

TRANSPLANTE AUTÓGENO OVARIANO EM OMENTO MAIOR – ESTUDO EXPERIMENTAL

OVARIAN AUTOGENOUS TRANSPLANTATION ON THE GREATER OMENTUM – AN EXPERIMENTAL MODEL

Luiz Ronaldo Alberti, Leonardo de Souza Vasconcellos, Andy Petroianu

RESUMO

Objetivos: Avaliar aspectos morfofuncionais de ovários implantados no omento maior, bem como a melhor técnica para implantação do ovário: se íntegro ou fatiado. **Métodos:** foram divididas aleatoriamente 40 ratas Wistar com ciclos estrais normais em quatro grupos: Grupo I (n=5), controle – laparotomia; Grupo II (n=5), ooforectomia total bilateral; Grupo III (n=15), implante autógeno íntegro; Grupo IV (n=15) implante autógeno fatiado, ambos no omento maior. Realizaram-se esfregaços vaginais nos 3º e 6º meses pós-operatórios e estudos histológicos dos implantes ovarianos, avaliando-se: degeneração, fibrose, reação inflamatória, angiogênese, cistos foliculares, desenvolvimento folicular e corpos lúteos. **Resultados:** Os animais do Grupo I tiveram ciclo normal. As ratas do Grupo II não apresentaram ciclo, permanecendo em diestro. No Grupo III, 11 ratas permaneceram em diestro, três apresentaram ciclos incompletos e apenas uma teve ciclo normal. No Grupo IV, três animais não tiveram ciclo, oito tiveram esfregaços vaginais incompletos, e quatro tiveram ciclo normal. Achados histológicos dos animais pertencentes ao Grupo III evidenciaram histoarquitetura normal em dez ratas, porém, nas outras cinco houve degeneração ovariana. No Grupo IV, 14 ratas tiveram ovários com histoarquitetura preservada e em apenas uma houve sinais de degeneração. **Conclusões:** O implante autógeno ovariano em omento maior foi viável, obtendo-se melhor preservação morfofuncional com implantação de fatias.

Descritores: Ovário; Ciclo Ovariano; Ovariectomia; Desenvolvimento Experimental

INTRODUÇÃO

Muitas pacientes com câncer sofrem perda iatrogênica da função ovariana mesmo sem o ovário estar envolvido na doença, em decorrência de tratamento radioterápico e quimioterápico.¹ 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, entre outros.^{2,3}

Em muitos outros casos, a ooforectomia é realizada por princípio ou necessidade,⁴ em um procedimento na pelve, mesmo sem haver inconveniência de manter o ovário. Com o objetivo de manter os níveis hormonais, fisiologicamente, tem sido proposto o implante autógeno ovariano heterotópico.⁵⁻⁷

Diversas técnicas de implante autógeno ovariano vêm sendo pesquisadas continuamente em animais.⁸⁻¹³ O estudo da preservação da função ovariana em várias espécies animais resulta em informações conflitantes na literatura quanto à eficácia da manutenção dos níveis hormonais.^{14,15} Estudos iniciais publicados por Stockard & Papanicolaou (ver Cooper *et al*),¹⁶ em cobaias, e por Long & Evans¹⁷ em ratas mostraram que o ciclo ovariano pode ser monitorado por meio de mudanças na citologia vaginal.

Objetivando analisar a preservação da função ovariana em casos de ooforectomia, o presente trabalho estudou o implante autógeno ovariano em omento maior e pesquisou a melhor forma de implantação

Instituição:

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte / MG

Correspondência:

Prof. Andy Petroianu

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

Tel./Fax: (31) 3274 7744

E-mail: petroian@medicina.ufmg.br

Recebido em: 01.09.2008

Aceito em: 30.09.2008

do ovário: íntegro, ou fatiado. Avaliou-se ainda a capacidade de secreção hormonal dos ovários autoimplantados por meio da manutenção do ciclo estral, com base em esfregaços vaginais.

MÉTODO

Este estudo experimental foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais^{18,19} e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA da Universidade Federal de Minas Gerais.

O presente trabalho foi conduzido em 40 ratas Wistar pesando entre 200 e 250 gramas, com aproximadamente 60 dias de idade. Para verificar se os animais apresentavam ciclos ovulatórios regulares, esfregaços vaginais foram colhidos diariamente durante um período de sete dias. As ratas com ciclos atípicos foram previamente 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: grupo I (n=5) - controle, submetido apenas a laparotomia e identificação dos ovários; grupo II (n=5) – submetido a ooforectomia total bilateral; grupo III (n=15) - submetido a ooforectomia total bilateral e reimplante ovariano na forma íntegra no omento maior, sendo fixado com um ponto, utilizando-se fio de prolene 5-0 e grupo IV (n=15) - submetido a ooforectomia total bilateral. Nesse grupo, os ovários retirados foram cortados em três fatias transversais de aproximadamente três milímetros de espessura e fixados ao omento maior com fio de prolene 5-0.

