com um $p < 0,001$. O mesmo se observa na comparação entre os animais híbridos (G5) e aqueles do grupo controle da técnica, que receberam o autoenxerto ($p < 0,001$). Entretanto, a comparação entre este grupo controle da técnica e os animais isogênicos doadores dos ovários (G6) não revelam importância estatística, com o valor de $p > 0,05$.

Os valores observados no tamanho médio da ninhada para as linhagens receptora (B6C-F1/Unib) e doadora (C57BL/6/Unib) utilizadas como controle, estão de acordo com a literatura (UFAW, 1987) e o grupo controle da cirurgia não revelou diferença significativa, quando comparado com o seu correspondente isogênico usado como doador.

5.6. Efeitos da radiação no desempenho reprodutivo das linhagens utilizadas (grupos controle da irradiação):

Fêmeas das linhagens doadora e receptora utilizadas nos experimentos e que foram irradiadas com 4 Gy e 6 Gy, apresentaram os resultados indicados abaixo.

5.6.1 – Irradiação e acasalamento de fêmeas da linhagem doadora (C57BL/6/Unib): Resultados e análise estatística observados com os acasalamentos realizados 7 e 30 dias após a irradiação:

As fêmeas C57BL/6/Unib, acasaladas 7 dias após a irradiação com 4 Gy (Grupo G3A), apresentaram no primeiro parto um total de 38 crias e um tamanho médio de ninhada igual a 4,22 neonatos por fêmea. Nestes nascimentos, o número de mortos foi igual a 5 indivíduos, correspondendo a um índice de mortalidade igual a 13,15%. Entre as fêmeas irradiadas nestas condições, apenas uma apresentou um segundo parto com 2 neonatos.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que ela reproduziu, apresentou o valor de $3,07 \pm 2,17$ nascimentos por parto.

Paralelamente, dentre as fêmeas desta linhagem tratadas com 6Gy e também acasaladas 7 dias após a irradiação (Grupo G4A), apenas 2 delas tiveram o primeiro parto com um total de nascimentos igual a 12 neonatos e um tamanho médio da ninhada igual a 6 crias por fêmea. Nenhum animal teve um segundo parto quando irradiado nestas condições.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $0,92 \pm 2,29$ nascimentos por parto.

Não foram observados nascimentos com as fêmeas da linhagem C57BL/6/Unib acasaladas 30 dias após a irradiação com 4 Gy (Grupo G3B) ou com 6Gy (Grupo G4B).

No resultado da análise estatística dos efeitos da radiação na linhagem doadora, apenas os animais irradiados com 4 Gy e acasalados 7 dias após a irradiação não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle. Nos demais grupos, o desempenho reprodutivo foi alterado em razão do tratamento.

Estes resultados estão apresentados na tabela 4 e figura 3 onde foram comparados com o grupo controle não irradiado (G6). Os resultados demonstram os efeitos da radiação sobre a linhagem utilizada como doadora dos ovários transplantados para os grupos teste.

Tabela 4: Desempenho reprodutivo da linhagem doadora (C57BL/6/Unib) antes e após a irradiação e avaliação estatística dos efeitos da radiação sobre a reprodução na linhagem doadora (C57BL/6/Unib)

Grupo	Tratamento	Dose Gy	T.M.N.	G6 x Grupos Irrradiados	<i>p</i>	Significância
G6	Sem Irradiação (SI)	-	5,6 ± 2,61	-	-	-
G3A	Irradiação / acasalamento 7 d.a.i. (*)	4	3,07 ± 2,17	G6 x G3A	p>0,05	ns
G3B	Irradiação / acasalamento 30 d.a.i.	4	0,0	G6 x G3B	P<0,001	s
G4A	Irradiação / acasalamento 7 d.a.i.	6	0,92 ± 2,29	G6 x G4A	P<0,001	s
G4B	Irradiação / acasalamento 30 d.a.i.	6	0,0	G6 x G4B	P<0,001	s

(*) d.a.i. = dias após a irradiação
 TMN = Tamanho médio da ninhada

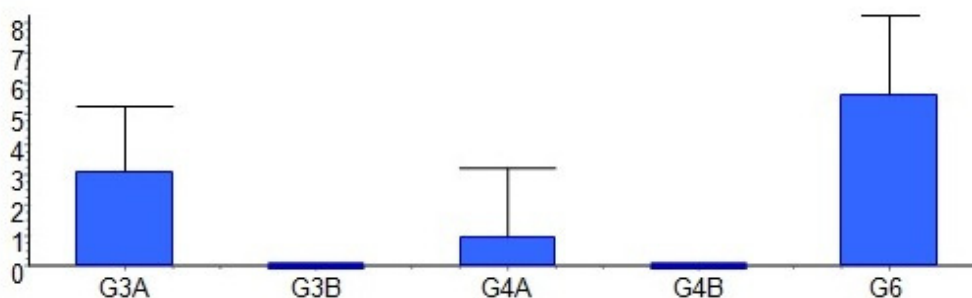


Figura 3: Média e desvio padrão do grupo controle da linhagem C57BL/6/Unib não irradiado e irradiados com 4 e 6 Gy, acasalados com 7 e 30 dias após a irradiação.

5.6.2. – Irradiação e acasalamento de fêmeas da linhagem receptora (B6C-F1/Unib): Resultados e análise estatística observados com os acasalamentos realizados 7 e 30 dias após a irradiação:

As fêmeas B6C-F1/Unib, acasaladas 7 dias após a irradiação com 4 Gy (grupo G1A), apresentaram no primeiro parto um total de 99 crias com um tamanho médio de ninhada igual a 8,25 neonatos por fêmea e apenas 3 mortos. Paralelamente, a análise de expressão fenotípica neste grupo de animais, resultou na proporção de 44 indivíduos pretos; 52 agouti e 3 mortos ao nascimento e, portanto sem o registro da pigmentação. Nenhuma fêmea apresentou um segundo parto.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante as 3 gestações, apresentou o valor de $7,61 \pm 3,45$ nascimentos por parto.

No caso da irradiação com 6 Gy e acasalamento também 7 dias, após a

irradiação (Grupo G2A), registrou-se um total de 65 nascimentos com um tamanho médio de ninhada igual a 5,41 neonatos por fêmea e nenhum morto. Nenhuma fêmea teve um segundo parto, todos os grupos permaneceram por um período de 4 meses, tempo suficiente para acompanhar 3 gestações, e depois foram eutanasiados.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $5,0 \pm 3,02$ nascimentos por parto.

Por outro lado, nenhuma fêmea da linhagem receptora (B6C-F1/Unib) acasalada 30 dias após a irradiação com 4 Gy (Grupo G1B) ou com 6 Gy (Grupo G2B), pariu, acompanhadas também por 4 meses.

O desempenho reprodutivo da linhagem doadora (G5) não irradiada foi comparado com os grupos formados por animais desta linhagem submetidos a diferentes tratamentos.

No resultado da análise estatística dos efeitos da radiação na linhagem receptora, apenas os animais irradiados com 4 Gy e acasalados 7 dias após a irradiação não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle. Nos demais grupos, o desempenho reprodutivo foi alterado pelo tratamento.

Estes resultados estão apresentados na tabela 5 e figura 4, onde foram comparados com o grupo controle não irradiado (G5). Os resultados demonstram os efeitos da radiação sobre a linhagem utilizada como receptora dos ovários transplantados nos grupos teste.

Tabela 5: Desempenho reprodutivo da linhagem receptora (B6C-F1/Unib) antes e após a irradiação e avaliação estatística dos efeitos da radiação sobre a reprodução na linhagem receptora (B6C-F1/Unib)

Grupo	Tratamento	Dose Gy	T.M.N.	G5 x Grupos Irrradiados	p	Significância
G5	Não irradiado	-	10,46 ± 2,16	-	-	-
G1A	Irradiação / acasalamento 7 d.a.i. (*)	4	7,61 ± 3,45	G5 x G1A	p>0,05	Ns
G1B	Irradiação / acasalamento 30 d.a.i.	4	0,0	G5 x G1B	P<0,001	S
G2A	Irradiação / acasalamento 7 d.a.i.	6	5,0 ± 3,02	G5 x G2A	P<0,001	S
G2B	Irradiação / acasalamento 30 d.a.i.	6	0,0	G5 x G2B	P<0,001	S

(*) d.a.i. = dias após a irradiação
TMN = Tamanho médio da ninhada

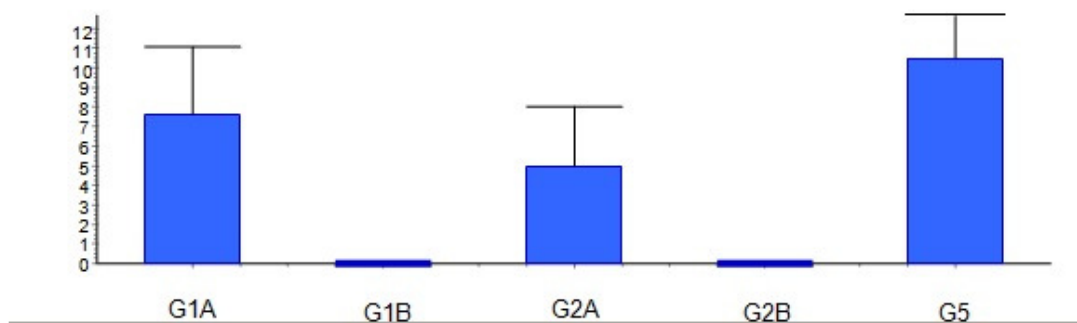


Figura 4: Média e desvio padrão do grupo controle da linhagem B6C-F1/Unib não irradiado e irradiados com 4 e 6 Gy, acasalados com 7 e 30 dias após a irradiação.

5.7. Grupos experimentais submetidos ao transplante ovariano (TO):

Serão indicados a seguir os resultados obtidos com os transplantes ovarianos realizados em fêmeas receptoras B6C-F1/Unib que receberam ovários de fêmeas da linhagem C57BL/6/Unib.

Estes resultados se referem à restauração das funções reprodutivas por meio da realização da técnica.

5.7.1 – Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 7 dias após o transplante:

Todas as fêmeas irradiadas com 4 Gy e submetidas à transferência ovariana bilateral 7 dias após a irradiação e acasaladas 7 dias após a T.O. (Grupo 8A), tiveram 3 partos e depois o grupo foi eutanasiado. O total de nascimentos registrados foi de 22 no primeiro parto; 25 no segundo e 31 no terceiro e a avaliação de desempenho por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 4,4 neonatos por fêmea no primeiro parto, 5,0 no segundo e 6,2 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $5,20 \pm 1,89$ nascimentos por parto.

Paralelamente, todas as fêmeas submetidas à transferência ovariana bilateral 7 dias após a irradiação com 6 Gy, acasaladas 7 dias após a T.O. (Grupo G9A), apresentaram 3 partos e depois foram eutanasiados, tiveram um total de nascimentos no primeiro parto de 18; 29 no segundo e 28 no terceiro. O desempenho reprodutivo deste grupo resultou em 3,6 neonatos por fêmea no primeiro parto; 5,8 no segundo e 5,6 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $5,00 \pm 2,00$ nascimentos por parto.

Na análise da expressão fenotípica foi observado que todos os indivíduos que nasceram apresentavam a pigmentação preta, indicando serem oriundos dos ovários transplantados. Testes moleculares realizados com marcadores polimórficos de microsátélites de DNA confirmarão a procedência destes animais.

5.7.2 – Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 30 dias após o transplante:

Todas as fêmeas submetidas à transferência ovariana bilateral 7 dias após a irradiação com 4 Gy e acasaladas 30 dias após o transplante(Grupo G8B), tiveram 3 partos. O número de nascimentos observado foi de 26 indivíduos no primeiro parto; 40 no segundo e 38 no terceiro e a avaliação de desempenho deste grupo, por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 5,2 neonatos por fêmea no primeiro parto; 8 no segundo e 7,6 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $6,93 \pm 2,12$ nascimentos por parto.

Por outro lado, todas as fêmeas submetidas à radiação com 6 Gy, e que receberam os ovários 7 dias após a irradiação e foram acasaladas 30 dias após o transplante bilateral (Grupo G9B), apresentaram 3 gestações, com um total de 13 nascimentos no primeiro parto; 27 no segundo e 28 no terceiro. O desempenho reprodutivo deste grupo resultou em 2,6 neonatos por fêmea no primeiro parto; 5,4 no segundo e 5,6 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $4,50 \pm 2,72$ nascimentos por parto.

