

FABRÍCIO SILVA MANOEL

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VIABILIDADE DO
TRANSPLANTE OVARIANO PARA RETROPERITÔNIO
DE RATAS**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a conclusão
do Curso em Graduação em Medicina.**

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

2000

FABRÍCIO SILVA MANOEL

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VIABILIDADE DO
TRANSPLANTE OVARIANO PARA RETROPERITÔNIO
DE RATAS**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão do Curso em Graduação em
Medicina.

**Coordenador do Curso: PROFESSOR DOUTOR EDSON JOSÉ
CARDOSO**

Orientador: PROFESSOR DOUTOR. ARMANDO JOSÉ D'ACAMPORA

Co-orientador: PROFESSOR DOUTOR RICARDO TRAMONTE

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

2000

Manoel, F. S.. *Análise Histológica da Viabilidade do Transplante Autólogo Ovariano em Retroperitônio de Ratas.*

**Florianópolis, 2000.
37 p.**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina para a conclusão do
Curso de Medicina – Universidade Federal de Santa Catarina.
1.Ovário 2.Tranplante autólogo 3.Ratos**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. ARMANDO JOSÉ D'ACÂMPORA**, Chefe da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, pelas orientações e por sua dedicação aos pacientes como médico e aos alunos como professor.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. RICARDO TRAMONTE**, Professor da Cadeira de Histologia do Curso de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, pelas incansáveis orientações, pela paciência e pelos anos de empenho e dedicação no ensino da Histologia, e também ao laboratório de Histologia.

Aos acadêmicos do curso de Medicina **ROGÉRIO RODRIGUES SCHMIDT, CYRO RIGGENBACH MÜLLER, HEITOR TOGNOLI, ANDRESSA OLIVEIRA e SILVIA DOBES RAYMUNDI**, pela amizade, companheirismo, dedicação, empenho e bom-humor, sem os quais não teria concluído este trabalho, e também aos demais amigos do curso de Medicina.

A acadêmica **KÁTIA LIN** por sua amizade e solicitude, sempre existentes e também pelo auxílio no *Summary*.

Ao **Dr. SÉRGIO TRINDADE MÜLLER** pelo apoio e também pelos fios cedidos.

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, seus professores e funcionários, agradecendo especialmente aos funcionários **Sr. LUÍS HENRIQUE PRAZERES e Sr. CHARLES VEIGA**.

A meus familiares pela compreensão e apoio e a minha namorada, **TATIANA VON DOKONAL**, por estar sempre a meu lado.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. OBJETIVO.....	7
3. MÉTODO.....	8
4. RESULTADOS.....	13
5. COMENTÁRIO DOS RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. REFERÊNCIAS.....	27
NORMAS ADOTADAS.....	30
RESUMO.....	31
SUMARY.....	33
APÊNDICE	34
ANEXO.....	37

1. INTRODUÇÃO

O ovário tem como função primordial garantir a fertilidade da mulher, através da produção dos gametas femininos, e de hormônios, principalmente estrogênio e progesterona. Eles auxiliam a função reprodutora feminina, apresentam ação no desenvolvimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários e influenciam também em fatores sistêmicos como o metabolismo das lipoproteínas e da reabsorção óssea ^{1,2}.

Em torno da 6.^a década da vida, ocorre o declínio progressivo da atividade gonadal, há uma falência fisiológica, vindo a marcar a transição da idade fértil para a não-fértil. Este período da vida feminina é denominado climatério ^{3,4,5,6}.

Considera-se a síndrome climatérica como prematura quando esta ocorre antes da 5.^a década de vida. Ela apresenta incidência entre 3 e 5% e caracteriza-se por amenorréia secundária hipergonadotrófica ⁷.

A etiologia da síndrome climatérica prematura é atribuída a múltiplos fatores como desordens genéticas auto-imunes, destruição das células germinativas por infecção viral, drogas, tóxicos ou radiação ionizante, disfunção hipotalâmico/hipofisária, disgenesia gonadal, quimioterapia e ablação ovariana por ooforectomia ^{7,8}.

A ablação cirúrgica do ovário é realizada em um número significativo de mulheres em idade reprodutiva, acometidas por doenças que devem ser tratadas por tal procedimento, como as neoplasias ovarianas, benignas ou malignas, disgenesia gonadal, endometriose e abscesso tubo-ovariano que não responde à antibioticoterapia. Esta ablação ocorre geralmente como um todo, sem que

permaneça no local qualquer segmento glandular que se mostre funcionante^{9,10,11}.

O hipoestrogenismo decorrente destas situações manifesta-se clinicamente como distúrbio vasomotor representado por “fogachos” (calorão), alterações tróficas da pele e mucosa genital, com alteração da pilificação vulvar e diminuição do volume dos grandes lábios, diminuição da espessura do epitélio vaginal e da sua lubrificação natural, alterações psicológicas, modificação do perfil lipídico com aumento dos níveis de LDL e triglicerídeos e diminuição dos níveis de HDL, além de aumento da velocidade de perda de massa óssea. Como tratamento, preconiza-se a terapia de reposição hormonal (TRH)^{3,4,5,6,7}.

Na TRH, o estrogênio pode ser repostado pelas vias transdérmica, oral, intravaginal, subcutânea ou intramuscular. A opção da via de administração a ser utilizada é realizada de acordo com o perfil clínico da paciente. A reposição visa aliviar os sintomas vasomotores e psicológicos, prevenir a osteoporose e minimizar as alterações sofridas pelo aparelho cardiovascular na vigência de hipoestrogenismo^{4,12}.

Apesar de a TRH já estar estabelecida pela literatura como tratamento para o hipoestrogenismo^{5,6}, a opção de transplante ovariano tem sido estudada, ainda em animais de experimentação, como possível via alternativa para a resolução do problema. Ao longo de seu estudo, o transplante ovariano experimental tem sido submetido a várias situações. Ele já foi realizado de forma autóloga e heteróloga, com e sem a preservação de pedículo vascular e implantado em diversas regiões do corpo^{13,14,15}.

Os trabalhos até agora presentes na literatura indicam claramente que os ovários transplantados de maneira autóloga em animais experimentais mostram sinais morfológicos de funcionalidade. Tendo sido descritos principalmente a presença de folículos ovarianos, corpos lúteos e de neoformação vascular, encontrados em diferentes períodos de tempo pós-operatório^{13,16,17}. Os trabalhos

que realizaram o transplante de maneira heteróloga indicaram sinais claros de rejeição do tecido ovariano implantado.^{13,15}

No entanto, não foi possível encontrar na literatura analisada nenhum trabalho que estudou sob o ponto de vista morfológico os aspectos histológicos indicativos de funcionalidade em ovários seccionados e autotransplantados em animais experimentais, para o retroperitônio. A maioria dos trabalhos verificados na literatura pertinente não deixa claro quais critérios morfológicos utilizados para obtenção dos dados. Torna-se crucial a indicação destes critérios para uma melhor compreensão dos aspectos morfológicos indicativos do restabelecimento da funcionalidade ovariana.

2. OBJETIVO

Analisar a presença de sinais morfológicos indicativos de restabelecimento da função ovariana, em hemi-ovários autotransplantados em retroperitônio de ratas Wistar.

