

AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE TRANSPLANTE OVARIANO AUTÓGENO NO RETROPERITÔNIO

MORPHOFUNCTION ASSESSMENT OF THE OVARIAN AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION IN THE RETROPERITONEUM

Leonardo de Souza Vasconcellos, Luiz Ronaldo Alberti, Andy Petroianu

RESUMO

Em muitos procedimentos pélvicos e abdominais, a ooforectomia bilateral se impõe, porém, suas complicações sistêmicas como insuficiências hormonais, podem ser de difícil controle. **Objetivo:** Visando a preservação da função gonadal em casos de ooforectomia, avaliaram-se aspectos funcionais e histológicos de tecido ovariano autoimplantado em posição heterotópica. **Método:** Foram selecionadas 36 ratas Wistar com ciclos estrais normais divididas aleatoriamente em quatro grupos (n=9): G1 – controle- submetido à laparotomia sem procedimento cirúrgico adicional; G2- ooforectomia bilateral; G3- os ovários retirados foram implantados integralmente no retroperitônio; G4- os ovários retirados foram fatiados e também implantados no retroperitônio. No 3º e 6º meses pós-operatórios realizaram-se esfregaços vaginais e estudos histológicos dos implantes ovarianos. **Resultados:** Os animais do grupo G1 tiveram ciclos normais. As ratas dos grupos G2 permaneceram durante todo o período em diestro. No sexto mês, duas ratas do grupo G3 tiveram ciclos completos compatíveis com a fase estral; três animais apresentaram ciclos irregulares e os restantes permaneceram em diestro. No sexto mês pós-operatório, três ratas do grupo G4 apresentaram ciclos incompletos, cinco ratas apresentaram ciclos estrais completos, e apenas uma permaneceu fixa em diestro. O estudo anatomopatológico confirmou viabilidade ovariana em ambos os grupos de autoimplante (G3 e G4) com melhores resultados no G4. **Conclusões:** O autoimplante ovariano no retroperitônio na forma fatiada apresentou melhor preservação morfofuncional do que o íntegro.

Descritores: Ovário, Transplante, Esfregaço Vaginal, Ovariectomia, Rato

INTRODUÇÃO

A irradiação pélvica e a quimioterapia, notadamente na doença de Hodgkin, além de outras neoplasias malignas como as leucemias na infância resultam em castração em mais de 80% das pacientes tratadas, mesmo quando se realiza ooforopexia.¹ Em muitos casos, realiza-se a ooforectomia por necessidade em procedimentos na pelve.²

O ovário é responsável por mais de 50% da produção de testosterona na pós-menopausa. Um declínio súbito de andrógenos em decorrência da ooforectomia, pode levar à diminuição da libido e provocar osteoporose, além de alterações nos níveis de lipoproteínas e aumento do risco de doenças cardiovasculares.³⁻⁵ Além disso, estudos mostram baixos índices de aderência à terapia hormonal por longos períodos.⁶

Uma alternativa mais fisiológica de manter a função hormonal em mulheres que precisam se submeter à retirada de ovários normais e ainda funcionantes é o transplante ovariano heterotópico.⁷⁻⁹ Diversos trabalhos vêm procurando descobrir o melhor local para realizar o autoimplante ovariano,^{3,8,10} bem como a forma mais adequada de tal procedimento para preservar a função ovariana.^{3,11}

O presente estudo propõe a realização de autoimplante ovariano no retroperitônio por considerar essa região mais adequada sob o

Instituição:

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Correspondência:

Prof. Andy Petroianu

Av. Afonso Pena, 1626 – apto. 1901 – CEP: 30130-005 – Belo Horizonte / MG – Brasil

Tel./Fax: (31) 3274 7744

E-mail: petroian@gmail.com

Recebido em: 20.08.2008

Aceito em: 22.09.2009

aspecto de drenagem venosa para a veia cava inferior, que recebe fisiologicamente o sangue e os hormônios dos ovários através das veias ovarianas. A capacidade de secreção hormonal dos ovários foi avaliada pela manutenção do ciclo estral, com base em esfregaços vaginais. A viabilidade e as alterações morfológicas foram estudadas por método histológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental foi realizado de acordo com recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais, e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA da Universidade Federal de Minas Gerais.^{12,13}

A pesquisa foi conduzida em 36 ratas Wistar adultas pesando entre 250 e 280 gramas, com aproximadamente 120 dias de idade. Para verificar se os animais apresentavam ciclos estrais regulares, esfregaços vaginais foram colhidos diariamente durante um período de sete dias. As ratas com ciclos estrais atípicos foram excluídas.