Todos os indivíduos apresentaram a pigmentação preta. Foram realizados testes moleculares com marcadores polimórficos de microsátélites de DNA para a confirmação da origem dos animais.

5.7.3 – Resultados observados com o transplante ovariano bilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 30 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento com 7 dias após o transplante:

As fêmeas submetidas à transferência ovariana bilateral 30 dias após a irradiação com 4 Gy e acasaladas 7 dias após o transplante (Grupo G8C), tiveram 3 partos. O número de nascimentos observados foi de 18 indivíduos no primeiro parto; 28 no segundo e 34 no terceiro e a avaliação de desempenho deste grupo, por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 3,6 neonatos por fêmea no primeiro parto; 5,6 no segundo e 6,8 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $5,33 \pm 2,38$ nascimentos por parto.

Todas as fêmeas deste grupo submetidas à irradiação com 6 Gy que receberam os ovários 30 dias após a irradiação e foram acasaladas 7 dias após o transplante bilateral (Grupo 9C), apresentaram os 3 partos. O número de nascimentos observados foi de 29 indivíduos no primeiro parto; 30 no segundo e 33 no terceiro e a avaliação de desempenho deste grupo, por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 5,8 neonatos por fêmea no primeiro parto; 6,0 no segundo e 6,6 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $6,13 \pm 1,40$ nascimentos por parto.

Todos os indivíduos que nasceram apresentaram a pigmentação preta. Entretanto, foram realizados testes moleculares com marcadores polimórficos de microsátélites de DNA para a confirmação da origem dos animais.

5.8. Análise estatística dos efeitos do transplante ovariano bilateral.

Indicamos abaixo, na tabela 6, os resultados obtidos com o transplante ovariano após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy e a sua influência na restauração da capacidade reprodutiva das fêmeas.

O desempenho reprodutivo da linhagem doadora (G6) não irradiada foi comparado com os grupos formados por animais que receberam o T.O. em diferentes tratamentos.

Estes resultados se referem ao transplante ovariano bilateral com animais de fundo C57BL/6/Unib.

Tabela 6: Avaliação do desempenho reprodutivo após o transplante ovariano bilateral.

Grupo	Tratamento	Dose Gy	T.M.N.	G5 x Grupos Irrradiados	p	Significância
G6	Controle / Não irradiado	-	5,60 ± 2,61	-	-	-
G8A	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.TOB(**)	4	5,20 ± 1,89	G6 x G8A	p>0,05	Ns
G8B	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 30 d.TOB(**)	4	6,93 ± 2,12	G6 x G8B	P>0,05	Ns
G8C	T.O.B. 30 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.TOB(**)	4	5,33 ± 2,38	G6 x G8C	P>0,05	Ns
G9A	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.TOB(**)	6	5,00 ± 2,00	G6 x G9A	P>0,05	Ns
G9B	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 30 d.TOB(**)	6	4,50 ± 2,72	G6 x G9B	P>0,05	Ns
G9C	T.O.B. 30 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.TOB(**)	6	6,13 ± 1,40	G6 x G9C	P>0,05	Ns

(*) d.a.i. = dias após a irradiação

TMN = Tamanho médio da ninhada

T.O.B. = Transplante ovariano bilateral

(**)d.T.O.B.= dias após transplante ovariano bilateral

Os resultados estatísticos revelaram não haver diferenças significativas entre os grupos, quando comparados o grupo controle normal da linhagem doadora (C57BL/6/Unib) com o transplante bilateral, conforme mostra a figura 5.

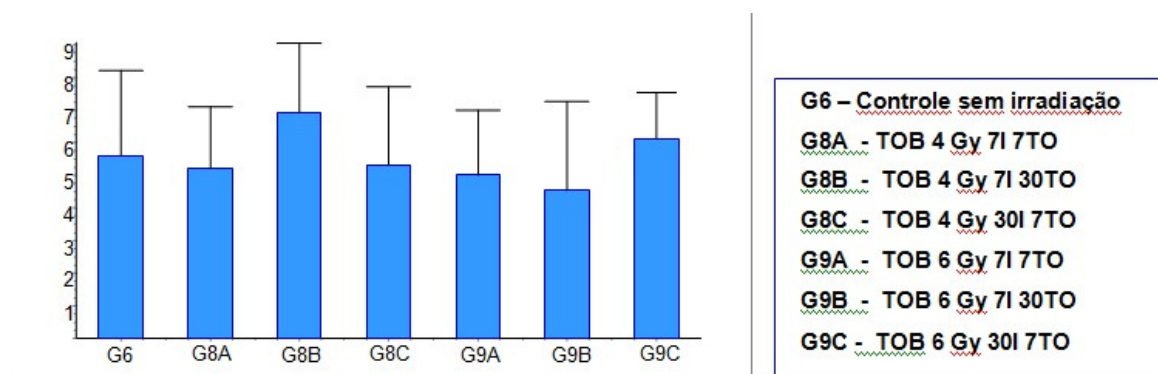


Figura 5: Média e desvio padrão da recuperação reprodutiva após o transplante ovariano bilateral.

5.9 – Resultados observados com o transplante ovariano unilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 7 dias após o transplante:

As fêmeas submetidas à transferência ovariana unilateral 7 dias após a irradiação com 4 Gy e acasaladas 7 dias após o transplante (Grupo G10A), tiveram 3 partos. O número de nascimentos observados foi de 19 indivíduos no primeiro parto; 24 no segundo e 31 no terceiro e a avaliação de desempenho

deste grupo, por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 3,8 neonatos por fêmea no primeiro parto; 4,8 no segundo e 6,2 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $4,93 \pm 2,21$ nascimentos por parto.

No que tange à análise fenotípica da progênie, foram observados 04 dos indivíduos de coloração agouti, sugerindo a participação do ovário da receptora.

Amostras destes animais foram analisadas com marcadores de DNA.

Das fêmeas deste grupo que receberam apenas um dos ovários 7 dias após a irradiação com 6 Gy e foram acasaladas 7 dias após o transplante (Grupo G11A), todas tiveram os 3 partos. O número de nascimentos observados foi de 15 animais no primeiro parto; 22 no segundo e 28 no terceiro. A performance relativa observada com estes animais foi igual a 3 no primeiro parto; 4,4 no segundo e 5,6 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $4,33 \pm 2,32$ nascimentos por parto.

Com relação ao padrão de pigmentação dos nascimentos do primeiro parto, deste grupo foram observados 03 animais de coloração agouti, sugerindo a participação do ovário da receptora. Amostras destes animais foram analisadas com marcadores de DNA.

5.9.1 – Resultados observados com o transplante ovariano unilateral realizado em fêmeas B6C-F1/Unib, 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, e o acasalamento 30 dias após o transplante:

Todas as fêmeas submetidas à transferência ovariana unilateral 7 dias após a irradiação com 4Gy e acasaladas 30 dias após o transplante (Grupo G10B), tiveram 3 partos. O número de nascimentos observados foi de 14 indivíduos no primeiro parto; 27 no segundo e 22 no terceiro e a avaliação de desempenho deste grupo, por meio do tamanho médio da ninhada resultaram em 2,8 neonatos por fêmea no primeiro parto; 5,4 no segundo e 4,4 no terceiro.

O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $4,20 \pm 2,85$ nascimentos por parto.

Por outro lado, todas as fêmeas submetidas à irradiação com 6 Gy que receberam o ovário 7 dias após a irradiação e foram acasaladas 30 dias após o

transplante unilateral (Grupo G11B), apresentaram 3 gestações, com um total de 11 nascimentos no primeiro parto; 31 no segundo e 31 no terceiro. O desempenho reprodutivo deste grupo resultou em 2,2 neonatos por fêmea no primeiro parto; 6,2 no segundo e 6,2 no terceiro. O desempenho reprodutivo das fêmeas deste grupo, durante o período em que elas reproduziram, apresentou o valor de $4,86 \pm 2,26$ nascimentos por parto.

Embora todos os indivíduos apresentassem a pigmentação preta, foram realizados testes moleculares com marcadores polimórficos de microsátélites de DNA para a confirmação da origem dos animais.

5.9.2 Análise estatística dos efeitos do transplante ovariano unilateral:

Os resultados referentes ao transplante ovariano unilateral (T.O.U.) com animais que receberam o T.O. em diferentes tratamentos, revelaram não haver diferenças significativas entre os grupos, quando comparados com o grupo controle normal da linhagem doadora (C57BL/6/Unib) não irradiada (G6). Os dados estatísticos indicam serem populações com desvios padrão idênticos e $p=0,5525$, não significativo, conforme mostra a tabela 7 e figura 6.

Tabela 7: Avaliação do desempenho reprodutivo após o transplante ovariano unilateral.

Grupo	Tratamento	Dose Gy	T.M.N.	G5 x Grupos Irrradiados	p	Significância
G6	Controle / Não irradiado	-	$5,60 \pm 2,61$	-	-	-
G10A	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.T.O.B.(**)	4	$4,93 \pm 2,21$	G6 x G10A	$p>0,05$	Ns
G10B	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 30 d.T.O.B.(**)	4	$4,20 \pm 2,85$	G6 x G10B	$P>0,05$	Ns
G11A	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 7 d.T.O.B.(**)	6	$4,33 \pm 2,32$	G6 x G11A	$P>0,05$	Ns
G11B	T.O.B. 7 d.a.i (*) e Acasalado 30 d.T.O.B.(**)	6	$4,86 \pm 2,26$	G6 x G11B	$P>0,05$	Ns

(*) d.a.i. = dias após a irradiação

TMN = Tamanho médio da ninhada

T.O.B. = Transplante ovariano bilateral

(**)d.T.O.B.= dias após transplante ovariano bilateral

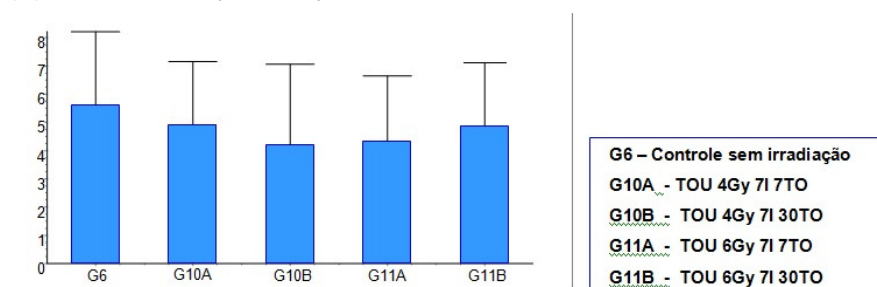


Figura 6: Média e desvio padrão da recuperação reprodutiva após o transplante ovariano unilateral.

5.10. Acasalamento dos filhos de fêmeas irradiadas:

Nos testes realizados, nenhuma alteração fenotípica foi observada na progênie de fêmeas acasaladas 7 dias e 30 dias após a irradiação com 4 ou 6 Gy.

Estes animais foram também acasalados entre irmãos e as crias acompanhadas até o desmame durante três partos. Também neste grupo, nenhuma alteração fenotípica foi constatada.

Entretanto os casais parentais apresentaram alterações de pigmentação após alguns meses conforme pode ser observado nas figuras 7 e 8.

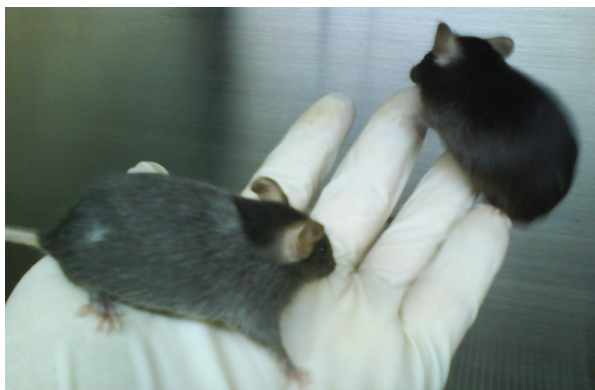


Figura 7: Fêmea C57BL/6 irradiada (esquerda) e macho não irradiado (direita)

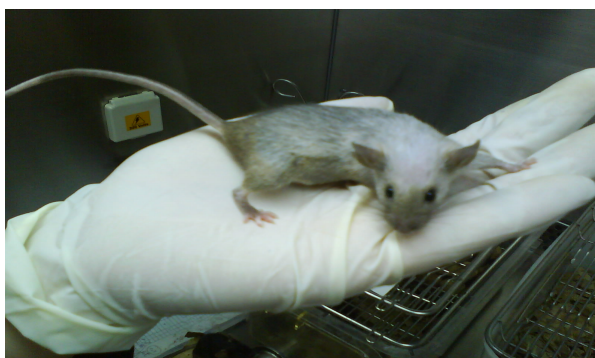


Figura 8: Fêmea receptora B6C-F1 irradiada

5.11. Resultados observados com os marcadores moleculares de DNA: Genotipagem dos animais nascidos do transplante ovariano:

As amostras de DNA extraídas dos animais que nasceram após a realização do transplante ovariano bilateral e unilateral, foram amplificadas com a

reação da PCR e investigadas com eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Indicamos a seguir os resultados observados com estas amostras.