3. MÉTODO

3.1. AMOSTRA

Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* (Rodentia Mammalia), da linhagem Wistar, com idade de 60 dias, do sexo feminino, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (U.F.S.C.).

Os animais, submetidos a ooforectomia bilateral, seguida de autotransplante de hemi-ovário direito para retroperitônio, foram distribuídos, aleatoriamente, em seis subgrupos compostos por 8 animais, de acordo com os diferentes tempos pós-operatórios nos quais foram submetidos a sacrifício.

Subgrupo G1 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 24 horas.

Subgrupo G2 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 72 horas.

Subgrupo G3 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 5 dias.

Subgrupo G4 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 7 dias.

Subgrupo G5 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 14 dias.

Subgrupo G6 (n = 8) – realizado o sacrifício no período pós-operatório de 28 dias.

3.2. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Os ratos foram submetidos à anestesia geral com éter etílico via inalatória, seguida da administração solução de Cetamina[•] e Xilasina[♦], nas respectivas doses de 35mg/Kg e 5mg/Kg, por via intramuscular, na face interna da pata traseira esquerda, para manutenção anestésica. O animal foi considerado anestesiado, quando houve perda do reflexo córneo-palpebral sem exibir qualquer reação motora à preensão do coxim adiposo de uma de suas patas dianteiras. Repetiram-se 50% da dose inicial da solução quando o animal apresentar algum sinal de superficialização da anestesia.

3.3. TÉCNICA CIRÚRGICA

Depois de atingido o plano anestésico os animais foram submetidos a ooforectomia bilateral, seguida de implante de metade do ovário direito em retroperitônio, sobre a fáscia do músculo psoas maior direito, imediatamente abaixo à veia íleo-lombar, realizada através de laparotomia mediana. Após o término do implante, foi realizado o fechamento da cavidade por planos.

3.4. EVOLUÇÃO CLÍNICA PÓS-OPERATÓRIA

Os animais foram examinados durante a recuperação anestésica e em visitas constantes, até que se completasse o período previsto para o sacrifício.

• KETALAR[®] Laboratório PARKE-DAVIS[®]
♦ ROMPUM[®] Laboratório BAYER[®]

No período pós-operatório, foi realizada a observação diária da ferida operatória com relação aos sinais de hemorragia, deiscência e infecção, além de edema em membros posteriores.

3.5. TÉCNICA DE REOPERAÇÃO

Atingido o tempo pós-operatório previsto para realização do sacrifício, os animais foram submetidos novamente ao procedimento anestésico descrito anteriormente.

Foi realizado o acesso à cavidade peritoneal por meio de uma ampla incisão em “U” invertido.

Visualizado e identificado o local de implante, com tesoura de METZENBAUM, foi realizada a exérese de um fragmento em bloco de aproximadamente 2,0 x 1,0 x 1,0cm contendo o fragmento do músculo psoas maior e a região do implante do tecido ovariano no centro. A exérese foi realizada com três incisões: a primeira imediatamente caudal ao local do implante e perpendicularmente à orientação das fibras do músculo psoas maior; a segunda paralela as mesmas estendendo-se em sentido cranial ao nível da veia íleo-lombar, e a terceira perpendicular as mesmas e imediatamente cranial à veia ílio-lombar.

Após a retirada da peça operatória, os animais, ainda anestesiados, eram submetidos a sacrifício por deslocamento cervical.

3.6. ESTUDO HISTOLÓGICO

Cada peça operatória ressecada foi fixada em solução aquosa de formol tamponado (PBS 0,4M pH7,4) a 10% por um período de no mínimo 24 horas

em temperatura de 4 graus centígrados mantida com a utilização de um refrigerador.

Estas peças foram submetidas à inclusão em parafina, seguindo a técnica histológica de rotina, sendo em seguida, obtidos 5 cortes semi-seriados de 10 μ m de espessura de cada uma das peças, no sentido transversal do ovário implantado, conforme indica a figura abaixo (FIGURA 1).

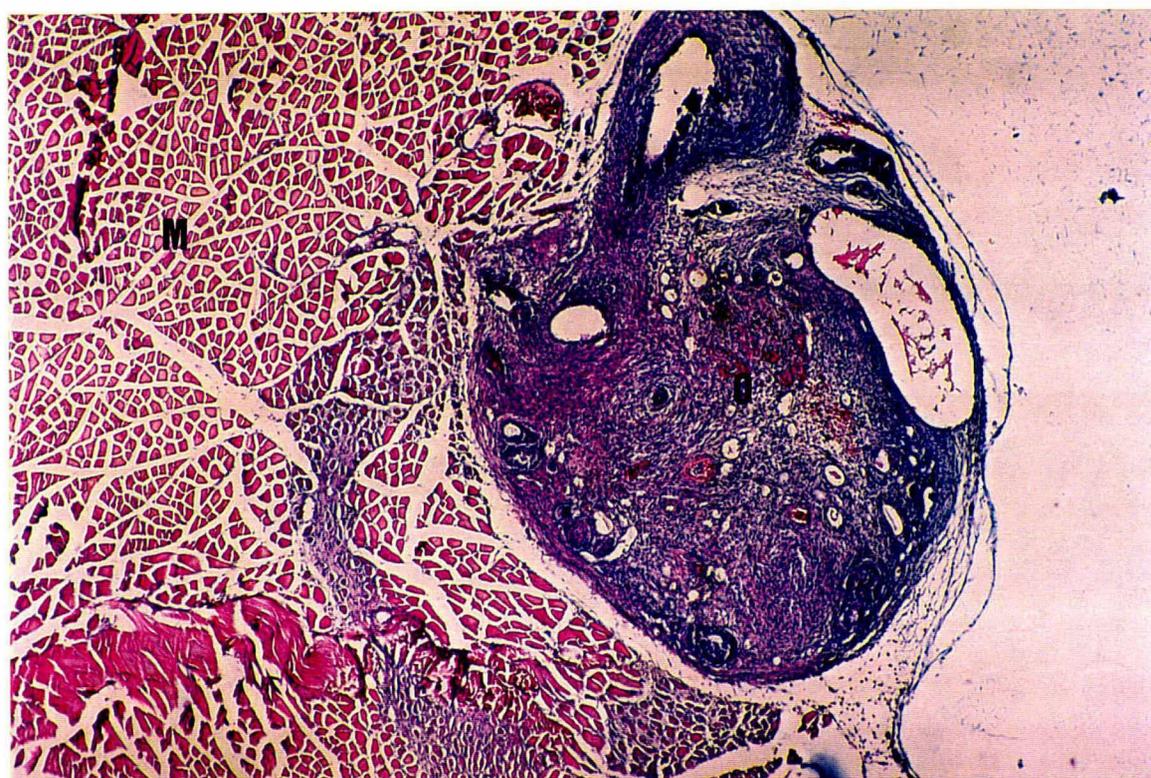


Figura 1 - Fotomicrografia de um corte histológico de ovário (O) implantado no músculo psoas maior (M), indicando a posição da secção transversal realizada na peça histológica (Objetiva 4X).