Os procedimentos foram realizados sob anestesia geral com cloridrato de quetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg), ambos por via intraperitoneal. As ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos (n=9):

Grupo 1 (G1) - controle - laparotomia e identificação dos ovários;

Grupo 2 (G2) - ooforectomia bilateral;

Grupo 3 (G3) - ooforectomia bilateral e transplante dos ovários íntegros para o retroperitônio, logo abaixo dos rins, utilizando fio de prolene 5-0;

Grupo 4 (G4) - ooforectomia bilateral e transplante dos ovários seccionados em três fatias transversais, de aproximadamente 3 milímetros de espessura, para o retroperitônio, logo abaixo dos rins, utilizando fio de prolene 5-0.

O útero e as trompas permaneceram *in situ* em todos os grupos. Após as cirurgias, os animais receberam água e ração para ratos *ad libitum*. Eles foram observados diariamente, com vista a sinais de anormalidades locais ou sistêmicas, durante 180 dias.

Uma semana antes e durante todo o período posterior ao ato cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente com controle de luminosidade de 12 horas/dia.

No terceiro e no sexto meses pós-operatórios, avaliou-se a função ovariana por meio de esfregaços vaginais diários, com base no ciclo estral, durante um período de 10 dias. Os animais foram imobilizados e, usando uma pipeta, introduziu-se na cavidade vaginal da rata 0,25 ml de solução salina a 0,5%. Após lavar a cavidade vaginal duas vezes com solução salina a 0,9%, o fluido foi retirado com o auxílio de outra pipeta limpa. Caso houvesse contaminação, o lavado era repetido. Cada ponteira foi usada uma única vez para cada exame.

Os esfregaços foram avaliados a fresco, sem coloração e conduzidos sob aumento de 40X e 100X, para observação das características celulares de acordo com o ciclo ovariano, com base em estudos iniciais publicados por Cooper et al em cobaias e por Long & Evans em ratas.^{14,15} Esses autores observaram que a relação entre o estrogênio ovariano e a citologia vaginal em ratas é representada por um ciclo ovariano com duração média de quatro dias, dividido em três fases distintas.¹⁴⁻¹⁶

Diestro - caracteriza-se por baixas concentrações de estrogênio e esfregaços vaginais com predomínio de leucócitos e algumas

células epiteliais corneificadas em perimeio; essa fase é considerada pré-ovulatória;

Proestro - há aumento da concentração de estradiol, e no esfregaço vaginal, predominam células polimorfonucleadas dispersadas ou acumuladas; essa é a fase em que ocorre a ovulação;

Estro - há queda dos níveis de estradiol e predomínio de células epiteliais escamosas corneificadas, essa é a fase pós-ovulatória.

Após a determinação dos ciclos estrais no sexto mês pós-operatório, os animais foram mortos com dose excessiva de éter sulfúrico. Os ovários implantados foram removidos e preparados para exame histológico de rotina, utilizando-se a coloração pela hematoxilina e eosina. Os parâmetros histológicos avaliados para comparação entre as duas formas de implante ovariano, íntegra e fatiada, foram: degeneração, fibrose, reação inflamatória, angiogênese, cistos foliculares, desenvolvimento folicular e corpos lúteos.

Os resultados foram comparados por meio do teste t de Student e qui ao quadrado. As diferenças foram consideradas significativas para valores correspondentes a $P < 0,05$.

RESULTADOS

Todos os animais sobreviveram até o sexto mês pós-operatório, sem complicações cirúrgicas. A Tabela I apresenta os achados citológicos vaginais de todos os grupos em ambos os períodos avaliados, 3º e 6º meses pós-operatórios.

No G1 (controle) as ratas tiveram a seqüência do ciclo regular (diestro, proestro, estro) tanto no terceiro quanto no sexto mês pós-operatório.

No G2 (ooforectomia bilateral), todos os animais permaneceram em diestro durante os 14 dias do estudo em ambos os períodos de análise. As ratas deste grupo foram consideradas como não produtoras de hormônio ovariano.