Tabela 8: Fêmeas irradiadas com 6 Gy e submetidas ao transplante ovariano unilateral (TOU), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias após a cirurgia.

Partos	TO 1Ld / 7DI Nº de animais (*)	Genótipo (*)	TO 1Ld / 30DI Nº de animais (*)	Genótipo (*)
1º	15	3 = Híbridos 12 = C57BL/6	11	C57BL/6
2º	22	C57BL/6	31	C57BL/6
3º	28	C57BL/6	31	C57BL/6

(*) Número de filhotes e o genótipo de cada grupo.

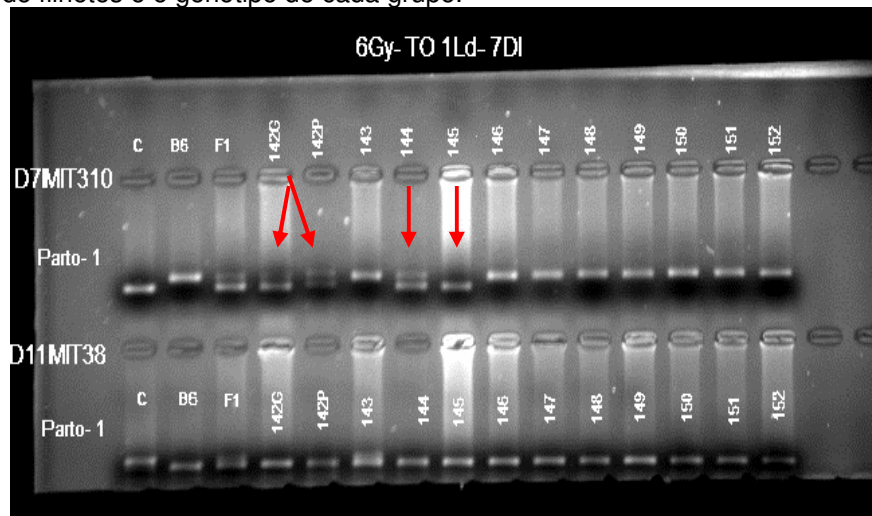


Figura 9: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 6 Gy-TO1Ld-1º Parto (Primers: D7Mit310 e D11Mit38)

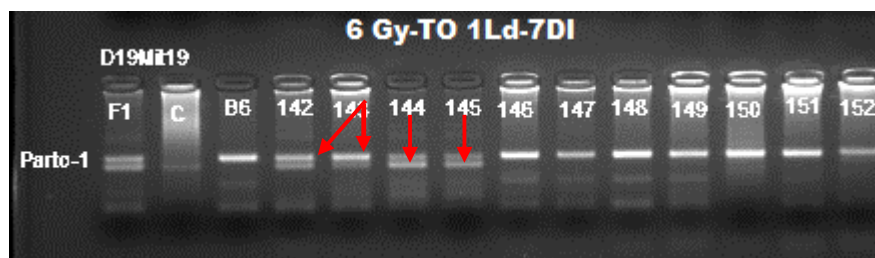


Figura 10: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 6 Gy-TO1Ld-1º Parto (Primer: D19Mit19)

As amostras 142G/P, 144 e 145 migraram em correspondência com o padrão para a linhagem híbrida (B6C-F1/Unib), conforme figuras 9 e 10 e são, portanto produto de um fragmento residual do ovário da receptora. Estes resultados são observados apenas no grupo com transplante ovariano realizado 7 dias após a irradiação.

Tabela 9: Fêmeas irradiadas com 6 Gy e submetidas ao transplante ovariano bilateral (TOB), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias e 30 dias após a cirurgia.

Partos	TO 2Ld 7DI/7AC Nº de animais	Genótipo	TO 2Ld 7DI/30AC Nº de animais	Genótipo	TO 2Lds 30DI/7AC Nº de animais	Genótipo
1º	18	C57BL/6	13	C57BL/6	29	C57BL/6
2º	29	C57BL/6	27	C57BL/6	30	C57BL/6
3º	28	C57BL/6	28	C57BL/6	33	C57BL/6

(*) Número de filhotes e o genótipo de cada grupo

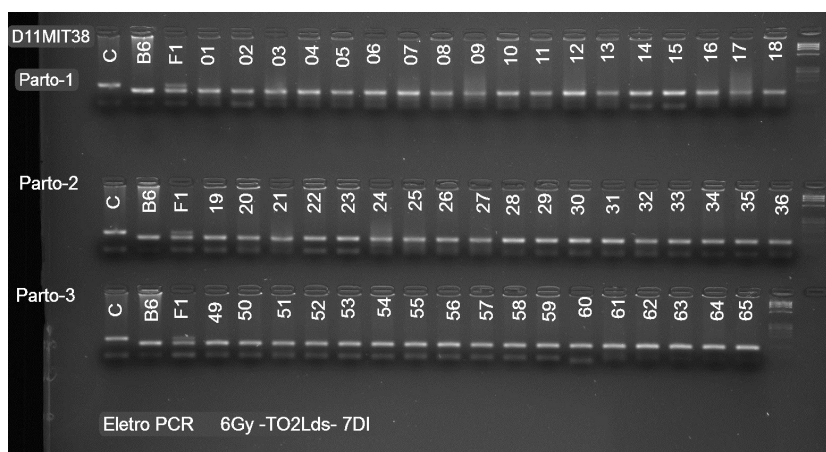


Figura 11: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 6 Gy-TO 2 Lds- 1º, 2º e 3º Parto (Primer: D 11Mit 38)

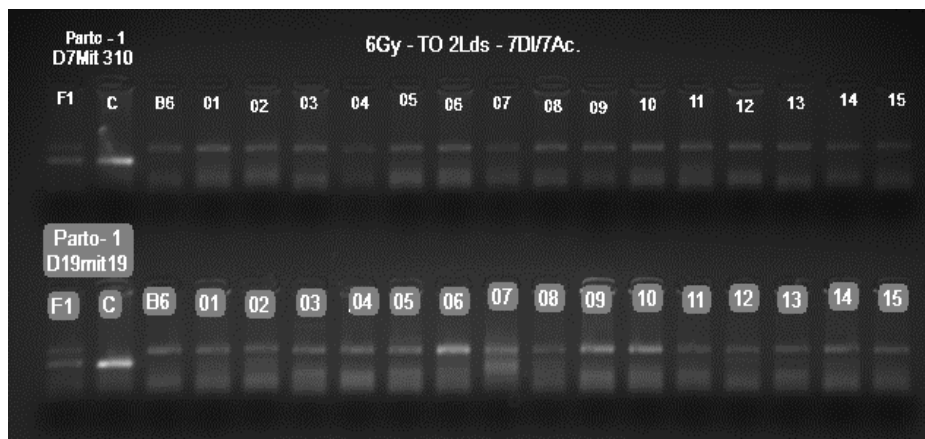


Figura 12: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 6 Gy-TO 2 Lds-1º Parto (Primers: D7 Mit 310 e D19 Mit 19)

Todas as amostras migraram como o padrão da linhagem doadora C57BL/6/Unib, conforme ilustrado nas figuras 11 e 12.

Tabela 10: Fêmeas irradiadas com 4 Gy e submetidas ao transplante ovariano unilateral (TOU), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias após a cirurgia.

Partos	TO 1Ld / 7DI Nº de animais (*)	Genótipo	TO 1Ld / 30DI Nº de animais (*)	Genótipo
1º	19	4 = Híbridos 15 = C57BL/6	14	C57BL/6
2º	24	C57BL/6	27	C57BL/6
3º	31	C57BL/6	22	C57BL/6

(*) Número de filhotes e o genótipo de cada grupo.

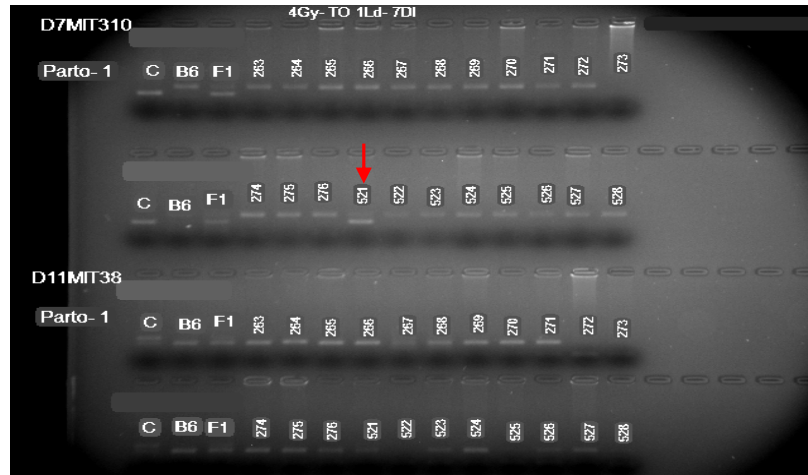


Figura 13: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 4 Gy-TO 1Ld-1^o Parto (Primers:D7 Mit 310, D11 Mit 38)

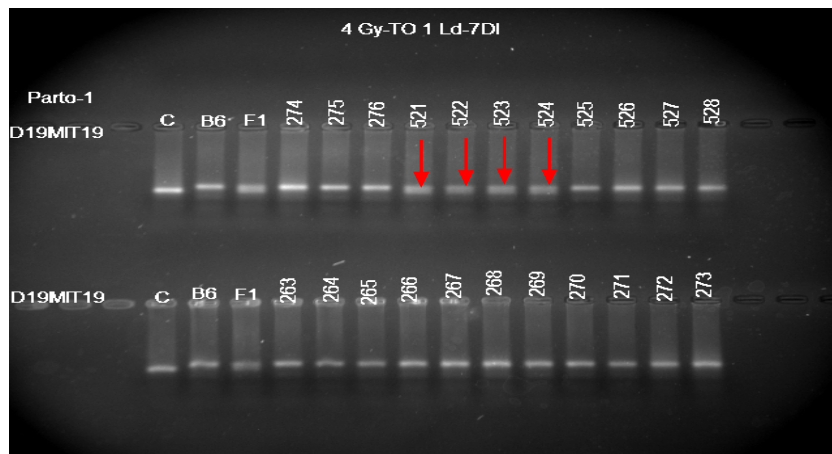


Figura 14: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 4 Gy-TO 1Ld-1^o Parto (Primer: D19 mit 19)

Os resultados obtidos nas figuras 13 e 14, com estes marcadores demonstram que as amostras 521, 522, 523 e 524 do primeiro parto, da transferência ovariana unilateral, são oriundas do ovário da fêmea híbrida receptora.

Tabela 11: Fêmeas irradiadas com 4 Gy e submetidas ao transplante ovariano bilateral (TOB), 7 dias e 30 dias após a irradiação. Os acasalamentos foram realizados 7 dias e 30 dias após a cirurgia.