O útero permaneceu *in situ* em todos os grupos. Após as cirurgias, os animais receberam água e ração à vontade. Eles foram observados diariamente, não tendo apresentado anormalidade local ou sistêmica.

Com base nos estudos de Peromyscus, que mostraram interferências no ciclo ovariano por pequenos feixes de luz, precauções foram tomadas na tentativa de minimizá-los, durante os períodos noturnos.¹⁷ Nos terceiro e sexto meses após os procedimentos, avaliou-se a função ovariana com base no ciclo estral, por meio de esfregaços vaginais diários durante um período de 14 dias, com base em estudos de Stockard & Papanicolaou (ver Cooper *et al*)¹⁶ e Long & Evans.¹⁷

Para a realização do esfregaço vaginal, os animais foram imobilizados e 0,25 ml de solução salina a 0,5% foi introduzido na cavidade vaginal da rata, usando-se uma ponteira de pipeta.^{7,16} Após lavar a cavidade vaginal duas vezes, o fluido foi retirado. Cuidados foram tomados ao inserir a ponteira na cavidade vaginal, evitando contato com o colo uterino. Cada ponteira foi usada uma única vez para cada exame.^{20,21}

Os esfregaços foram fixados com álcool-éter 1:1 sobre lâmina de vidro e corados pelo método de Shorr.²² O exame foi conduzido sob aumento de 40 e 100X para observação das características celulares, de acordo com o ciclo ovariano descrito anteriormente.

Após a determinação dos ciclos estrais do sexto mês pós-operatório, os animais foram mortos com superdose de éter. Os ovários autoimplantados foram removidos e preparados para exame histológico: foram fixados em formol a 10%, processados e incluídos em blocos de parafina; após serem cortados em fatias de 5mm, com o auxílio de um micrótomo, foram afixados sobre lâminas e corados com hematoxilina e eosina.

Para comparação entre as formas íntegras e fatiadas dos ovários autoimplantados, avaliou-se o padrão do ciclo vaginal, os aspectos macroscópicos e os histológicos dos implantes ovarianos, de acordo com os seguintes parâmetros: degeneração, fibrose, reação inflamatória, angiogênese, cistos foliculares, presença desenvolvimento folicular e corpos lúteos.^{7,23}

Os resultados foram comparados por meio do teste t de Student e qui ao quadrado com correção de Yate para pequenas amostras. 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 1 apresenta os achados citológicos vaginais de todos os grupos em ambos os períodos avaliados, 3º e 6º mês pós-operatórios.

Tabela 1. Avaliação do ciclo ovariano em esfregaços vaginais de ratas no terceiro e sexto meses pós-operatórios e no grupo controle.

Ratas	Grupo I		Grupo II		Grupo III		Grupo IV	
	n=5	n=5	n=15	n=15				
Tipo ciclo	30. mês	60. mês	30. mês	60. mês	30. mês	60. mês	30. mês	60. mês
Completo	5	5	-	-	1	1	3	4
Incompleto	-	-	-	-	1	3	5	7
Ausente	-	-	5	5	13	11	7	4

Notas:

Grupo I- controle

Grupo II- ooforectomizadas

Grupo III- implante autólogo de ovário íntegro para o omento maior

Grupo IV- implante autólogo de ovário na forma fatiada para o omento maior

Com relação aos resultados obtidos no esfregaço vaginal, as ratas do Grupo I (controle) exibiram ciclos vaginais com sequência regular das fases (diestro, proestro, estro e metaestro) tanto no terceiro quanto no sexto meses pós-operatórios, com produção normal de hormônios ovarianos.

No Grupo II (ooforectomia bilateral), todos os animais permaneceram em diestro durante 14 dias consecutivos no terceiro e sexto meses pós-operatórios. As ratas desse grupo foram consideradas não-produtoras de hormônio ovariano.

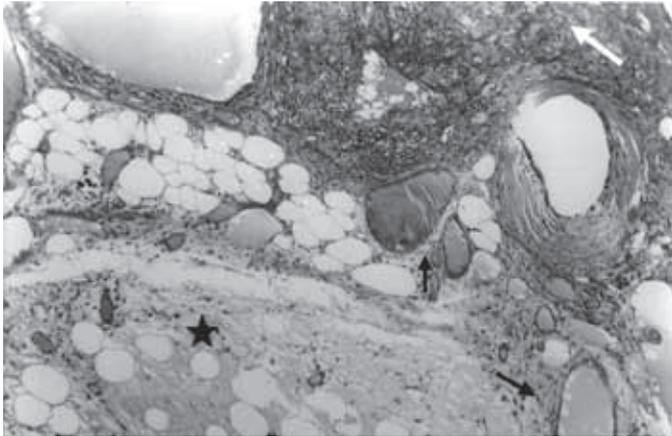
No Grupo III (implante autólogo de ovário íntegro), os exames citológicos dos esfregaços vaginais de onze ratas mostraram os mesmos resultados observados no Grupo II. A produção hormonal ovariana dessas ratas também foi considerada inexistente. Entretanto, outras três ratas apresentaram ciclos estrais incompletos, sugerindo produção ovariana deficiente. Apenas uma rata voltou a ter ciclos normais após o 6º mês pós-operatório.