Tabela 1. Avaliação dos esfregaços vaginais de ratas no terceiro e sexto meses pós-operatórios

RATAS	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3 *		GRUPO 4 *	
	3º mês	6º mês	3º mês	6º mês	3º mês	6º mês	3º mês	6º mês
1	C	C	A	A	A	A	C	C
2	C	C	A	A	I	I	C	C
3	C	C	A	A	C	C	A	I
4	C	C	A	A	A	A	C	C
5	C	C	A	A	I	I	A	I
6	C	C	A	A	I	I	C	C
7	C	C	A	A	A	A	A	I
8	C	C	A	A	C	C	A	A
9	C	C	A	A	A	A	C	C

Legenda:

Grupo 1 - controle

Grupo 2 - ooforectomizadas

Grupo 3 - transplante de ovário íntegro para o retroperitônio

Grupo 4 - transplante de ovário na forma fatiada para o retroperitônio

C - Ciclo completo

A - Ciclo ausente

I - Ciclo incompleto

* Diferentes entre si para $p < 0,05$ (teste qui quadrado)

No G3 (transplante íntegro), duas ratas tiveram ciclos completos compatíveis com a fase estral no sexto mês avaliado. Três animais apresentaram ciclos irregulares e as restantes permaneceram em diestro. A função ovariana foi considerada inadequada nos animais desse grupo, exceto nas duas ratas que apresentaram ciclos estrais completos e regulares.

No G4 (transplante fatiado), três ratas apresentaram ciclos incompletos, mostrando fases compatíveis com estro e diestro no sexto mês pós-operatório, sendo consideradas produtoras deficientes de hormônios sexuais. Cinco ratas apresentaram ciclos estrais completos, sendo consideradas portadoras de ovários autoimplantados funcionantes e apenas uma permaneceu fixa em diestro.

Na segunda laparotomia, a cavidade abdominal mostrava-se com aspecto normal. Os ovários implantados estavam preservados, sem sinais de reação inflamatória local ou reações aparentes ao fio cirúrgico.

Os estudos anatomopatológicos realizados no sexto mês pós-operatório revelaram viabilidade ovariana nos três grupos com ovário. Os ovários do Grupo-controle foram todos normais (Figura 1A). Já no Grupo 3 (Figura 1B) identificou-se infiltrado inflamatório moderado composto de células mononucleares e fibrose discreta, além de neoformação vascular. Observou-se áreas de isquemia e necrose de leve intensidade nos ovários pertencentes às ratas fixadas em diestro. Nos outros animais não houve sinais de isquemia ou necrose. Corpos lúteos e cistos foliculares semelhantes aos dos ovários normais foram encontrados em proporções variáveis.

No Grupo 4, também foi observada viabilidade ovariana com fibrose e inflamação de grau leve a moderado (Figura 1C). Áreas de isquemia ocorreram apenas na parte periférica do ovário da rata que não saiu da fase de diestro. Cistos foliculares e corpos lúteos também foram identificados. Os cistos foliculares foram maiores do que os encontrados nos grupos 1 e 3.

As ratas submetidas a implantes heterotópicos de ovário na forma fatiada (grupo G4) apresentaram melhor padrão de ciclo estral e aspecto histológico mais próximo ao normal do que os ovários íntegros (grupo G3) ($p < 0,05$).

Tabela 2. Avaliação histológica dos ovários de ratas do grupo controle e dos grupos submetidos a ooforectomia e reimplante ovariano.

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	GRUPO 1	GRUPO 3	GRUPO 4
Degeneração/necrose	0	+	+
Reação inflamatória	+	++	+
Angiogênese	+++	+	++
Cistos foliculares	0	++	+
Desenvolvimento folicular	+++	++	+++
Corpos lúteos	++	+	+
Fibrose	0	++	+
Viabilidade	+++	+++	+++

0: ausente

+: pouca

++: moderada

+++ : muita

Grupo 1 - controle

Grupo 3 - transplante de ovário íntegro para o retroperitônio

Grupo 4 - transplante de ovário na forma fatiada para o retroperitônio

Figura 1A. Histoarquitetura de ovário normal (não transplantado). Observa-se histoarquitetura, folículos ovarianos em diferentes estados de desenvolvimento e ausência de necrose ou degenerações. Hematoxilina e eosina. (40X)