Partos	TO 2Ld 7DI / 7AC Nº de animais	Genótipo	TO 2Ld 7DI / 30AC Nº de animais	Genótipo	TO 2Lds 30DI / 7AC Nº de animais	Genótipo
1º	22	C57BL/6	26	C57BL/6	18	C57BL/6
2º	25	C57BL/6	40	C57BL/6	28	C57BL/6
3º	31	C57BL/6	38	C57BL/6	34	C57BL/6

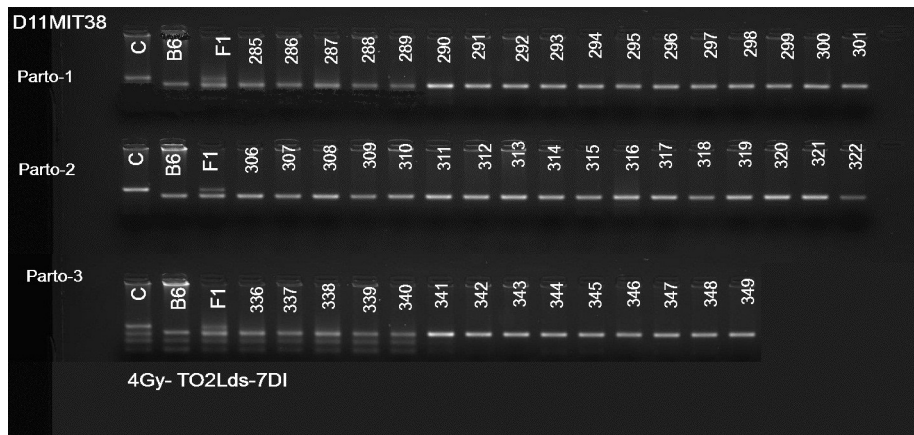


Figura 15: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 4 Gy-TO 2Lds-1º, 2º e 3º Parto (Primer: D11 Mit 38)

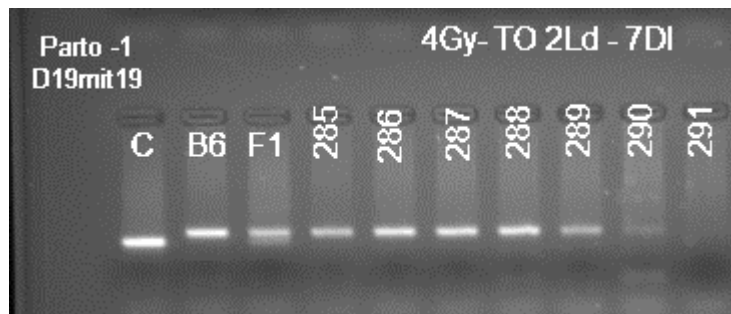


Figura 16: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 4 Gy-TO 2Lds-1º Parto (Primer: D19 Mit 19)

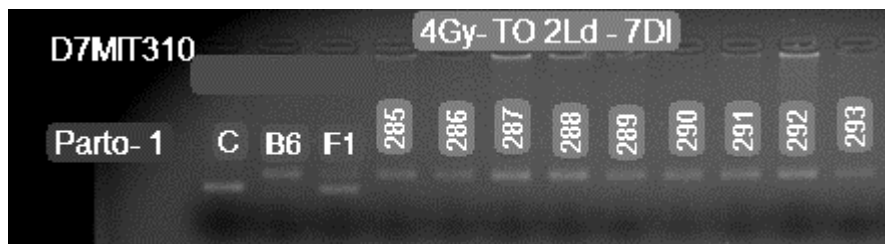


Figura 17: Foto do gel de agarose - eletroforese do grupo – 4 Gy-TO 2Lds-1^o Parto (Primer: D7 Mit 310)

As amostras da figura 15,16 e 17 apresentaram um padrão de migração correspondente à linhagem doadora e são produtos do ovário transplantado.

5.12. Análise macroscópica dos ovários irradiados e não irradiados:

Depois do 3^o parto, as fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy de ambas as linhagens, tanto doadoras como receptoras, foram sacrificadas e seus ovários foram inspecionados e comparados com os ovários de fêmeas que não receberam tratamento.

Foi observado que os ovários irradiados com 4 Gy ou 6 Gy apresentaram as mesmas características, quando analisados macroscopicamente. Ambos tinham coloração alaranjada (Ferrugem), textura gelatinosa e apresentaram uma redução de tamanho comparado com ovários que não foram irradiados, conforme figuras 18 e 19.

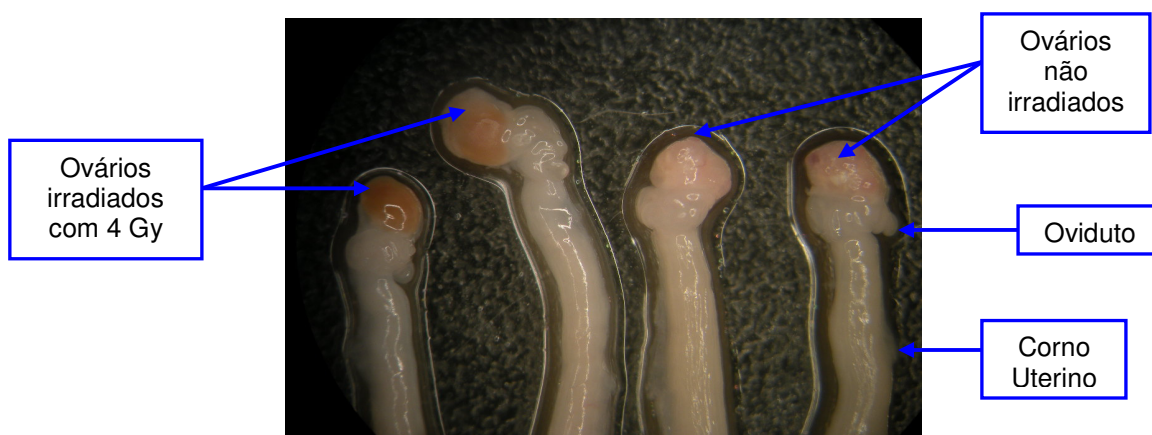


Figura 18: Ovários de fêmeas irradiadas com 4 Gy e Ovários não irradiados transplantados em fêmeas irradiadas com 4 Gy.

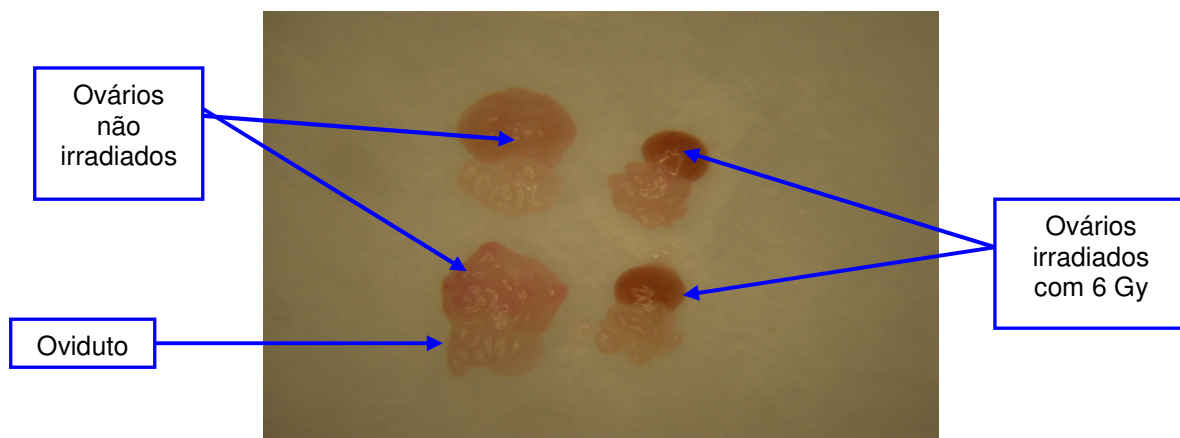


Figura 19: Ovários não irradiados transplantados em fêmeas irradiadas com 6 Gy e Ovários de fêmeas irradiadas com 6 Gy.

5.13. Resultados observados nas lâminas de cortes histológicos dos ovários:

As lâminas foram analisadas pelo Dr. Renato Flora Vargas, médico patologista do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP.

A inspeção dos ovários de fêmeas B6C-F1/Unib e C57BL/6/Unib não irradiadas utilizadas como controle, revelou a presença das seguintes estruturas: presença de vários folículos primordiais, células germinativas, corpo lúteo e óvulos (Figuras: 20 e 21).

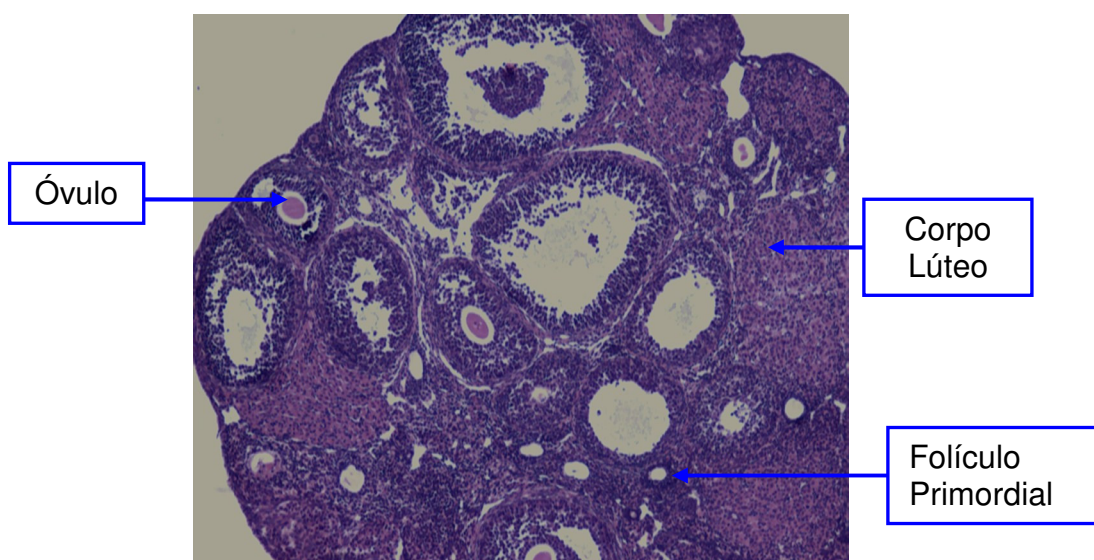


Figura 20: Ovário não irradiado de fêmea B6C-F1 (receptora) - HE 4X

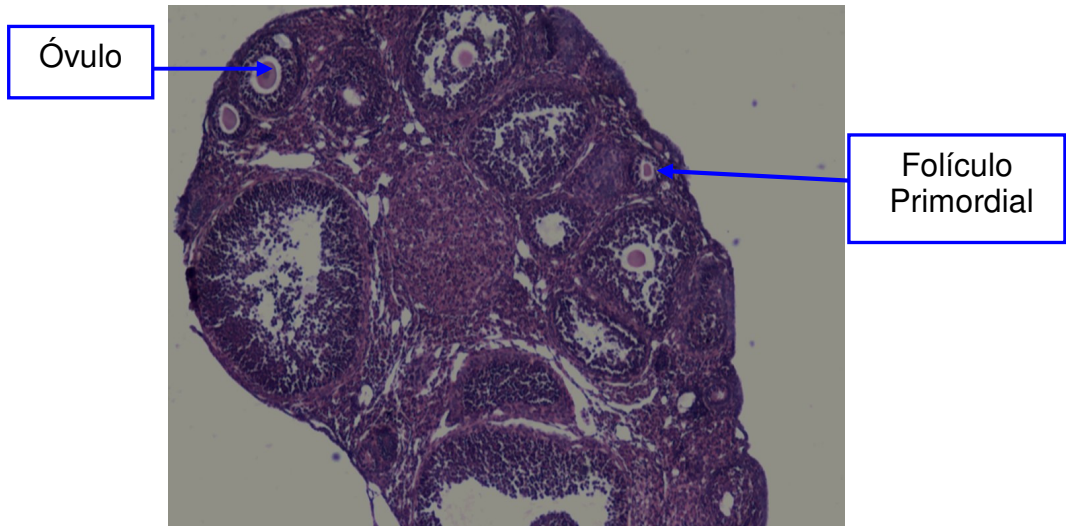


Figura 21: Ovário não irradiado de fêmea C57BL/6 (doadora) - HE 4X

As lâminas de ovários de fêmeas B6C-F1/Unib e C57Bl/6/Unib irradiadas com 4 Gy e 6 Gy, após 07 dias de irradiação, apresentam menor quantidade de óvulos e maior quantidade células luteinizadas e vasos linfáticos (Figuras: 22 e 23).