Os cortes obtidos foram submetidos a coloração pela Hematoxilina-Eosina, seguindo a técnica de rotina.

Todos os cortes foram analisados por 2 observadores independentes, sem que os mesmos soubessem a qual subgrupo experimental pertencia o corte analisado.

A análise das lâminas coradas foi realizada em microscópio óptico convencional, empregando-se oculares dotadas de régua ocular previamente calibrada para cada uma das objetivas de 4 X, 10 X, e 40 X, presentes no microscópio. Desta análise foram obtidos os parâmetros morfométricos de cada um dos subgrupos experimentais.

Os parâmetros morfométricos empregados foram:

1. Presença ou ausência de tecido de granulação, tanto no ovário como no tecido conjuntivo do músculo psoas maior.

2. Presença ou ausência de folículos ovarianos em desenvolvimento no parênquima do ovário implantado.

3. Presença ou ausência de vasos sanguíneos neoformados situados entre o parênquima ovariano e o músculo psoas maior.

4. Presença ou ausência de folículos ovarianos primários no parênquima ovariano.

5. Presença ou ausência de folículos ovarianos maduros (com antro único e sendo visível o ovócito e a camada de células granulares do folículo).

6. Presença ou ausência de células teco-luteínicas ou granuloso-luteínicas no parênquima ovariano.

Os resultados encontrados foram registrados no Protocolo I (apêndice).

Após a análise de todas as lâminas obtidas, foram obtidas fotomicrografias representativas de cada um dos subgrupos experimentais analisados, através de fotomicroscópio binocular NIKON[®], a fim de se proceder a documentação do trabalho.

Tabela 4 – Folículos em desenvolvimento, por subgrupo.

Folículos	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Presença	4	50	7	87,5	3	37,5	5	62,5	5	62,5	8	100
Ausência	4	50	1	12,5	5	62,5	3	37,5	3	37,5	0	0
Total	8	100										

Tabela 5 – Folículos maduros, por subgrupo.

Folículos maduros	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Presença	0	0	0	0	0	0	3	37,5	6	75	7	87,5
Ausência	8	100	8	100	8	100	5	62,5	2	25	1	12,5
Total	8	100										

Tabela 6 – Vasos neoformados, por subgrupo.

Vasos sanguíneos	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Presença	6	75	7	87,5	6	75	7	87,5	8	100	8	100
Ausência	2	25	1	12,5	2	25	1	12,5	0	0	0	0
Total	8	100										

Tabela 7 – Número médio de vasos neoformados, por subgrupo.

Vasos	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Número médio	3,66	6,4	2,6	8,5	>10	8,5

Tabela 8 – Corpos lúteos, por subgrupo.

Corpos lúteos	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Presença	1	12,5	5	62,5	1	12,5	5	62,5	8	100	8	100
Ausência	7	87,5	3	37,5	7	87,5	3	37,5	0	0	0	0
Total	8	100										

Tabela 9 – Número médio de folículos nos ovários autotransplantados, por subgrupo.

Folículos	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Em desenvolvimento	7,75	3,5	2,5	3,9	2,8	2
Maduros	0	0	0	1,33	2	1,75

5.COMENTÁRIO DOS RESULTADOS

SUBGRUPO 1

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 24 horas após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em 75 % dos ovários, não sendo observada nenhuma presença de tecido de granulação nos músculos psoas.

Folículos primários, assim como folículos maduros, não foram visualizados. Entretanto foi visualizada presença de folículos em desenvolvimento, em 50 % dos ovários autotransplantados, com um número médio de 7,75 folículos em cada um destes. A presença de células luteínicas foi observada em 12,5 % dos ovários.

Neoformação vascular foi visualizada em 75 % das peças, com número médio de 3,66 vasos em cada uma destas.

Em 2 peças (25%) foram observados grandes abscessos.

SUBGRUPO 2

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 72 horas após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em todos os ovários e músculos psoas.

Folículos primários foram visualizados em 50 % dos ovários autotransplantados. Em 87,5 % deles foi visualizada a presença de folículos em desenvolvimento, com um número médio de 3,5 folículos em cada um destes ovários. Não foram visualizados folículos maduros. Células luteínicas foram observadas em 62,5 % dos ovários.

Em 87,5 % das peças foi visualizada neoformação vascular, com número médio de 5,4 vasos em cada uma destas.

Em 3 peças (25%) foram observados abscessos. 1 das peças encontrava-se completamente tomada por infiltrado inflamatório.

Estes achados podem ser visualizados na figura 2.

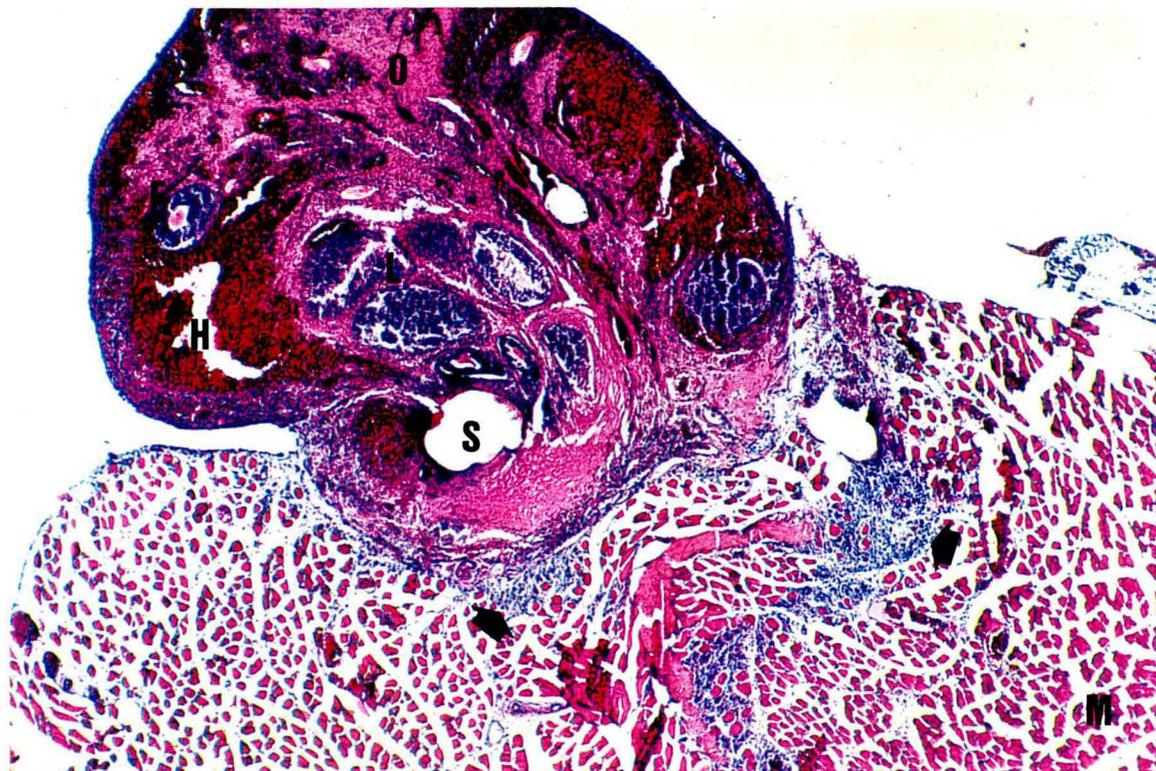


Figura 2 – Fotomicrografia da região do implante de um animal do subgrupo 2. Há uma visão geral do ovário (O) implantado no músculo psoas (M). É possível visualizar reação inflamatória na intimidade do músculo psoas, estendendo-se até a periferia do parênquima ovariano adjacente (setas). No parênquima visualiza-se o óstio provocado pelo fio de sutura (S), envolvido por reação inflamatória. Ainda no parênquima ovariano são visualizados corpos lúteos (L), folículos em desenvolvimento (F) e grandes acúmulos de hemácias (H) extravasadas (Objetiva 4x).