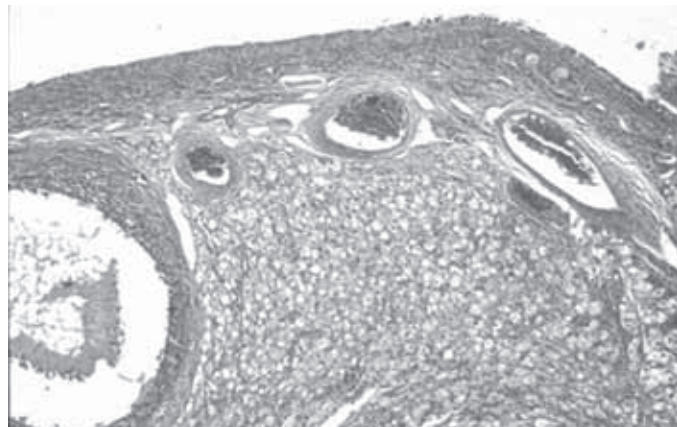


Figura 1B. Histoarquitetura dos autoimplantes ovarianos íntegros no retroperitônio de ratas Wistar (Grupo 3). Observa-se presença de grandes cistos e ausência de necrose ou degenerações. Hematoxilina e eosina. Corpo lúteo (seta) e grande cisto (*) (40X)

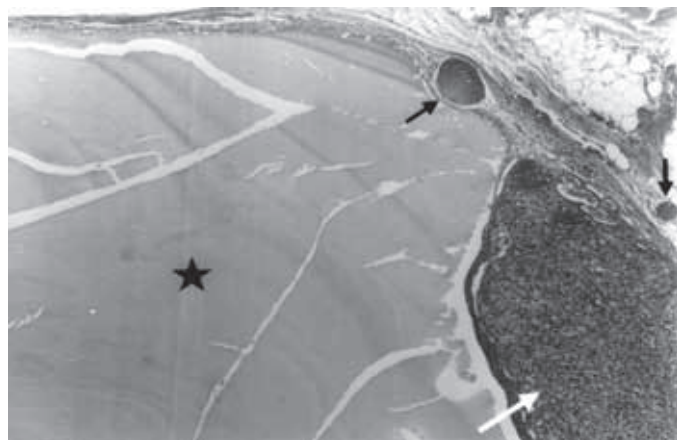
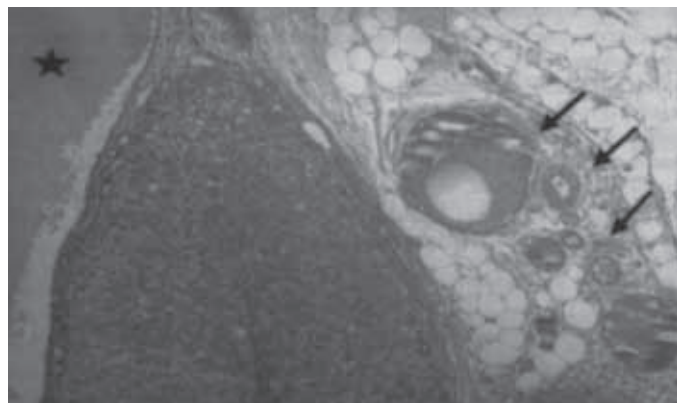


Figura 1C. Histoarquitetura dos autoimplantes ovarianos fatiados no retroperitônio de ratas Wistar (Grupo 4). Observa-se presença de angiogênese (seta) e cisto (*) (40X)



DISCUSSÃO

Insuficiência endócrina ovariana é a principal consequência da ooforectomia bilateral, procedimento indicado em diversas afecções do ovário como neoplasia e sepse, além de quimioterapia, radiação pélvica e câncer mamário hormônio-dependente. As complicações sistêmicas decorrentes dessa operação podem ser de difícil controle. A esterilidade e os distúrbios psíquicos advindos da castração são outras adversidades marcantes da ooforectomia. Para corrigir essa situação, entre as alternativas terapêuticas está o transplante ovariano.^{1,2} O transplante ovariano visa à preservação de sua função e a diminuição dos efeitos indesejáveis do climatério precoce. Apesar dos múltiplos estudos, ainda não foi definido o melhor local para a implantação dos ovários.^{1,2,4,7,14,15} Se o ovário puder ser criopreservado antes de as pacientes receberem tratamento para câncer e, após a remissão da doença, serem reimplantados, o estado fisiológico pode ser restabelecido e até mesmo concepção pode ser obtida com células germinativas da própria mulher. Essa opção parece igualmente factível em crianças nas quais não se tem a opção de estocar embriões ou oócitos.^{16,17,18,19,20,21}

Utilizou-se quetamina pelas suas características de induzir estado de sedação, imobilidade e analgesia acentuada com efeito de anestesia dissociativa com larga margem de segurança e fácil controle do plano anestésico.¹³