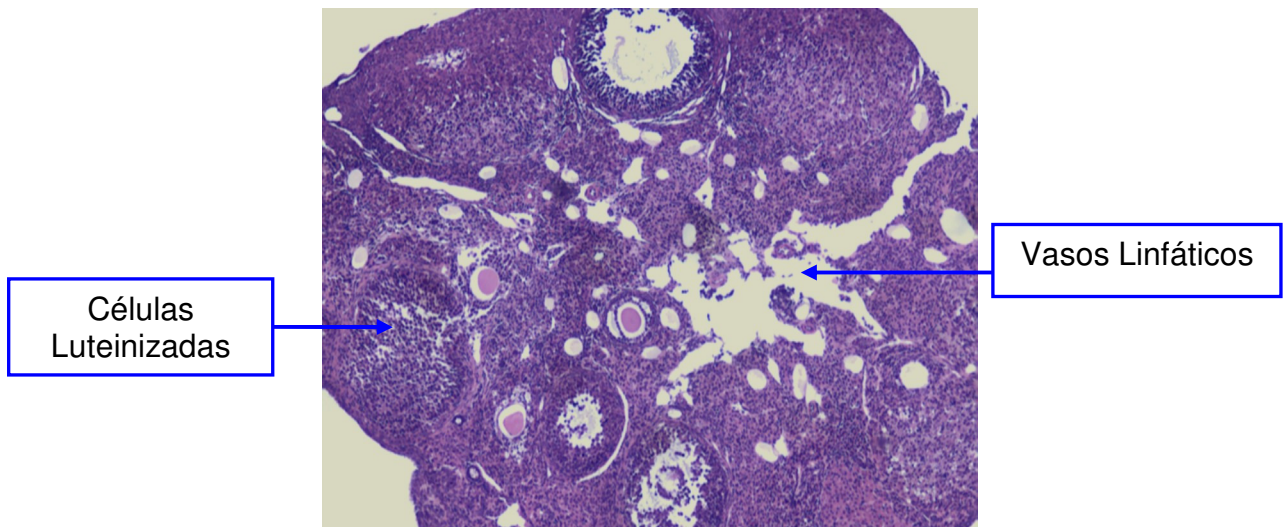


Figura 22: Ovários (B6C-F1) irradiados com 4 Gy - 07 dias após a irradiação - HE 4X

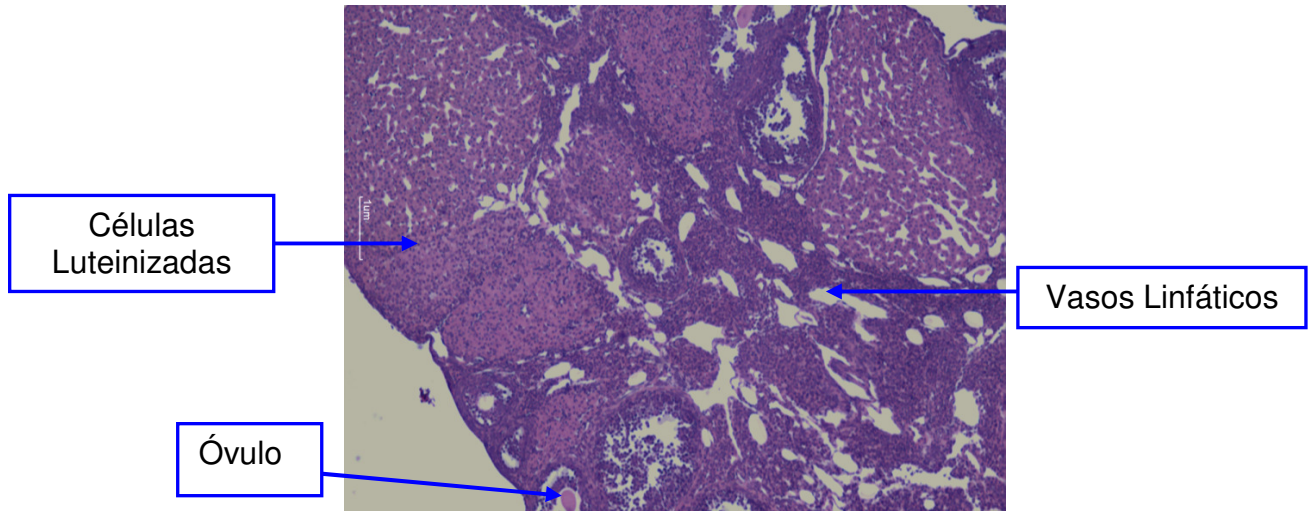


Figura 23: Ovários (C57BL/6) irradiados com 6 Gy - 07 dias após a irradiação - HE 4X

Os cortes dos ovários de fêmeas B6C-F1/Unib e C57Bl/6/Unib irradiados com 4 Gy e 6 Gy, após 30 dias de irradiação, apresentam apenas células luteinizadas, demonstrando assim a morte de todas as células germinativas (Figuras: 24 e 25).

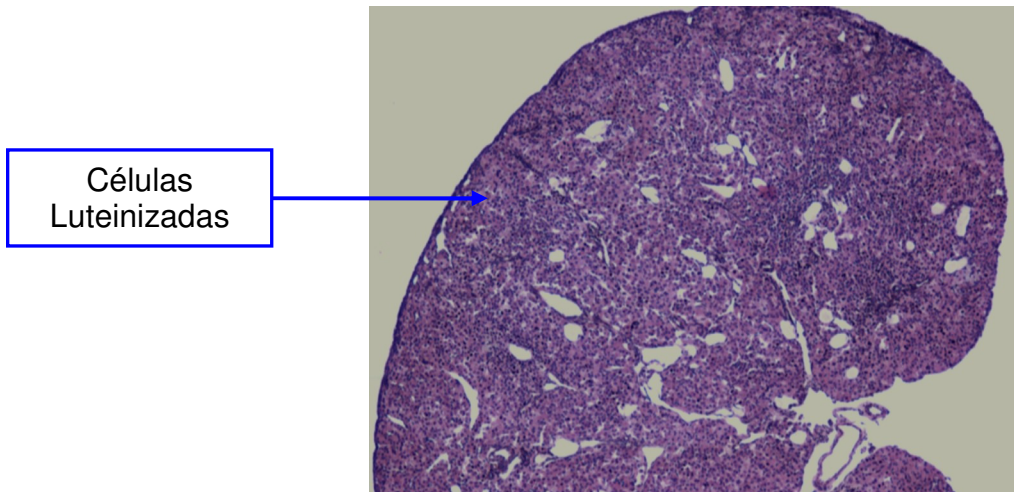


Figura 24: Ovário (B6C-F1) irradiado com 4 Gy - 30 dias após a irradiação - HE 4X

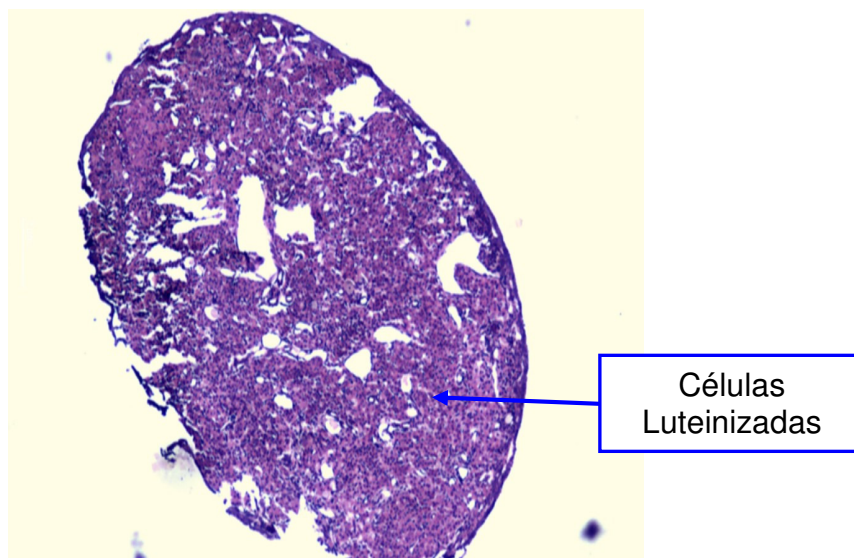


Figura 25: Ovário (C57BL/6) irradiado com 6 Gy - 30 dias após a irradiação - HE 4X

6. DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO:

Ainda que sejam notáveis os avanços observados atualmente nos tratamentos de doenças como o câncer, um desafio persiste: a incapacidade da preservação de oócitos em pacientes candidatas a tratamento com quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia (Prates, 2008).

O câncer de ovário é o câncer ginecológico mais difícil de ser diagnosticado. Cerca de 3/4 dos tumores malignos de ovário apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico inicial. É o câncer ginecológico de maior letalidade, embora seja menos freqüente que o câncer de colo do útero (INCA, 2010).

Além disso, nos tratamentos utilizados são freqüentes os efeitos colaterais como a falência ovariana pós-quimioterapia, que conduz a uma maior ou menor perda folicular proporcional à dose, ou mesmo a infertilidade e menopausa precoces (Prates, 2008).

Em casos como estes, o transplante de tecido ovariano a fresco ou criopreservado pode ser importante, pois além de levar à recuperação da capacidade fértil da mulher, serve como alternativa à terapia de reposição hormonal.

O presente trabalho teve como principal objetivo investigar o uso da cirurgia de transferência ovariana como alternativa para a restauração da fertilidade em camundongos irradiados.

Uma vez que procedimentos cirúrgicos relacionados ao transplante de tecidos ou órgãos, conduzem a eventos fisiológicos que podem comprometer o seu sucesso, foi determinante o uso de modelos animais nos ensaios experimentais.

A experimentação animal nas pesquisas científicas tem contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e a descoberta de novas tecnologias, promovendo ao longo dos anos a inserção de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos. Animais de várias espécies têm sido empregados com este propósito, sendo os camundongos os mais intensamente utilizados e os mais profundamente conhecidos cientificamente.

Embora tendências atuais preconizem a utilização de métodos alternativos (estudos *in vitro*, culturas de células, etc.), os modelos animais, como os camundongos, apresentam como principal vantagem o fornecimento de

informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos (Heywood, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995; Salén, 1995; Snitkoff, 2004).

No presente trabalho, os ovários removidos das fêmeas doadoras da linhagem C57BL/6/Unib utilizados nos diferentes ensaios, foram inspecionados e não apresentaram danos aparentes.

Por outro lado, o emprego da linhagem híbrida B6C-F1/Unib, constituída de 50% de cada um dos genomas, evitou a rejeição decorrente de genes de histocompatibilidade presentes no locus H2 do cromossomo 17 destes animais. Desta forma, os resultados observados nos ensaios decorreram apenas do protocolo adotado, excluindo-se toda e qualquer interferência de outra natureza.

Com relação à sobrevivência após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, os resultados demonstraram que as doses utilizadas estavam adequadas aos propósitos do trabalho, corroborando achados na bibliografia para a irradiação de corpo inteiro com esses modelos (Junior, *et al.*, 2004). Alguns animais irradiados com estas doses foram acompanhados por até seis meses sem que fossem observadas mortes. Os resultados observados permitiram o estudo dos efeitos destas doses na reprodução destes modelos após o transplante ovariano.

Contudo, para que as interferências do manejo (alojamento, dieta e manuseio) sobre a reprodução dos animais também fossem eliminadas, foram montados grupos controle de acasalamento de animais que não receberam tratamento para ambas as linhagens; doadora e receptora. Para tanto os animais foram mantidos nas mesmas condições dos grupos teste e os resultados obtidos, puderam ser comparados com os animais que receberam os ovários. Os resultados observados com o tamanho médio da ninhada até o terceiro parto e que refletem o desempenho reprodutivo das fêmeas doadoras não tratadas ($5,6 \pm 2,61$ nascimentos por fêmea), estão dentro do descrito, na bibliografia, para a linhagem isogênica C57BL/6, indicando que o manejo foi adequado (UFAW, 1986).

Paralelamente, a análise do desempenho reprodutivo do grupo controle da linhagem utilizada como receptora, também apresentou resultados coerentes para animais híbridos (B6C-F1) nos quais é esperado um vigor reprodutivo, conhecido tecnicamente como “vigor do híbrido”. Os valores observados no desempenho reprodutivo com esses animais ($10,46 \pm 2,16$) corroboram os dados da bibliografia (Benavides & Guenet, 2005).

Uma vez que os resultados dos acasalamentos nos grupos sem tratamento (grupo controle) foram registrados, passamos a avaliar os efeitos da radiação nestes modelos.