SUBGRUPO 3

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 5 dias após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em 87,5 % dos ovários e em 75 % dos músculos psoas.

Foi visualizada presença de folículos em desenvolvimento, em 37,5 % dos ovários autotransplantados, com um número médio de 2,5 folículos em cada um destes. Entretanto não foram visualizados folículos primários e folículos maduros. A presença de células luteínicas foi observada em 12,5 % dos ovários.

Neoformação vascular foi visualizada em 75 % das, com número médio de 2,6 vasos em cada uma destas. Em 3 peças (25%) foram observados abscessos. Estes achados podem ser visualizados na figura 3.

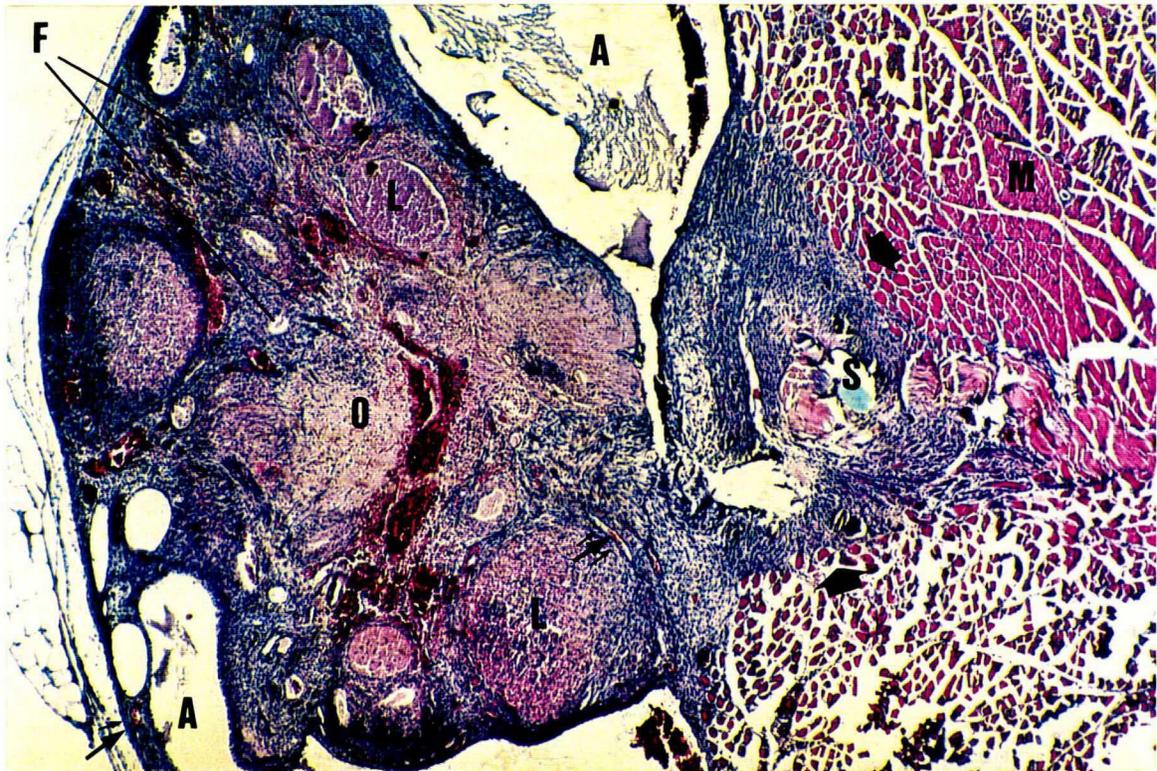


Figura 3 – Fotomicrografia da região do implante de um animal do subgrupo 3. Visão geral de ovário (O) implantado sobre o músculo psoas (M). Percebe-se infiltrado inflamatório moderado (setas maiores) na intimidade do músculo e parênquima ovariano adjacente. No parênquima ovariano visualizam-se corpos lúteos (L) folículos ovarianos (F) e vasos sanguíneos (setas menores). Também são visualizados dois grandes abscessos (A) e o fio de sutura (S) (Objetiva 4x).

SUBGRUPO 4

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 7 dias após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em 87,5 % dos ovários e em 50 % dos músculos psoas.

Em 50 % destes ovários foram visualizados folículos primários. Em 62,5 % deles foram vistos, em média, 3,9 folículos em desenvolvimento. 1,33 folículos maduros foram observados em 37,5 % dos ovários, em média. A presença de células luteínicas foi observada em 62,5 % dos ovários.

Neoformação vascular foi visualizada em 87,5 % das peças, com número médio de 8,5 vasos em cada uma destas. Em 1 peça (12,5%) foi observado abscesso. Estes achados podem ser observados na figura 4.