A avaliação do local de implantação dos ovários baseou-se na viabilidade da histoarquitetura e função ovariana. Verificou-se indiretamente a produção hormonal com base na citologia obtida pelos esfregaços vaginais.^{14,15,22,23} Os autoimplantes ovarianos foram considerados funcionais quando as ratas apresentaram ciclo estral normal, ou seja, apresentando sequência típica de todas as fases: diestro, estro, proestro. Nas ratas com ciclo permanente na fase em diestro ou que apresentaram ciclo estral incompleto durante os dez dias avaliados, considerou-se a produção hormonal dos ovários autoimplantados deficiente.

A implantação ovariana no retroperitônio teve como base o padrão da drenagem venosa. Em situação normal, os hormônios ovarianos são drenados pelas veias ovarianas para a veia cava inferior. Essa mesma veia recebe drenagem venosa da região retroperitoneal em que os ovários foram implantados. Dessa forma, evitou-se a passagem dos hormônios pelo fígado, onde poderiam ser metabolizados precocemente e interferir em sua ação sistêmica.

A literatura descreve técnica de implante autógeno de órgãos endócrinos, dentre eles o ovário, que era cortado em fragmentos com menos de 2mm de espessura, com o intuito de evitar a hipoxia central do tecido autoimplantado. Esses fragmentos foram então ancorados à cápsula renal.⁴ Estudos subsequentes mostraram a estrutura histológica ovariana com concentração maior de folículos primordiais em sua periferia, sugerindo serem esses elementos os primeiros a se beneficiar da revascularização.⁴ Além disso, os folículos ovarianos mostram-se mais resistentes ao ambiente hipóxico, presumivelmente por se desenvolverem dentro de um

epitélio avascular e um ambiente de hipoxia relativa.⁴ Dentre eles, a população de folículos primordiais apresenta-se mais resistente aos fenômenos isquêmicos se comparados aos outros folículos, possivelmente devido às taxas metabólicas menores.⁴ Além da resistência aos fenômenos isquêmicos, o próprio processo ovariano de desenvolvimento folicular, atresia e ovulação asseguram que o ovário é rico em fatores angiogênicos, notadamente o fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento e transformação fibroblástica, que estimulariam a revascularização.

No presente trabalho, não houve adversidades decorrentes da vascularização dos enxertos, pois em nenhum dos grupos houve ovários com degeneração histológica. Esses achados contradizem outros autores que consideram os enxertos ovarianos avasculares inadequados sob o aspecto funcional.¹⁸⁻²⁰

Ao relacionarmos os achados histológicos dos ovários autoimplantados com a citologia vaginal, todos os animais evidenciaram aspecto vaginal compatível com função hormonal ovariana em diferentes fases. Os aspectos citológicos das ratas dos grupos em que se realizou implante de tecido ovariano fatiado (G4) apresentaram resultados melhores do que os obtidos quando se implantou o ovário íntegro.

Tomou-se cuidado em manter controlada a luminosidade ambiente, porque ciclos ovarianos consistentes podem ser detectados em roedores apenas quando abrigados sob condições regulares de luminosidade. Fotoperíodos padronizados têm sido definidos como sendo de 12 ou 14 horas de exposição à luz comum. Alterações desses períodos podem levar a várias alterações dos ciclos, incluindo até mesmo inibição da ovulação e manutenção de esfregaços vaginais persistentes em estro.^{14,23,24,25,26}

Observou-se ainda, que a eficácia funcional sobre a mucosa vaginal dos ovários fatiados foi maior do que dos íntegros. Esse fato pode ter sido em parte devido à maior superfície de contato dos enxertos ovarianos fatiados, provavelmente proporcionando melhor suprimento sanguíneo ao tecido ovariano.