Fêmeas das linhagens doadoras (C57BL/6/Unib) irradiadas com 4 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação, apresentaram no primeiro parto um tamanho médio de ninhada (4,2) diferente dos valores observados com o acasalamento dos animais não irradiados (6,8) para esta linhagem. O fato de apenas uma fêmea deste grupo de animais ter apresentado um segundo parto é também relevante e demonstra um efeito da radiação sobre a reprodução. A comparação entre o grupo controle sem tratamento e os animais irradiados com 4 Gy e acasalados 7 dias após a irradiação apresenta um $p > 0,05$ não significativo; porém é muito relevante ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo irradiado com esta mesma dose acasalado 30 dias após a irradiação em razão de um efeito tardio.

Já nos animais irradiados com 6 Gy e acasalados 7 dias após a irradiação, apenas o primeiro parto foi observado e ainda assim em apenas duas fêmeas, evidenciando os efeitos prejudiciais desta dose sobre a reprodução dos animais, quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tratamento (Figura 3). A análise estatística comparando este grupo com o grupo controle não irradiado apresenta um $p < 0,001$ muito significativo e evidencia os efeitos desta dose sobre os animais (tabela 4).

Por fim, não foram observados nascimentos com as fêmeas da linhagem C57BL/6/Unib acasaladas 30 dias após a irradiação tanto com 4 Gy como com 6 Gy (Figura 3), indicando um efeito tardio da radiação (Okumo, 2009).

Todavia, também foram investigados os efeitos da radiação sobre a linhagem receptora B6C-F1/Unib e também neste grupo de animais, foram observadas diferenças significativas quando comparadas com o grupo controle não irradiado. Enquanto as fêmeas que não receberam tratamento tiveram os 3 partos, aquelas tratadas com 4 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação, tiveram somente uma gestação com um tamanho médio de ninhada igual a 8,25 neonatos por fêmea, índice inferior ao observado com as fêmeas do grupo controle normal que foi de 11,8 neonatos por fêmea. Por outro lado, as fêmeas desta linhagem quando tratadas com 6 Gy e acasaladas 7 dias após a irradiação, também tiveram somente um parto e neste caso o tamanho médio da ninhada foi ainda menor (5,41) e mais significativo quando comparado com o grupo controle normal (11,8).

De maneira semelhante ao observado com a linhagem doadora, nenhuma fêmea receptora acasalada 30 dias após a irradiação com 4 Gy ou com 6 Gy pariu. Conforme pode ser observado na tabela 5 e figura 4, apenas o grupo que recebeu a dose de 4 Gy e foi acasalado 7 dias após a irradiação, não apresenta diferenças significativas quando comparado com o grupo controle normal ($p > 0,05$). Todos os demais grupos apresentaram diferenças significativas com $p < 0,001$, na comparação com o controle. Além disso, ambas as doses de radiação utilizadas neste trabalho, comprometeram a capacidade dos animais reproduzirem, sendo mais relevantes os efeitos tardios da radiação (Okumo, 2009).

Uma vez que os dados obtidos com os experimentos de irradiação realizados nas linhagens doadora e receptora, demonstraram que a radiação comprometia drasticamente a reprodução, os ensaios de transplante ovariano puderam ser iniciados, pois todos os resultados observados nos grupos experimentais, seriam consequência do transplante ovariano.

Para tanto, um grupo controle da técnica foi formado, onde os ovários foram removidos e reintroduzidos cirurgicamente (autoenxerto), permitindo a análise da interferência do procedimento na reprodução dos animais. Em razão dos testes que seriam realizados posteriormente, dois grupos de animais foram formados: os acasalados 7 dias após o transplante e os acasalados 30 dias após a cirurgia.

Na análise do desempenho reprodutivo deste grupo, foi calculada uma média geral dos 3 partos. Nas fêmeas acasaladas 7 dias após a cirurgia, esta média foi igual a 4,33 neonatos por animal, enquanto nas fêmeas acasaladas 30 dias após o transplante ela foi igual a 4,41. Embora estas médias sejam menores que a média geral do grupo de acasalamento não irradiado ($5,6 \pm 2,61$), elas demonstram que o procedimento é eficiente e que, por ser muito delicado, exige cuidados especiais na sua execução. A comparação entre o desempenho reprodutivo deste grupo com os grupos controle não irradiados das linhagens receptora (B6C-F1/Unib) e doadora (C57BL/6/Unib), também foi avaliada e os resultados corroboram os da literatura para estes modelos (Benavides & Guenet, 2005). A análise estatística comparando o grupo controle da cirurgia (autoenxerto) com o seu correspondente isogênico que não sofreu tratamento apresenta um $p > 0,05$, indicando não haver diferenças significativas entre eles.

Após a confirmação da viabilidade do transplante ovariano, fêmeas irradiadas da linhagem B6C-F1/Unib, foram transplantadas com ovários da

linhagem C57BL/6/Unib, permitindo a investigação da hipótese de restauração das funções reprodutivas nestes animais.

O primeiro grupo avaliado recebeu os dois ovários (enxerto bilateral), 7 dias após terem sido irradiados com 4 Gy e 6 Gy e acasalados 7 dias após a TO. Os animais que receberam 4 Gy tiveram os 3 partos, com um desempenho reprodutivo igual a $5,2 \pm 1,89$ nascimentos por parto.

No caso dos animais deste grupo que receberam a dose de 6 Gy, observou-se que todas as fêmeas tiveram 3 partos com uma média geral no desempenho reprodutivo igual a $5,0 \pm 2,0$ crias por fêmea, bastante próximo à média geral observada com o desempenho reprodutivo do grupo não irradiado, que foi de $5,6 \pm 2,61$ neonatos por fêmea.

Outro resultado relevante neste grupo foi a observação de pigmentação preta em toda progênie, demonstrando pela metodologia de “marcadores fenotípicos” o sucesso da técnica.

Todos estes resultados indicam que o transplante ovariano, quando realizado com os dois ovários 7 dias após a irradiação, restabelece a reprodução em níveis praticamente normais. Este fato é importante, principalmente nas condições em que foram realizados os testes deste trabalho, pois as fêmeas receberam radiação em todo o corpo e não apenas sobre o órgão. Isto sugere que todas as vias relacionadas com a reprodução, mesmo aquelas originadas em outras partes do corpo, como por exemplo, o eixo hipotalâmico-hipofisário, e que dependem da participação dos ovários, foram restabelecidas.

Um segundo grupo de animais também recebeu os dois ovários 7 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy, porém as fêmeas somente foram acasaladas 30 dias após a cirurgia. Todos os animais que receberam 4 Gy tiveram 3 partos e um desempenho reprodutivo geral igual a $6,93 \pm 2,12$ crias por fêmea, um pouco superior à média geral observada com o grupo não irradiado que foi igual a $5,6 \pm 2,61$, sugerindo uma recuperação fisiológica da reprodução. No caso das fêmeas deste grupo que receberam a dose de 6 Gy, todas tiveram 3 partos e um desempenho reprodutivo geral igual a $4,53 \pm 2,72$ neonatos por fêmea. Este valor, ainda que menor que o observado no grupo normal $5,6 \pm 2,61$ é bastante significativo, uma vez que, conforme foi observado nos grupos controle da radiação, nenhuma fêmea apresentou prenhez nesta dose no período de 30 dias após a irradiação.

O terceiro grupo de animais também recebeu um transplante bilateral, porém somente 30 dias após a irradiação com 4 Gy e 6 Gy. Os animais deste grupo foram acasalados 7 dias após a cirurgia. Tomando-se por base os nascimentos já registrados nos 3 partos das fêmeas irradiadas com 4 Gy, observamos uma média geral neste grupo, igual a $5,33 \pm 2,38$ crias por fêmea, muito próximo ao valor obtido com o grupo não irradiado ($5,6 \pm 2,61$). No caso da dose de 6 Gy, o desempenho reprodutivo, também considerando-se os 3 partos registrados nas fêmeas, observamos o valor de tamanho médio da ninhada igual a $6,13 \pm 1,40$ neonatos por fêmea.

Ainda que os resultados indicassem a recuperação reprodutiva dos animais com o transplante ovariano bilateral, uma avaliação estatística foi conduzida de forma a indicar a existência ou não de diferenças entre o desempenho reprodutivo observado como perfil da linhagem doadora que não sofreu tratamento (C57BL/6/Unib) com os grupos experimentais submetidos a diferentes tratamentos que receberam o implante ovariano bilateral. Conforme pode ser observado na tabela 6 e na figura 5 não existem diferenças significativas na comparação com o grupo controle não irradiado, indicando uma recuperação da reprodução para os valores esperados para a linhagem C57BL/6/Unib (UFAW, 1986).

Estes dados corroboram os achados anteriores que demonstram que o procedimento possibilita o restabelecimento da reprodução.

Após a comprovação de que o transplante bilateral restabelecia a reprodução em níveis normais, foram produzidos novos grupos que receberam apenas um dos ovários.

De maneira semelhante aos protocolos anteriores, os animais deste grupo foram submetidos a um transplante unilateral (um ovário da receptora irradiada é preservado) 7 dias após a irradiação com 4 Gy e com 6 Gy e os animais acasalados 7 dias após a cirurgia.

Nas fêmeas irradiadas com 4 Gy, foram observados 3 partos, demonstrando a eficiência da técnica, com apenas um dos ovários transplantado. O tamanho médio da ninhada considerado como referência para a análise deste grupo, registrou um valor igual a $4,93 \pm 2,21$ nascimentos por partos, um valor menor que o registrado com o grupo não irradiado ($5,6 \pm 2,61$), porém, não significativa ($p > 0,05$) e sugere ser uma consequência da transferência de apenas um dos ovários.

Nas fêmeas deste grupo, irradiadas com 6 Gy, a performance relativa observada foi igual a 3 no primeiro parto; 4,4 no segundo e 5,6 no terceiro, perfazendo uma média geral igual a $4,33 \pm 2,32$ neonatos por fêmea, ligeiramente menor que o grupo irradiado com 4 Gy, porém a comparação estatística com o grupo que não recebeu tratamento revelou um $p > 0,05$, indicando não haver diferença significativa entre eles.

O último grupo de animais testados foi composto de fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy, que foram submetidas a um transplante unilateral 7 dias após a irradiação e acasaladas 30 dias após o transplante. Entre as fêmeas irradiadas com 4 Gy, a performance reprodutiva tomando-se por base todos os 3 partos, indica um valor igual a $4,20 \pm 2,85$ nascimentos por fêmea, e mesmo menor que índice observado no grupo controle não irradiado ($5,6 \pm 2,61$), apresenta um $p > 0,05$, não significativo.

No caso das fêmeas deste grupo, tratadas com a dose de 6 Gy, que receberam o ovário 7 dias após a irradiação e foram acasaladas 30 dias após o transplante unilateral, foram observadas também 3 gestações e um desempenho médio igual a $4,86 \pm 2,26$ crias por fêmea, conforme tabela 7.

A análise estatística dos efeitos do transplante ovariano unilateral não revelou diferenças significativas entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos e o grupo controle da linhagem doadora não irradiada. Conforme pode ser observado na figura 6, o transplante ovariano restaurou as funções reprodutivas e possibilitou a prenhez, resultados já observados por outros autores (Prates, 2008). Estes resultados demonstram que o transplante ovariano realizado logo após a irradiação, possibilita a recuperação das funções reprodutivas, mesmo que o acasalamento aconteça somente após um período longo como 30 dias. Estes dados são importantes uma vez que, conforme observado no grupo controle irradiado, nenhuma fêmea apresenta prenhes neste período.

Entretanto, uma vez que a irradiação pode promover alterações importantes na molécula de DNA, tanto os nascimentos originados das fêmeas irradiadas foram observados, como também os filhos destes animais foram acasalados e a progênie acompanhada. A inexistência de fenótipos alterados não exclui por si só, a possibilidade de mutações pontuais de caráter silencioso no DNA. Neste sentido, apenas uma análise mais aprofundada dos aspectos fisiológicos e metabólicos destes animais poderia denunciar a presença destas mutações (Mello, 2006).

Por outro lado, a alteração fenotípica observada na pelagem dos animais irradiados, quando estes ficam mais velhos, demonstra que a radiação influenciou a expressão de genes envolvidos com a pigmentação, corroborando achados na bibliografia dos efeitos da radiação sobre o DNA (Nascimento et al.,1996).

Uma vez que existe a possibilidade, em transplantes ovarianos de camundongos, de fragmentos residuais do ovário removido continuarem funcionais por alguns partos, foram realizados testes genéticos que assegurassem que os nascimentos decorreram do ovário enxertado (Sztein,J.,*et al.*, 2010).