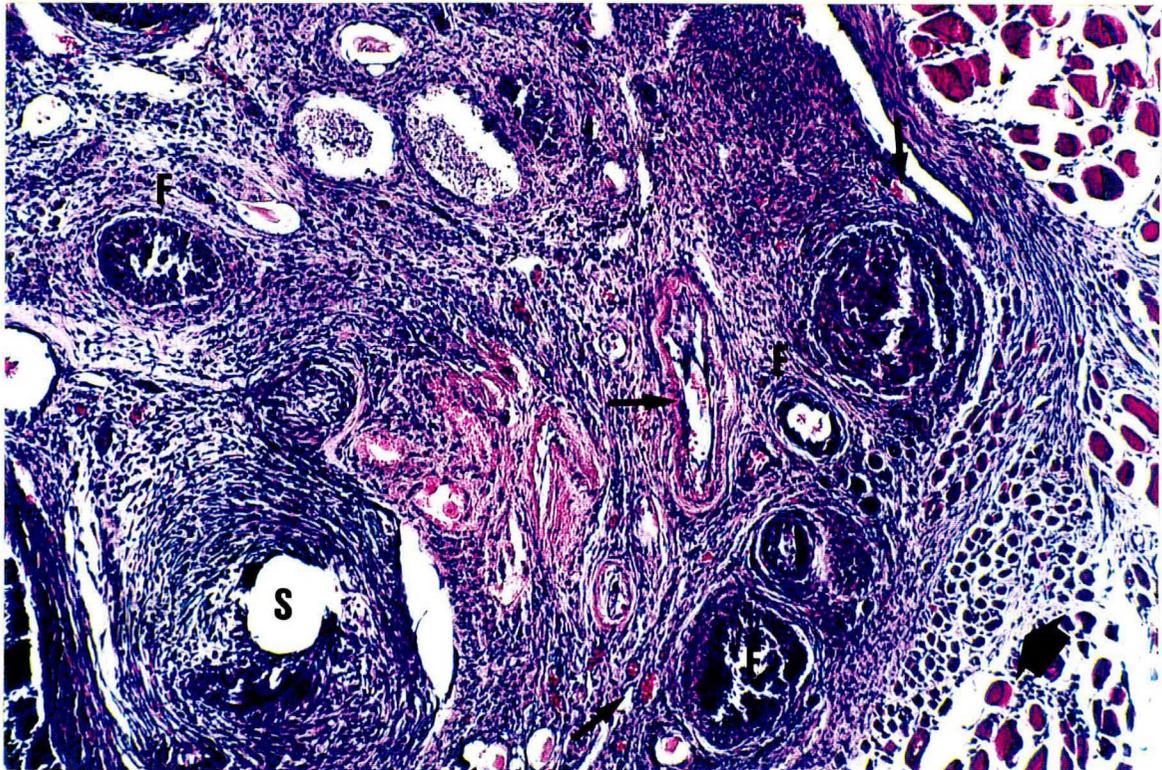


Figura 4 – Fotomicrografia da região do implante de um animal do subgrupo 4. Visualiza-se discreta reação inflamatória entre o músculo psoas e o parênquima ovariano (seta maior). Neste são visualizados folículos em vários estágios de desenvolvimento (F) e vasos sanguíneos com hemácias em sua luz (setas menores). Visualiza-se também o óstio do fio de sutura com granuloma organizado a sua volta (S) (Objetiva 10x).

SUBGRUPO 5

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 14 dias após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em 75 % dos ovários e em 25 % dos músculos psoas.

Folículos primários se mostraram presentes em 75 % dos ovários. Também foram visualizados em 62,5 % deles, em média, 2,8 folículos em desenvolvimento. 1,5 folículos maduros, em média, foram observados em 75 % dos ovários. A presença de células luteínicas foi observada em todos os ovários.

Neoformação vascular foi visualizada em todas as peças, com número médio de vasos superior a 10 por peça.

Estes achados podem ser observados na figura 5.



Figura 5 - Fotomicrografia da região do implante de um animal do subgrupo 5. Visualiza-se grande corpo lúteo (L) no parênquima ovariano. Adjacente a ele, é possível identificar um folículo em desenvolvimento com ovócito presente (F). São também visualizados vasos sanguíneos na interface ovário-músculo (setas) (Objetiva de 10x).

SUBGRUPO 6

Nas peças cirúrgicas retiradas e fixadas 28 dias após a realização do autotransplante, foi observada a presença de tecido de granulação em 75 % dos ovários e em 25 % dos músculos psoas.

Folículos primários se mostraram presentes em 37,5 % dos ovários. Em todos eles foram visualizados folículos em desenvolvimento, 2,0 em média. Folículos maduros foram observados em 87,5 % dos ovários, 1,75 em média. A presença de células luteínicas foi observada em todos os ovários.

Neoformação vascular foi visualizada em todas as peças, em média 8,5 vasos por peça.

Estes achados podem ser observados na figura 6.



Figura 6 - Fotomicrografia da região do implante de um animal do subgrupo 6. É evidenciado folículo maduro (F). Percebe-se a presença de vaso entre o parênquima ovariano e o tecido muscular (setas) (Objetiva 4x).

6. DISCUSSÃO

O transplante ovariano, autólogo ou heterólogo, tem como principal objetivo a preservação da função ovariana.^{16,18}

A literatura especializada sugere que futuramente o transplante ovariano poderá vir a ser utilizado como forma de preservação da fertilidade^{16, 19} e como opção mais fisiológica de reposição hormonal. Para as pacientes portadoras de disgenesia gonadal, especialmente a síndrome de TURNER, a literatura prevê a possibilidade de transplante ovariano heterólogo como forma de tratamento.¹⁸

O transplante ovariano já foi realizado de maneira heteróloga por HARRIS e EAKIN¹³ em ratos e por GREEN et al.¹⁵ em coelhos. Ambos demonstraram a ocorrência de rejeição aos ovários transplantados.

Foram também realizadas diversas técnicas de transplante autólogo, em várias espécies de animais, com sucesso demonstrado pela literatura.^{13,14,15,16,17,18}

Nos estudos realizados sobre autotransplante ovariano, o rato foi o animal mais utilizado, já que ele oferece maior número de dados para comparação de resultados morfológicos. Este foi escolhido como animal de experimentação para a realização do presente trabalho devido às suas características. Ele apresenta um ciclo ovariano curto, completando-se em torno de 4 ou 5 dias, ideal para estudar a recuperação da função ovariana, em um período curto de avaliação pós-operatória¹⁹. Além disso, o mesmo apresenta-se também como animal de fácil manuseio²⁰, baixo custo e obtenção.

Optou-se em utilizar a técnica de autotransplante ovariano sem utilização de pedículo vascular, tendo em vista sua facilidade de realização, conforme demonstrado pela literatura especializada^{13,14,15,16,17,18}.

Utilizou-se a metade de um ovário para o autotransplante, com base no trabalho de CORLETA et al. ¹⁶, que comparou os resultados obtidos entre o autotransplante de ovários inteiros e fragmentados, e concluiu que a utilização de fragmentos ovarianos garante maior taxa de viabilidade ovariana.

Pelos dados obtidos neste trabalho foi possível verificar que houve preservação da viabilidade ovariana, devido a presença de folículos ovarianos, neovascularização e corpos lúteos. Isto corrobora a maioria dos resultados obtidos pelos autores que utilizaram técnica de transplante ovariano semelhante a esta ^{13,14,16,17}.

Os folículos ovarianos (os 3 tipos descritos) foram visualizados a partir de 24 horas de pós-operatório, em 50 % dos ovários autotransplantados. Isto sugere que a nutrição do tecido ovariano, aparentemente por embebição, foi eficaz, impedindo que houvesse degeneração de suas células funcionais nas primeiras 24 horas após o transplante.

Com 72 horas de pós-operatório, o número de ovários nos quais foram visualizados folículos subiu para 87,5 %, confirmando a manutenção eficaz da nutrição ovariana, sugerida com 24 horas.

Entretanto, no 5º dia de pós-operatório folículos foram visualizados em menor quantidade dos ovários autotransplantados. Este dado sugere que houve algum grau de sofrimento do tecido neste período.

No 7º dia foi demonstrada recuperação da produção folicular. Esta recuperação manteve-se no 14º dia de pós-operatório, sugerindo manutenção de uma produção folicular, provavelmente por estabilização da nutrição ovariana, garantida pela neovascularização .

Com 28 dias de pós-operatório os folículos foram visualizados em todos os ovários sugerindo a manutenção da sua viabilidade até esta data, o que está de acordo com a maioria dos trabalhos presentes na literatura consultada ^{13,14,16,17}.