CONCLUSÃO

Com base nos aspectos cirúrgico, citológico vaginal, e de histoarquitetura ovariana, o autoimplante ovariano heterotópico no retroperitônio é tecnicamente simples e mantém ovários viáveis. Entretanto, quanto ao aspecto funcional, apenas os ovários fatiados tiveram atividade hormonal adequada.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao médico Juliano Ferreira Barbosa pelo auxílio no trabalho em laboratório. Agradecemos também ao CNPq e FAPEMIG pelos auxílios financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

Abstract

Oophorectomy is required in many pelvic and abdominal procedures. Endocrine disturbances may be followed by severe systemic complications. **Purpose:** Aiming to keep the ovarian function after oophorectomy, the present study assessed the ovarian autotransplantation in the retroperitoneum. **Material and Methods:** Thirty-six cycling female Wistar rats were randomly divided in four groups: G1 (control) -

sham operation; G2 - bilateral oophorectomy; G3 - bilateral oophorectomy and whole ovarium autotransplantation in the retroperitoneum; G4 - bilateral oophorectomy followed by sliced ovarium autotransplantation in the retroperitoneum. The estrous cycle was investigated in the third and sixth months. Histological studies of ovaries were carried out. **Results:** Animals from group G1 preserved the cycling sequence. Rats from group G2 remained in diestrus. In group G3, the vaginal smear of two rats showed an estrus pattern, three showed irregular cycles, and the remaining animals remained in diestrus. In group G4, rats showed irregular cycles, five presented normal cycle sequence and only one rat remained in diestrus. The histology indicated ovarian viability in Groups 3 and 4, and a better aspect in Group 4. **Conclusions:** Sliced ovarian autotransplantation in the retroperitoneum showed better morphofunction preservation.

Keywords: Ovary, Transplantation, Vaginal Smears, Ovariectomy, Rat.

REFERÊNCIAS

1. Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med.* 2009 Feb 26;360(9):902-11.
2. Corleta HVE; Corleta O; Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril.* 1998;70:16-9.
3. Gosden RG, Byatt-Smith JG. Oxygen concentration gradient across the ovarian follicle epithelium: model, predictions and implications. *Hum Reprod* 1986, 1: 65-68.
4. Stiff PJ; Bayer R; Kerger C; Potkul RK; Malhotra D; Peace DJ; Smith D, Fisher SG. High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent/relapsed ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1997;15:1309-17.
5. Davis SR, Buerger HG. Androgens and postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2759-63.
6. Eraker SA; Kirscht JP, Becker MH. Understanding and improving patient compliance. *Ann Intern Med.* 1984;100:258-68.
7. Chang HJ, Suh CS. Fertility preservation for women with malignancies: current developments of cryopreservation. *J Gynecol Oncol.* 2008;19:99-107.
8. Candy CJ; Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod.* 1995;10:2334-8.
9. Quattropani SL. Ovulation of ovarian implants in unilaterally ovariectomized rats. *Anat Record.* 1984;209:331-6.
10. Guanasena KT; Villines PM; Crister ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod.* 1997;12:101-6.
11. Dziuk PJ; Parvizi N & Ellendorff F. Concentrations of steroids in jugular and hepatic portal veins of pigs after ingestion of testosterone, estrogen, or progesterone or transplantation of ovaries to the intestine. *Domest Anim Endocrinol.* 1999;17:29-38.
12. Cooper JE. Ethics and laboratory animals. *Vet Rec.* 1985;116:594-5.
13. Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, ed. *Ética, Moral e Deontologia médicas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.185-190, 2000.
14. Cooper RI; Goldman JM, Vandenberg JG. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Fem Reprod Toxicol.* 1993;3:45-56.
15. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in rat and its associated phenomena. *Am J Physiol.* 1959;32:936-42.
16. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol.* 2005 Apr;6(4):209-18.
17. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist.* 2007 Dec;12(12):1437-42.
18. Lornage J, Salle B. Ovarian and oocyte cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007 Aug;19(4):390-4.
19. Lee S, Mao L, Wang Y, D'Silva M, Yoo CH, Wolf P, Chung WS, Takahashi E, Chung DY, Gittes RF. Transplantation of reproductive organs. *Microsurgery.* 1995;16(4):191-8.
20. Gosiengfiao Y. Progress, history and promise of ovarian cryopreservation and transplantation for pediatric cancer patients. *Cancer Treat Res.* 2007;138:130-4.
21. Lee D. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: banking reproductive potential for the future. *Cancer Treat Res.* 2007;138:110-29.
22. Gay VL, Tomacari RL. Follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science.* 1974;184:75-6.
23. Weissman A; Gotlieb L, Colgan T. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod* 1999;60:1462-7.
24. Baird DT; Webb R; Campbell BK; Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. *Endocrinology.* 1999;140:462-71.
25. Callejo J; Jauregui MT, Valls C. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats. *Fertil Steril.* 1999;72:513-27.
26. Harrison FA; Chambers SG, Green EA. Autotransplantation of the ovary to the neck in the sow. *J Endocrinol.* 1980;83:46-7.