No Grupo IV (implante autólogo de ovário fatiado), apenas três ratas não tiveram ciclo; oito animais tiveram padrão citológico compatível com estro, embora a sequência das fases tenha sido atípica; quatro ratas tiveram ciclos estrais normais. Esse grupo caracterizou-se pela produção hormonal deficiente em metade

dos animais; porém, cerca de 27% das ratas mostraram padrão citológico vaginal compatível com função ovariana normal.

Ao exame macroscópico dos ovários implantados, observou-se que no Grupo III houve preservação da parte externa do ovário e ausência de fibrose em 10 ratas (Figura 1). Nas outras cinco, havia sinais de fibrose no local da implantação ovariana no omento maior.

Figura 1. Achados histológicos de implante autógeno de ovário íntegro. Observar a ausência de sinais de isquemia ou outras lesões degenerativas. Presença de folículos em vários graus de maturação, corpos lúteos (*) e angiogênese (setas). Hematoxilina e eosina (40X).



No Grupo IV, 14 implantes apresentavam arquitetura aparentemente normal e sem fibrose ou reações aos fios cirúrgicos, bem como omento maior de aspecto habitual. Apenas em uma rata houve sinais macroscópicos de fibrose nos ovários implantados. O restante da cavidade abdominal em todos os grupos apresentou-se normal.

O estudo histológico realizado no sexto mês pós-operatório mostrou que no Grupo III dez animais mantiveram arquitetura histológica dos implantes ovarianos na forma íntegra semelhante ao Grupo-controle, com ausência de infiltrados inflamatórios, degenerações e necroses. Também foram observadas angiogênese e diferenciação dos folículos em vários estádios de maturação. Entretanto, as outras cinco ratas apresentaram sinais de degeneração e fibrose em seus ovários. No Grupo IV, 14 ratas mantiveram os ovários autoimplantados fatiados com histoarquitetura preservada, além de numerosos folículos em diferentes fases de maturação e angiogênese mais exuberante em relação ao Grupo III. A degeneração ovariana ocorreu em apenas um animal do Grupo IV.

Com base nos achados dos ciclos estrais, da macroscopia e da histologia dos implantes ovarianos, as ratas que tiveram os ovários autoimplantados na forma fatiada apresentaram melhor preservação morfofuncional em relação àquelas que tiveram implante realizado na forma íntegra ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O objetivo principal do implante autógeno ovariano é preservar a função ovariana e minimizar os efeitos indesejáveis do climatério precoce em mulheres ooforectomizadas.¹⁻³ No presente trabalho, a avaliação da função ovariana teve como base o estudo da citologia do epitélio vaginal,¹⁶ cuja interpretação seguiu a orientação de Long & Evans.¹⁷ Esses autores também descreveram os tipos celulares e a duração de cada uma das quatro fases do ciclo estral em ratas.

Segundo a literatura, os enxertos ovarianos avasculares apresentam pequena taxa de viabilidade, acompanhada de quase ausência funcional.²⁴ Tal situação faz com que diversos autores optem pela anastomose microvascular para manter a viabilidade dos enxertos, porém, mesmo assim, a produção hormonal mantém-se reduzida.^{14,25} Por outro lado, no presente trabalho, apesar de um terço dos ovários íntegros terem mostrado sinais histológicos de degeneração, em todos os outros casos a vitalidade foi mantida.

Portanto, a técnica de implante autógeno avascular no omento maior preserva a vitalidade dos ovários, principalmente se fatiados. Todavia, a função dos ovários íntegros não foi satisfatória. Já no caso de ovários fatiados, obteve-se uma boa resposta endócrina em cerca de 27% das ratas.

Por meio de uma avaliação simples, investigou-se a melhor maneira de implantar os ovários: íntegros ou fatiados. Sabe-se que para se obter uma avaliação mais rigorosa sobre a viabilidade dos implantes ovarianos, vários outros parâmetros deveriam ser analisados.^{7,15,23} Porém, os padrões morfofuncionais observados foram suficientes para a comparação entre os grupos.

CONCLUSÃO

O implante autógeno ovariano no omento maior de ratas é tecnicamente simples e mantém os ovários viáveis. Entretanto, sob aspecto funcional, apenas os ovários fatiados tiveram atividade hormonal satisfatória. Os resultados preliminares desta investigação precisam ser complementados com estudos adicionais de dosagem hormonal e em outras espécies de animais antes de uma melhor afirmação sobre a eficácia de implantes autógenos ovarianos.