O corpo lúteo é uma estrutura que representa um sinal direto da ocorrência de ovulação^{1,2}.

No presente trabalho, corpos lúteos puderam ser observados a partir de 24 horas de pós-operatório até o 28º dia. Cabe ressaltar que em relação a este parâmetro analisado, verificou-se que no 5º dia ocorreu uma diminuição leve do número de ovários que apresentavam esta estrutura, sendo verificado um aumento progressivo numérico de ovários contendo o corpo lúteo nos subgrupos de animais com tempo pós-operatórios subsequentes.

Este dado vem reforçar a suposição de que a partir do 7º dia de evolução há estabilização da nutrição ovariana, com manutenção de sua função.

Nos ovários autotransplantados, o tecido de granulação foi visualizado com 24 horas de pós-operatório apenas no tecido ovariano, em 75 % dos ovários. A partir de 72 horas, o tecido de granulação já pôde ser visualizado nos dois tecidos muscular e ovariano. A partir do 5º dia, a reação inflamatória continuava presente nos dois tecidos (em 87,5 % dos ovários e em 75 % dos músculos). No 7º dia, este tecido de granulação presente no tecido muscular, se apresentava em um menor número de peças (50 %), neste período o tecido de granulação presente nos ovários manteve o mesmo percentual em relação ao 5º dia. No 14º dia, o tecido de granulação continuava visível nos ovários e músculo psoas, com diminuição acentuada no músculo psoas e leve nos ovários. No 28º dia este tecido de granulação manteve o mesmo percentual nos ovários analisados e houve um aumento da sua presença no músculo psoas.

A presença de vasos neoformados foi visualizada em todos os períodos pós-operatórios estudados, demonstrando a precocidade de início da revascularização. A neoangiogênese apresentou-se com 24 horas de evolução em 75 % dos ovários autotransplantados, com número médio de 3,66 vasos em cada gônada. Com 72 horas de pós-operatório, a neovascularização se fazia presente já em 87,5 % dos ovários, com número médio de 5,4 vasos. No 5º dia, houve uma

pequena queda da porcentagem de ovários com neovascularização (75 %), assim como no número médio de vasos (2,6). Fato que provavelmente explica a queda na porcentagem de folículos ovarianos e corpos lúteos neste período pós-operatório. A partir do 7º dia de pós-operatório verifica-se que ocorre um progressivo aumento desta neovascularização até o 28º dia .

Confrontando nossos resultados com os dados presentes na literatura, pudemos observar que a nossa taxa de presença de folículos após 28 dias (100 %) foi superior àquelas relatadas por HARRIS e EAKIN¹³ em 1949 (90,1%) após 30 dias de pós-operatório, por HARP et al.¹⁷, em 1982 (75 %) após 45 dias de pós-operatório e por CORLETA et al.¹⁶ em 1998 (88,8 %) após 21 dias de pós-operatório.

HARRIS e EAKIN¹³ demonstraram também taxa de presença de corpos lúteos de 90,1 % após 30 dias de pós-operatório. Nossa taxa, com 28 dias, revelou-se superior, com presença de corpos lúteos em todas as peças. QUATTROPANI¹⁴ demonstrou taxa de aparecimento de corpos lúteos após 14 dias de pós-operatório de 30 %, valor muito inferior àquele encontrado por nós neste mesmo período pós-operatório (100 %).

A presença de neovascularização foi demonstrada por nosso estudo já com 24 horas de pós-operatório. Este dado é condizente com os dados descritos por HARRIS e EAKIN¹³, em 1949, e por CORLETA et al.¹⁶, em 1998, que relataram presença de conexão vascular entre auto-enxerto e hospedeiro com 72 horas de pós-operatório. DISSEN et al.¹⁸, em 1994, relatou a presença de vasos neoformados com 48 horas de pós-operatório.

Acredita-se que este estudo experimental não possa ser o último nesta linha de pesquisa na procura de uma solução para o aproveitamento de segmentos normais de ovário quando das ooforectomias, principalmente em pacientes jovens. Sugere-se que novos trabalhos devam ser realizados com o mesmo objetivo.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados podemos concluir que os ovários implantados apresentam características morfológicas de ovários viáveis, com a presença de folículos ovarianos, corpos lúteos e neoformação vascular. Isto indica que a implantação permitiu a manutenção dos mesmos em retroperitônio.

8. REFERÊNCIAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.367-88.
2. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 925-40.
3. Mamede MV, Souza L, Rodrigues RP, Shimo AK, Almeida AM, Ravagnani MC, Silva RM, et al. Menarca-menopausa: quando ocorrem?. J Bras Ginec 1992;102(11): 441-4.
4. Mendonça M, Trindade CR, Guimarães DA, Oliveira FA. Hipoestrogenismo - diagnóstico e tratamento. J Bras Ginec 1995;105(9): 371-4.
5. Fonseca AM, Halbe HW. Síndrome do climatério. In: Halbe HW. 2^a ed. São Paulo: Rocca; 1993. p.1243-58.
6. Fonseca AM, Halbe HW. Fisiologia do climatério. In: Halbe HW. 2^a ed. São Paulo: Rocca; 1993. p.1236-42.
7. Paiva LH, Pinto-Neto AM, Bedone AJ, D'assumpção LV, Luiz FA, Lúcio MA, et al. Falência ovariana precoce- relato de 23 casos. J Bras Ginec 1992;102(7): 259-63.

8. Hurd W. Menopausa. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA, Novak – Tratado de Ginecologia. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.696-716.
9. Davis AJ. Cirurgia dos anexos. In: Gershenson DM, Decherney AH, Currey SL. Ginecologia operatória. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p.441-48.
10. Salum R. Doenças benignas dos ovários . In: Halbe HW. 2^a ed. São Paulo: Rocca; 1993. p.1103-1116.
11. Bagnoli VR, Hayashida SA. Estados intersexuais . In: Halbe HW. 2^a ed. São Paulo: Rocca; 1993. p.1340-66.
12. Görgens JB, Ferreira CR, Oliveira LC. Hormonioterapia de reposição em climatério. J Bras Ginec 1992;102(10): 381-5.
13. Harris M, Eakin RM. Survival of transplanted ovaries in rats. J Exp Zool 1949;112(1):131-164.
14. Quattropani SL. Ovulation of ovarian implants in unilaterally ovariectomized rats. The anatomical record 1984;209(3):331-6.
15. Green CJ, Simpkin S, Grimaldi G, Johnson A. Pregnancy after autografting and allografting vascularized ovaries and en bloc vascularized ovaries with adnexa in rabbits. Br. J. Obstet. and Gynaecol. 1982;89(8):645-51.

16. Corleta HE, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertility and Sterility* 1998; 70(1):16-9.
17. Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. *Cryobiology* 1994;31(4):336-43.
18. Dissen GA, Lara, HE, Fahrenbach, WH, Costa ME, Ojeda, SR. Imature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 1994;134(3):1146-54.
19. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill JD. 2^a ed. New York: Raven; 1994. p. 613-58.
20. Waynforth, HB, Flecknell, PA. Experimental and surgical technique in the rat. 2.ed. London: Academic Press, 1992.