Estes testes se baseiam no polimorfismo presente em regiões específicas do cromossomo que podem ser investigadas com marcadores moleculares de DNA.

No presente trabalho foram empregados marcadores de microsatélite, normalmente utilizados tanto em testes de paternidade, quanto na certificação genética de linhagens isogênicas de camundongos. As regiões definidas com estes marcadores são amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e observadas em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Os resultados obtidos com este teste corroboram achados da bibliografia que indicam a necessidade de certificação genética das progênies derivadas da transferência ovariana (Salgado & Passos, 2009 e Sztein,J.,*et al.*, 2010) . Além disso confirmaram que em um período próximo pós à irradiação na dose de 4 Gy e 6 Gy, os ovários permanecem funcionais por algum tempo. Estes resultados já haviam sido observados nos grupos anteriores nos nascimentos do primeiro parto do grupo controle da irradiação.

Os mesmos ainda comprovam que em um período igual ou superior a 30 dias, todas os gametas presentes nos ovários irradiados nas doses de 4 Gy e 6 Gy foram destruídos, corroborando achados da bibliografia que estudam os efeitos tardios da radiação (Okumo, 2009).

Com o propósito de se avaliar outros efeitos da radiação sobre os ovários, que não apenas aqueles relacionados com a reprodução, as fêmeas irradiadas com 4 Gy e 6 Gy foram sacrificadas após o terceiro parto e seus ovários foram inspecionados e comparados com aquelas que receberam, por transplante ovariano bilateral, ovários não irradiados.

A análise macroscópica revelou uma coloração alaranjada (ferrugem), uma textura gelatinosa e um menor tamanho quando comparado com ovários não

irradiados. Não foram observadas diferenças quanto às doses, ou seja, estas características estavam presentes em todos os animais.

Estes resultados corroboram a bibliografia, onde diferentes autores demonstram que a lesão tissular após a irradiação, pode ocorrer como uma consequência a uma breve exposição a níveis elevados de radiação ou pela exposição prolongada a níveis baixos. Alguns efeitos adversos da radiação duram apenas pouco tempo; outros causam doenças crônicas. Os efeitos iniciais de doses altas de radiação tornam-se evidentes minutos ou dias após a exposição. Já os efeitos tardios podem tornar-se evidentes apenas semanas, meses ou mesmo anos mais tarde. Desta forma, os efeitos prejudiciais da radiação dependem da quantidade (dose), da duração da exposição e do grau de exposição (Lesões por radiação ionizante, 2010). Nos ovários inspecionados, as alterações observadas são condizentes com estes eventos, tanto com relação aos aspectos reprodutivos como também na observação macroscópica (Figura 18 e Figura 19).

Por fim, uma análise mais aprofundada destas alterações foi conduzida a partir da avaliação histológica dos ovários irradiados de fêmeas de ambas as linhagens (doadora e receptora) e a comparação dos resultados com ovários de fêmeas que não receberam tratamento.

Nos ovários das fêmeas que não receberam tratamento (figuras 20 e 21), são observados corpo lúteo, inúmeros folículos primordiais, células germinativas e óvulos, estruturas essenciais à reprodução (Hafez, 1993).

Por outro lado, conforme pode ser observado nas figuras 22 e 23, os ovários irradiados com 6 Gy e 4 Gy e avaliados 7 dias após a irradiação, apresentaram uma menor quantidade de óvulos e maior quantidade de células luteinizadas e vasos linfáticos quando comparados com ovários não irradiados. Os ovários irradiados com ambas as doses, porém avaliados 30 dias após a irradiação (figuras 24 e 25), apresentaram apenas células luteinizadas, demonstrando assim, a morte de todas as células germinativas e justificando a esterilidade observada como consequências dos efeitos tardios da radiação (Wallace, 2003 e Okumo, 2009).

Estes estudos demonstram que a energia liberada pode produzir ionização e excitação dos átomos e quebra das moléculas e, como consequência, formação de íons e radicais livres altamente reativos que irão interagir com componentes do organismo vivo (Nascimento et al., 1996 e Grosh et al., 1979). Além disso, os radicais livres formados podem, por sua vez, alcançar moléculas de grande

importância como o DNA presente no núcleo da célula, causando-lhe danos (Michaels & Hunt, 1978). A destruição de uma molécula de DNA resulta numa célula capaz de continuar vivendo, mas incapaz de se dividir. Contudo, a transferência ovariana apresentou-se como uma alternativa eficiente para evitar estes prejuízos, inclusive restabelecendo a reprodução.

A partir do nascimento de Louise Brown em 1978, primeiro bebê de proveta, ficou demonstrada a possibilidade de a fertilização ocorrer fora do organismo, ou seja, em condições de laboratório. Desde então, diversas técnicas têm sido desenvolvidas e evidenciaram a importância de estudos direcionados ao desenvolvimento de protocolos que tornaram possível a gestação em mulheres com dificuldades reprodutivas (Petroianu, *et al*, 2006).

Com o auxílio de tecnologias de reprodução assistida é atualmente factível a reversão de problemas de várias ordens, tais como aqueles decorrentes da perda da função ovariana após tratamentos quimioterápicos e ou radioterápicos e déficits de fertilidade adquiridos com o uso prolongado de drogas que alterem a fisiologia normal do aparelho reprodutor (Petroianu, *et al*, 2006). Dentre as tecnologias empregadas, destacam-se a fertilização *in vitro* (FIV), mais recentemente a ICSI (*Intracitoplasmatic Sperm Injection*) e a transferência de tecido ovariano (Trounson, 1996; Hogan, *et al*, 1994).

Originalmente, a fertilização *in vitro* (FIV) foi proposta para o tratamento de casos de infertilidade tubária onde mulheres com as trompas ausentes ou irreparavelmente obstruídas, podiam realizar o sonho da maternidade. Atualmente esta tecnologia é também empregada para o tratamento da infertilidade de outras etiologias (Trounson, 1996). Na FIV clássica, o óvulo e os espermatozóides são colocados em meios especiais e ficam em contato até que a fertilização aconteça; na ICSI, um espermatozóide é injetado diretamente dentro do óvulo por meio de um micromanipulador e na transferência de tecido ovariano, um pedaço do ovário é retirado e armazenado para posterior implante (Benavides, 2005).

Além das questões relacionadas com a viabilização da gestação, outras de carácter académico e ou biotecnológico podem ser avaliadas, empregando para tanto, protocolos de reprodução assistida (Benavides, 2005).

Apesar da complexidade dos aspectos éticos inerentes a iniciativas como a criação de um banco de tecidos ovariano para pacientes após o tratamento de câncer, os resultados deste estudo demonstram que a TO pode representar uma

esperança para mulheres que alimentam o sonho da maternidade, além de reduzir os incômodos da perda fisiológica relacionada com os hormônios ovarianos.

7. CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES:

- A transferência ovariana restabeleceu a capacidade reprodutiva dos animais em níveis praticamente normais.
- O tamanho médio da ninhada (índice de produção), não revelou diferenças significativas após a transferência ovariana.
- Fragmentos do ovário da receptora permaneceram funcionais em períodos próximos à irradiação com 4 Gy e 6 Gy.
- Os animais acasalados em períodos próximos à irradiação apresentaram um primeiro parto, enquanto os acasalados 30 dias após o tratamento não se reproduziram, evidenciando os efeitos tardios da radiação.
- A irradiação nas doses empregadas provocou danos importantes e irreversíveis nos ovários, conforme pode ser observado com a análise histológica destes órgãos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS, G.E., ALDRICH, J.E., BISBY, R.H., CUNDALL, R.B., REDPATH, J.L. & WILLSON, R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions inorganic radical anions with amino acids. ***Radiat.Res.***, 49:278-289.1972.

ALBERTI L.R., VASCONCELLOS L.S., BARBOSA J.F., PETROIANU A. Implante Autólogo Ovariano no Omento Maior, Estudo Experimental. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia**.Vol.24, no.3. Rio de Janeiro,2002.

ALESCO IND. E COM. Disponível em: <<http://www.alesco.ind.br>>. Acesso em: 21/09/2010.

AKAR, M.; OKTAY, K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. **Trends Endocrinol Metab**; Vol.16, n.8: p.374-380, 2005.

ANDRADE, M.C.R., A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental. 2006. Disponível em : <<http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>>. Acesso em 01/10/ 2006.

ANDRADE, A., PINTO, S.C., OLIVEIRA, R.S., ***Animais de Laboratório***: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

APPEL M., MÔNEGO H., RAMOS J. G. L., POLI M. E. H., et al. *Rastreamento e diagnóstico do câncer de ovário*. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 53 (3): 313-318, jul.-set. 2009.

BENAVIDES, J. F., GUÉNET, J. L. **Manual de Genética de Roedores de Laboratório**: Princípios Básicos y Aplicaciones. Editoras Universidad de Alcalá Sociedad Española para las Ciências Del Animal de Laboratório,1º ed., 2005.

BRUMINI, R. et al. Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-1980. Rio de Janeiro, **Campanha Nacional de combate ao Câncer**, Ministério da Saúde 1982.

BUTLER, J., HOEY, B.M. & SWALLOW, A.J., Radiation chemistry. ***Annu.Rep.Prog.Chem.***, **83**:129-175. 1987.

Cancer Topics. National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/ovarian>>. Acesso em 20/10/2010.

CHORILLI, M., MICHELIN, D.C., SALGADO, H.R.N., Animais de laboratório: o camundongo. ***Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada***, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CLÍNICA CONCEBER. Disponível em: <<http://www.clinicaconceber.com.br>> – Acesso em 05/10/2010.

Como funciona o câncer, Dr. Jerry Gordon, 2009. Disponível em:

<<http://www.forumfantastik.net/forum/archive/index.php/t-105502.html>> Acesso em 21/09/2010.

CUNLIFFE-BEAMER, LES, E. P., The laboratory mouse. ***The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals***. Editora Trevor B. Poole editora assistente Ruth Robinson. 6^o ed. Cap. 18 p. 289 – 291, 1987.

DAVID, A. R. & ZIMMERMAN M.R., Cancer: an old disease, a new disease or something in between? ***Nature Reviews Cancer*** **10**, 728-733, October 2010.

DEMEESTERE, I. et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. ***Oncologist***; Vol.12, p.1437-1442, 2007.

DETINGER, H & JUNG, H, (1970), The action of radiation on enzymes. The example of ribonuclease. IN: Dertiger, H. & Jung, H, (eds), ***Molecular Radiation Biology***. Ch.9, p.115-133. Berlin, Springer-Verberg, 1970.

DOSES DO GOVERNO. ARTIGOS TESE/EFEITOS DA RADIAÇÃO - dose-sensibilidades\Radioterapia doses do GOVERNO.mht – acesso em 06/10/2010.

Efeitos da Radiação em Seres Vivos. Disponível em

<<http://defaultent.comuv.com/radiacao.pdf>> . Acesso em 08/08/2010.

Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro. **INCA**, 1999.

FAGUNDES, D.J., Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**; 19(1): 59-65.2004.

FARRAGI, M., KLAPPER, M.H. & DORFMAN, L.M., Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical mode of electron migration. **J.Phys.Chem.**, **82**(5):508-512.1978.

FISIOLOGIA. Aparelho Reprodutor feminino. Disponível em : <<http://www.medipedia.pt> > funcionamento dos ovários e histologia. Acesso em 27/09/2010.

FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO. Disponível em: <www.foa.unesp.br/pesquisa> Acesso em: 06/10/2010.

GARRISON, W.M., Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. **Chem.Rev.**, **87**:381-398.1987.

GROSH, D.S. & HOOPYWOOD, L.E., *Biological effects of radiation*, 2nd ed., **New York, Academic Press**. 1979.

JUNIOR, R.J.A., OSHIMA, C.T.F., KIMURA, E.T., et al. Expressão da proteína TGFb1 em coração irradiado *in vivo*. **Radiol. Bras**. Vol.37, nº2. São Paulo, 2004.

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm Animals. 6 th edition, **Lea & Febiger** , Philadelphia, 1993.

HEYWOOD, R., The use of animals in testing. **ATLA**, 14(4):329-33; 1987.

HOLM K., NYSOM K., BROCKS V., HERTZ H., et al. Ultrasound B-mode changes in the uterus and ovaries and Doppler changes in the uterus after total body

irradiation and allogeneic bone marrow transplantation in childhood. **Bone Marrow Transplant.**23(3):259-63;1999.