SUMMARY

Purpose: in order to maintain the gonadal function after oophorectomy, morphofunctional aspects of ovarian autotransplantation on the greater omentum and the best kind of implantation were investigated: intact or sliced. **Methods:** forty cycling female Wistar rats were randomly divided in four groups: Group I (n=5), control – laparotomy; Group II (n=5), bilateral oophorectomy; Group III (n=10), intact ovarian autotransplantation; Group IV (n=10), sliced ovarian autotransplantation both in the greater omentum. The estrous cycle was investigated in the third and sixth postoperative months and histological studies of the ovarian implants were carried out taking into account: the degeneration, fibrosis, inflammatory reaction, angiogenesis, follicular cysts, follicular development and corpi luteum. **Results:** Animals of Group I preserved their cycling sequence. Rats of Group II remained in diestrus. In Group III, 11 rats remained in diestrus, three presented incomplete cycles and one showed normal cycle. In Group IV, three animals remained in diestrus, eight showed incomplete cycles and

four showed normal cycles. The histology of ovaries of Group III were normal in ten female rats, however ovaries of the remaining five animals presented degeneration. In Group IV, 14 female rats had ovaries with preserved morphological aspect, and signs of degeneration occurred in one specimen. **Conclusions:** the ovarian autotransplantation in the greater omentum showed a viable and the sliced form and presented better morphofunctional aspects than the intact implants.

Keywords: Ovary; Ovarian Cycle; Oophorectomy, Experimental Development

REFERÊNCIAS

1. Stiff PJ, Bayer R, Kerger C. High-dose chemotherapy with autologous transplantation for persistent/relapsed ovarian cancer: a multivariate analysis of survival for 100 consecutively treated patients. *J Clin Oncol.* 1997;15:1309-17.
2. Speroff T, Dawson NV, Speroff L, Haber RJ. A risk-benefit analysis of elective bilateral oophorectomy: effect of changes in compliance with estrogen therapy on outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164:165-74.
3. Davis SR, Burger HG. Clinical review 82: androgens and postmenopausal woman. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2759-63.
4. Studd J. Prophylactic oophorectomy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989;96:506-9.
5. Von Theobald P, Roffé JL, Berrocal J, Le Porrier M, Lévy G, Muller G. Autotransplantation ovarienne hétérotopique chez la femme. *Presse Med.* 1987;16:1239-41.
6. Weissman A, Gottlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod.* 1999;60:1462-7.
7. von Eye Corleta H, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril.* 1998;70:16-9.
8. Dziuk PJ, Parvizi N, Ellendorff F. Concentrations of free 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.
9. Gay VL, Tomacari RL. Follicle-stimulating hormone secretion in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science* 1974; 184:75-7.
10. Namba Y, Yamamoto M, Atrishima K, Eguchi Y. Suppressive effect of perinatal testes on the differentiation of fetal ovaries transplanted into adult males in the rat. *J Anat.* 1997;191:31-8.
11. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod* 1995; 10:2334-8.
12. Hagen EO. Ovarian implantation in newborn male mice. *Can J Zool* 1967; 45 Suppl:1292-4.
13. 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.
14. Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12:101-6.
15. Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil.* 1960;1:230-41.
16. Cooper RL, Goldman JM, Vandenberg JG. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Female Reprod Toxicol* 1993; 3:45-56. (não constam esses autores no texto)
17. Long JA, Evans HM. The estrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, v.6, p. 1-148, 1922 apud FREMAN ME. *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat.* In: E. KNOBIL & JD NEIL (Ed.). *The Physiology of Reproduction.* Second Edition. New York: Raven Press, 1994. v.2, cap. 46, p. 613-614.
18. Cooper JE. Ethics and laboratory animals. *Vet Rec* 1985; 116:594-5.
19. Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, editor. *Ética, Moral e Deontologia Médicas.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.185-90.
20. Deanesly R. Cyclic function in ovarian grafts. *J Endocrinol* 1956; 13:211-20.
21. Smith MS, Freemam ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.* 1975;96:219-26.
22. Shorr E. A new technic for staining vaginal smears : single differential stain. *Science* 1941; 94:545-6.
23. Harrison FA, Chambers SG, Green EA. Autotransplantation of the ovary to the neck in the sow: normal cyclic activity and plasma hormone levels. *J Endocrinol.* 1980;83:46-50.
24. Callejo J, Jauregui MT, Valls C, Fernandez ME, Cabre S, Lailla JM. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertil Steril.* 1999;72:513-7.
25. Quattropani SL. Ovulation of ovarian implants in unilaterally ovariectomized rats. *Anat Rec.* 1984;209:331-6.