NORMAS ADOTADAS

1. NORMATIZAÇÃO PARA OS TRABALHOS DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA. Resolução nº 001/99 do colegiado do curso de graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1999.
2. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Os princípios éticos da experimentação animal.
3. INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMENCLATURE COMMITTEE – Nomina histologica. 5. ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1987, 110p.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar a presença de sinais morfológicos indicativos de restabelecimento da função ovariana em hemi-ovários autotransplantados em retroperitônio de ratas Wistar.

Para isto foram utilizados 48 animais, previamente ooforectomizados bilateralmente. Foram divididos em 6 subgrupos, de acordo com o tempo pós-operatório no qual foram submetidos a retirada das peças a serem histologicamente analisadas, sendo em seguida submetidos a sacrifício.

As peças foram fixadas em formol a 10 % por 24 horas, a 4° C, sendo então incluídas em parafina. Na seqüência, foram obtidos de cada peça 5 cortes semi-seriados de 10 µm de espessura, no sentido transversal do ovário. Os cortes foram analisados por 2 observadores independentes, que não conheciam o subgrupo ao qual pertencia a peça analisada.

Os parâmetros morfométricos analisados foram a presença ou ausência de folículos ovarianos (em seus vários estágios), neoformação vascular, corpos lúteos e tecido de granulação. Após a análise de todas as lâminas, foram obtidos fotomicrografias representativas de cada grupo experimental.

Os resultados das análises demonstraram presença de folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos e neoformação vascular em todos os subgrupos analisados. Demonstraram também presença de tecido de granulação (infiltrado inflamatório), predominando nos subgrupos experimentais com menor tempo de pós-operatório.

Foi possível concluir então que os ovários implantados apresentavam características morfológicas de ovários viáveis, indicando que a implantação permitiu a manutenção dos mesmos no retroperitônio das ratas.

SUMMARY

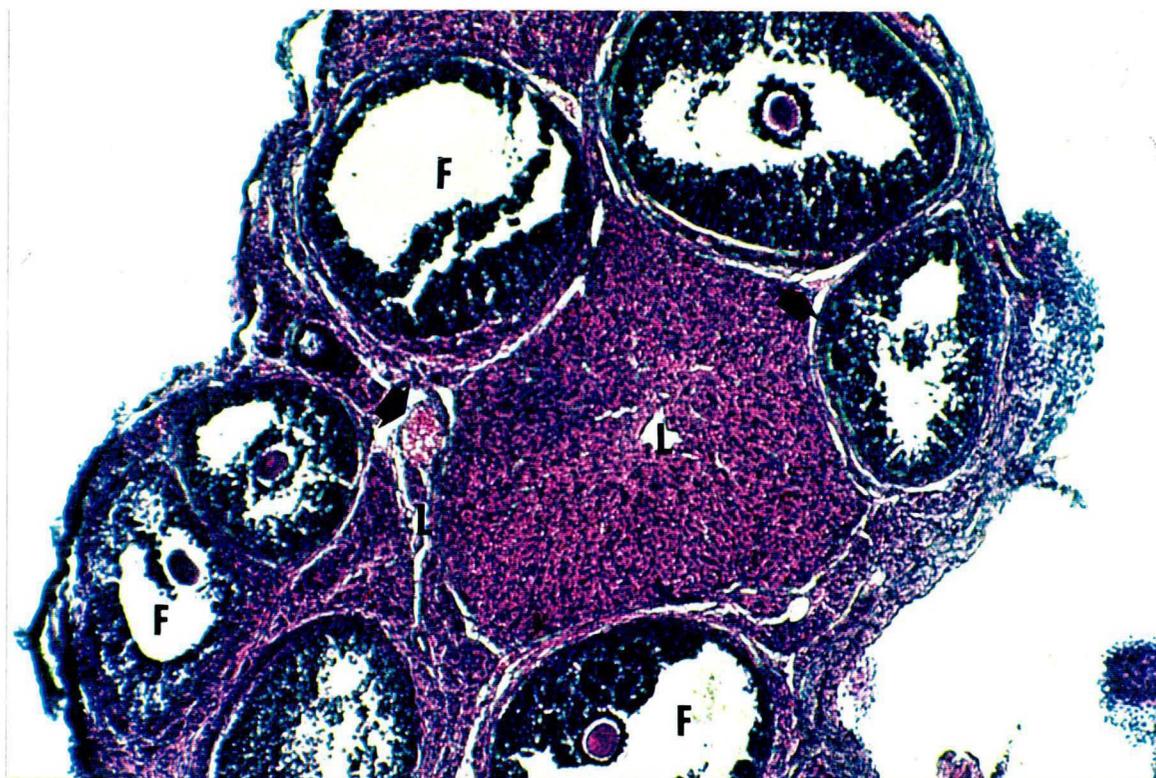
To demonstrate morphological signs of recovery of the ovarian function after retroperitoneal autologous transplantation of half-ovary in Wistar rats.

Forty-eight bilaterally oophorectomized female Wistar rats were distributed in 6 groups, according to the post-operative time in which the transplanted anatomical region (autologous ovary and psoas muscle) was removed in block. The removed tissue were fixed in formalin for 24 hours under 4°C. They were embedded in paraffin, sectioned and stained in hematoxylin and eosin. The fragments were, then, analysed by two independent examiners who were blinded for the groups under study. The morphometric parameters analysed were the presence of ovarian follicles, neovascularization, corpus luteum and granulation tissue. Afterwards, representative photomicrography of each group was obtained.

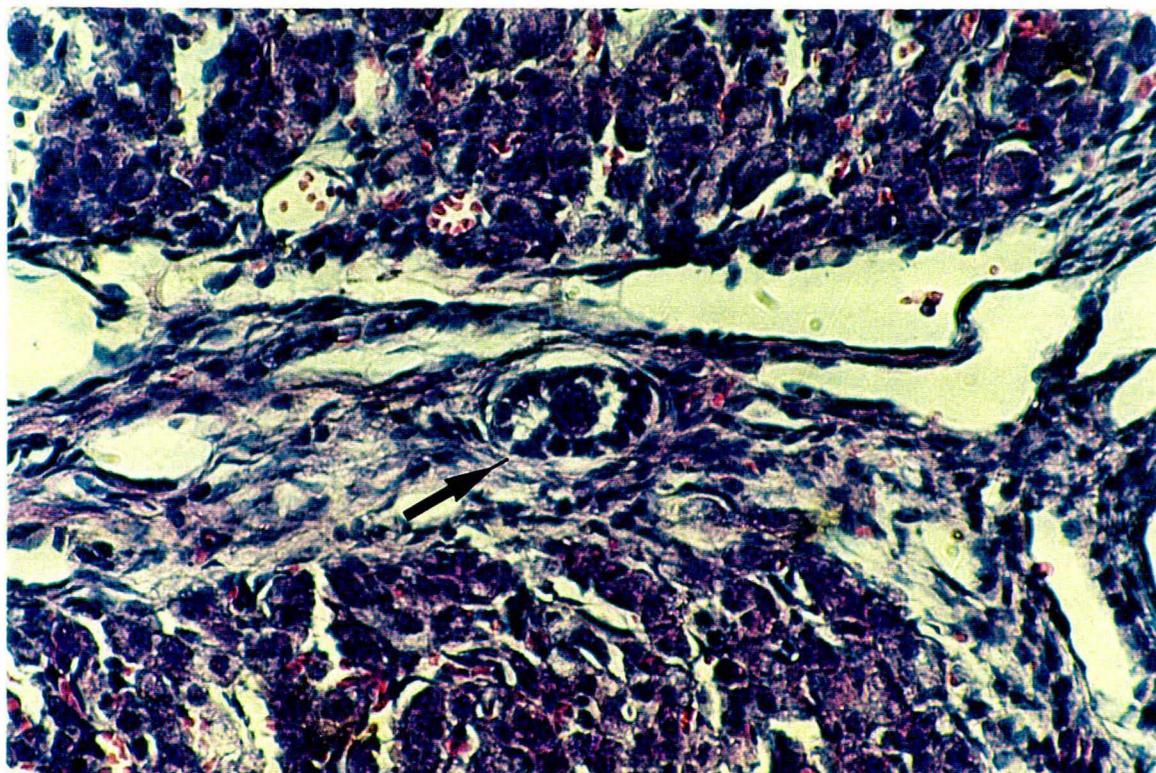
Ovarian follicles, corpus luteum and neovascularization were found in all groups. Also, it was visualized more granulation tissue in the groups in earlier stages of the post-operative period.

It was demonstrated morphological signs of recovery of ovarian function in the transplanted tissue. It suggests that the implantation of autologous ovary in the retroperitoneum of Wistar rats is viable.

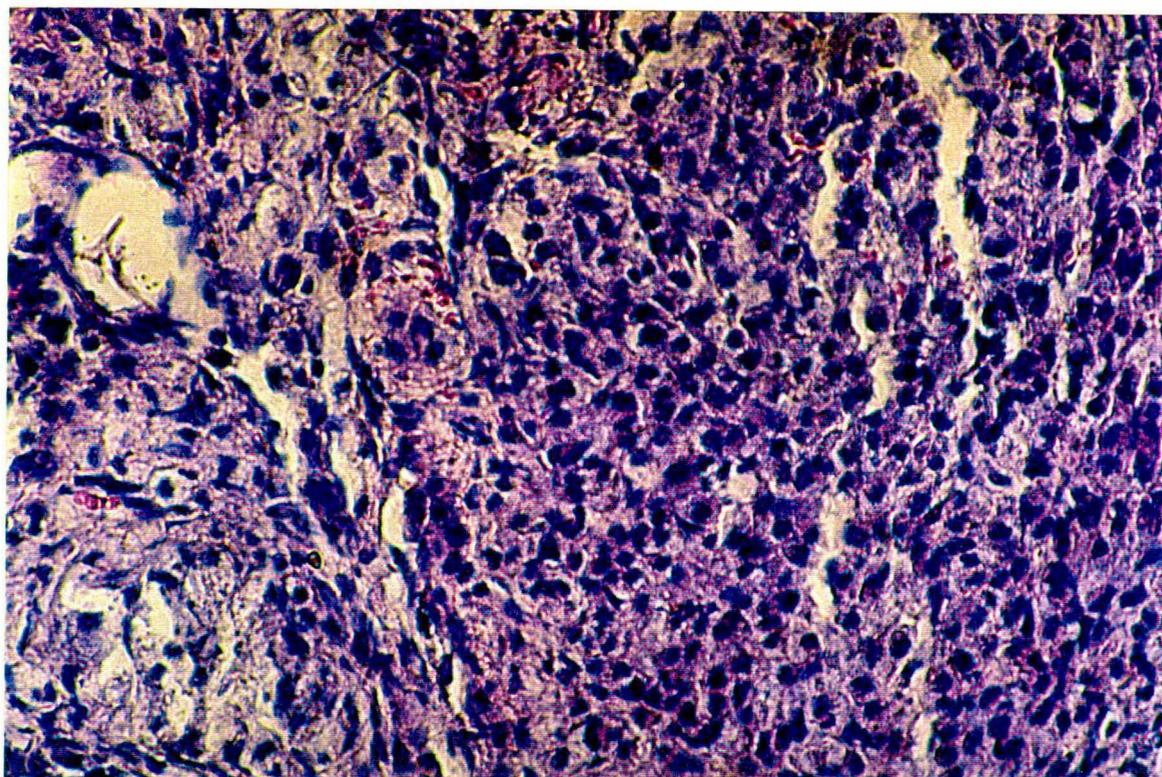
DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA COMPLEMENTAR



Fotomicrografia de ovário normal de rata. Visão panorâmica. Visualizam-se corpos lúteos (L) e folículos ovarianos em desenvolvimento e maduros (F) além de vasos sanguíneos (setas) (Objetiva 4x).



Fotomicrografia de tecido ovariano após 28 dias de evolução pós-operatória de transplante autólogo. É visualizado folículo “ativado” com ovócito em seu interior (seta) (Objetiva de 40x).



Fotomicrografia de tecido ovariano após 7 dias de evolução pós-operatória de transplante autólogo. São visualizadas células luteínicas (Objetiva de 40x).



Fotomicrografia de tecido ovariano após 28 dias de evolução pós-operatória de transplante autólogo. É possível visualizar a interface entre músculo psoas e o tecido ovariano implantado, com mínima presença de células inflamatórias (I). No parênquima ovariano são vistos vários folículos primários (setas), folículos ovarianos em desenvolvimento (F) e alguns vasos sanguíneos (V) (Objetiva 10x).

ANEXOS

RECURSOS MATERIAIS

Os recursos materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho foram fornecidos pela própria Universidade Federal de Santa Catarina, sendo listados a seguir:

1. Animais de Laboratório - Fornecidos pelo Biotério Central da U.F.S.C.
2. Instrumental Cirúrgico - Disponível no laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UFSC - HU
3. O estudo histológico foi realizado no laboratório de Histologia da U.F.S.C.

RECURSOS HUMANOS

As atividades de cirurgia experimental foram desenvolvidas pelo autor do Trabalho de Conclusão do Curso, aluno da 11^a Fase do curso de Medicina, **FABRÍCIO SILVA MANOEL**, com a colaboração do aluno da 11^a Fase do curso de Medicina, **ROGÉRIO RODRIGUES SCHMIDT**, sob a orientação do **Prof. Dr. ARMANDO JOSÉ D'ACÂMPORA**.

As atividades de preparação e análise histológica das peças cirúrgicas foram desenvolvidas pelos alunos da 4^a Fase do curso de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, **CIRO RIGGENBACH MÜLLER**, **HEITOR TOGNOLI**, **ANDRESSA OLIVEIRA** e **SILVIA DOBES RAYMUNDI**, sob a orientação do **Prof. Dr. RICARDO TRAMONTE**.

**TCC
UFSC
TO
0293**

**N.Cham. TCC UFSC TO 0293
Autor: Manoel, Fabrício S
Título: Análise histológica da viabilida**



972813479

Ac. 254423

Ex.1

Ex.1 UFSC BSCCSM