HOSPITAL SANTA LÚCIA. Manutenção da fertilidade em pacientes oncológicos. Disponível em: <<http://hospitalsantalucia.com>> . Acesso em 20/08/2010.

INCA 2010 – Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em 02/08/2010.

INSTITUTO DO CÂNCER (**INCA**). Estimativa de câncer para 2008 – Disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> . Acesso em 02/2008.

IOV – Instituto de Oncologia do Vale, Radioterapia como funciona. Disponível em : < http://www.iov.com.br/info.../06_como_funciona_radioterapia.php> - Acesso em 21/09/2010.

JAINUDEEN, M. R. & HAFEZ, E.S.E. Cattle and buffalo. **In: Reproduction in farm animals**. 6th. Ed. Lea & Febiger , Philadelphia, 1993.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**; Vol.56, p.106-130, 2006.

LABORATÓRIO MERCK. Lesões causadas pela radiação. Disponível em: <<http://www.manualmerck.net/>> - Acesso em 06/10/10.

LABORATÓRIO ROCHE. InfoCancro. Disponível em: <<http://www.infocancro.com/Roche>>- Acesso em 04/10/2010.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Hum Reprod Update**; Vol.7, n.6: p.535-543, 2001.

MELLO, S. S. **Mecanismos de Resposta às Lesões no DNA Induzidas pela Cisplatina e Radiação Ionizante em Células Humanas**. Tese: Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, 2006.

MICHAELS, H.B., H.U.N.T., J.W., A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, **74**:23-34.1978.

MURTA, E.F.C. et al. Incidência, freqüência dos tipos histológicos e fatores de risco para o câncer de ovário. **Acta Oncol. Bras.** Vol. 16 – no. 1, 37-41, Jan-Fev-Mar., 1996.

McDONALD, L. E. Veterinary endocrinology and reproduction. 4th. Ed., **Lea & Febiger**, Philadelphia, 1989.

NASCIMENTO, N., SEEBART, C.S., FRANCIS, B., ROGERO, J.R., KAISER, I.I., Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, **34**(1):123-131.1996.

NOSSOV V., AMNEUS M., SU F., et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. an we really do better than serum CA-125. **Am J Obstet Gynecol**; 199 (3): 215-223, 2008.

NOVAK, E.R. & WOODRUFF, J.D. – Novak's gynecologic and obstetric pathology. Philadelphia, **W. B. Saunders**, 8^a ed., 1979.

OKUMO. Física para Ciências Biológicas e biomédicas. Portal brasileiro da radiação – Disponível em: <
www.radiacao.com.br/efeitos_biologicos_da_radiacao.html> . Acesso em 15/05/2009.

OZOLS R.F., RUBIN S.C., THOMAS G.M., et al., Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins et al. **Principles and Practice of Gynecologic Oncology**. New York: Ed Williams and Wilkins, 165-182. 2001.

PASSOS, L.A.C. **A utilização da PCR na monitoração genética de linhagens de camundongo utilizadas em imunologia**. Dissertação de mestrado em Ciência de Animais de Laboratório – Programa de Pós - graduação em Ciências Biológicas/Imunologia - Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas, 1996.

PASSOS, L. A. C. **Análise do determinismo genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas, 2003.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L.R.; VASCONCELLOS, L.S. Allogeneic ovarian orthotopic transplantation in rabbits without a vascular pedicle: morphological, endocrinologic, and natural pregnancy assessment. **Transplant Proc**; Vol.38, n.9: p.3092-3093, 2006.

PONIATOWSKI, B.C. et al. Chemoterapy induced menopause: a literature review. **Cancer Invest**; Vol.19, p.641-648, 2001.

PRATES, L.F.V.S. **Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento**. Dissertação de Mestrado em Saúde da Mulher, – Programa de Pós - graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2008.

REVISTA CIÊNCIA HOJE - ARTIGO, Novembro 2000. Disponível em: <<http://www.energiatomica.com.br/radiação.pdf>>. Acesso em 03/10/10.

REVISTA GALILEU. Cientistas sugerem que câncer é uma doença moderna causada pelo homem. Disponível em: <<http://revistagalileu.globo.com/Revista/Common.html>> Acesso em 20/10/2010.

RIBEIRO, S.M.L., Campos P, Tirapegui J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev. Farm. Bioquím. Universidade São Paulo**, 31(1): 21-8. 1995.

RIVERA E.A.B., Analgesia em animais de experimentação. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. **Animais de laboratório; criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.247-53. 2002.

RIVOIRE W.A., APPEL M., MÔNEGO H., REIS R., et al. Neoplasias de ovário e de trompa de Falópio. In: Freitas F, Menke C, Rivoire WA, Passos E. **Rotinas em Ginecologia**. 5. ed. Porto Alegre: Ed Artmed, 362-384; 2006.

RUSSELL, WILLIAM M.S. AND REX L. BURCH. **Principles of humane experimental technique**. Methuen, London, 1959.

SALGADO, A.R. & PASSOS, L.A.C. Reprodução Assistida. In: Lapchik, V.B.V., Mattaraia, V.G.M., Ko, G.M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. (28):445-473, 2009.

SALÉN, J.C.W., **Animal models: principles and problems**. In: Rollin BE, Kessel ML. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. 3rd.ed. Boston: CRC Press, 560p. 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. AND MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Second edition Vol. 2. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, 1989.

SANTOS, B.F., Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FioCruz, p.115-8, 2002.

SCHIMMER, A.D., QUATERMAIN, M., IMRIE K. et al. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation. **J Clin Oncol**.16(7):2359-63; 1998.

SEGRETO, R.A. & SEGRETO, H.R.C., Radiação Ionizante e resposta celular – atualidades. **Radiol. Bras.**, 30:301-307.1997.

SNITKOFF, G.G., Testes biológicos. In: **Gennaro AR. Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.556-68, 2004.

STIFF, P.J., BAYER R., KERGER C., et al. High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent/relapsed ovarian cancer: a multivariate

analysis of survival for 100 consecutively treated patients. **J Clin Oncol**; 15:1309-17, 1997.

SILVA, A.C.J.S.R., Preservação de Fertilidade. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**. vol.28, no.6, Rio de Janeiro, Junho, 2006.

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in female patients. **Hum Reprod Update**; Vol.10, p.251-266, 2004.

SZTEIN, J., VASUDEVAN, K., et al. Refinements in the cryopreservation of mouse ovaries. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**; vol 49, nº 4:420-422, July 2010.

TRANSPLANTE DE OVÁRIO. *Transplante de ovário restaura fertilidade e prolonga vida de fêmeas de camundongos. Disponível em: < [http://www. Ciência Diária.com.br](http://www.CiênciaDiária.com.br)>. Acesso em: 29/06/2010.*

TANGJITGAMOL S., MANUSIRIVITHAYA S., et al. Interval debulking surgery for advanced epithelial ovarian cancer: A Cochrane systematic review. **Gynecol Oncol**; 112: 257-264, 2009.

TRANSPLANTE AUTÓLOGO. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-regulares/23306/efeito-precondicionamento-isquemico-transplante-autologo>> - Acesso em 05/10/2010.

TURNER, J.E., Interaction of ionizing radiation with matter. **Health Physics**, **86**(3):228-252. 2004.

UFAW. Universities Federation for Animal Welfare. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 6th.ed. London: Churchill Livingstone, 1986.

WALLACE, W.H. The radiosensitivity of the human oocyte. **Hum. Reprod**; Vol.18, p.117– 121, 2003.

9 – ANEXOS:

ANEXO 1: EXTRAÇÃO DE DNA.

Extração de DNA por precipitação alcoólica a partir de orelha ou cauda.

1- Retirar a orelha ou ponta da cauda do animal com aproximadamente 1,5 cm e transferir para um tubo identificado.

2- Depositar em cada tubo 700 µL de Solução de Lise e 4 µL de proteinase K a 20mg/mL.

3- Deixar em banho-maria até o dia seguinte a 37°C.

4- Iniciar as lavagens:

Lavagem A: Adicionar em cada tubo 700 µL de fenol saturado e deixar em agitação lenta por 10 minutos. Centrifugar a 9000 rpm por 5 minutos, recolher o sobrenadante e transferir para outro tubo.

Lavagem B: Adicionar ao DNA 700 µL de clorofórmio e deixar em agitação lenta por 10 minutos. Centrifugar a 9000rpm por 5 minutos, recolher o sobrenadante e transferir para outro tubo.

Lavagem C: Acrescentar ao DNA 70 µL (10%) de acetato de sódio 3M e completar com álcool etílico absoluto PA. Homogeneizar até o DNA precipitar. Deixar em freezer a -20°C por 20 minutos. Recolher a medusa com ponteira fina ou palito de madeira e depositá-la em outro tubo com cerca de 250 µL de água deionizada autoclavada.

5- Deixar o tubo em estufa a 50°C por algumas horas e depois mantê-lo em geladeira a 4°C.

Preparo das soluções:

FENOL SATURADO:

- 80 mL fenol
- 80 mL Tris HCl 0,5M – pH8,0

SOLUÇÃO DE LISE:

- 5 mL SDS 20%
- 5 MI NaCl 5M
- 10 mL Tris HCL 1M – pH 8,0
- EDTA 0,5M - pH 8,0

ANEXO 2: REAÇÃO PCR.

PCR - (Reação em Cadeia da Polimerase)

1- Confeccionar o protocolo para as amostras.

2- Calcular o volume dos reagentes de acordo com a quantidade de amostras a serem testadas.

- Reação para 1 amostra, de 25 μL de solução:

18,2 μL	H ₂ O
2,5 μL	Tp10x
2 μL	MgCl ₂ 25mM
0,5 μL	Dntps 5mM
0,35 μL	Primer 1
0,35 μL	Primer 2
0,1 + 0,1 μL	Taq polimerase
1 μL	DNA

3- Distribuir do DNA de cada amostra na placa, conforme protocolo.

4- Juntar ao DNA 24 μL da reação, cobrir com uma gota de óleo mineral e levar ao Termociclador.

Ciclo de Amplificação – Programa do Termociclador:

1º - 94°C/ 3 minutos.

2º - 92°C/ 1 minuto.

3º - 55°C/ 45 segundos.

4º - 72°C/ 30 segundos.

5º - Repetir a 2º etapa por 49 vezes.

6º - 72°C/ 5 minutos.

7º - 25°C/ 30 segundos.

8º - Hold 4°C.

ANEXO 3: ELETROFORESE.

Fazer o mapa da eletroforese de acordo com o protocolo de PCR, planejando a disposição das amostras no gel.

A - Preparo do gel de agarose na concentração apropriada:

- Pesar a agarose
- Diluir em TBE 0,5X
- Acrescentar Brometo de Etídio, despejar na bandeja com os pentes e

deixar polimerizar.

B - Acrescentar às amostras aproximadamente 2,5 µL de Azul de Bromofenol.

C – Mergulhar o gel em uma cuba com tampão 0,5X . Aplicar no gel o DNA com Azul de Bromofenol e o padrão de peso molecular nos poçinhos de acordo com seu mapa de eletroforese.

D - Deixar em corrida por 1 hora e 20 minutos em cuba de eletroforese a 180V 400mA.

E - Levar ao fotodocumentador para o registro fotográfico.

F - Analisar os resultados.

Preparo das soluções:

TBE 10X

Tris - 216mg
Ácido Bórico - 110mg
EDTA 0,5M - pH8,0
qsp.2000 mL

GEL DE AGAROSE 4,2 %

12 mg - Agarose ultrapure
0,4 mg - Agarose tipo II
diluir em 300mL de TBE 0,5X

BROMOPHENOL BLUE C/ SACAROSE

25mg - Bromophenol
4mg - Sacarose
qsp. 10mL

BROMETO DE ETÍDEO

100mg - Brometo de Etídeo
qsp.10mL




Parecer - Projeto N° 63/10/CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“TRANSFERÊNCIA OVARIANA COMO ALTERNATIVA PARA A RESTAURAÇÃO DAS FUNÇÕES REPRODUTIVAS EM FÊMEAS DE CAMUNDONGOS IRRADIADAS COM RADIAÇÃO GAMA DE CO-60”** de responsabilidade do pesquisador **LUIZ AUGUSTO CORRÊA PASSOS** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA

São Paulo, 11 de junho de 2010



Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN