

EFEITO DE DIFERENTES SÍTIOS RECEPTORES NO DESENVOLVIMENTO DO AUTOTRANSPLANTE OVARIANO EM CAMUNDONGAS BALB/C

[Effect of different receptor sites on the development after ovarian autograft balb/c female mice]

Fernanda Araujo dos Santos^{1*}, Muriel Magda Lustosa Pimentel¹, Parmênedes Dias de Brito¹, Michelly Fernandes de Macedo², Marcelo Barbosa Bezerra²

¹ Alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido

² Departamento de Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões, LTG-PIVE UFRSA.

RESUMO – Objetivou-se comparar dois sítios receptores no transplante autólogo ovariano em camundongas. Doze camundongas BALB/c foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais com quatro animais em cada. O G1 - animais não submetidos ao transplante, G2 - animais que receberam o fragmento ovariano no perimétrio, G3 - animais que tiveram o tecido subcutâneo abdominal como sítio receptor. Para o transplante, as fêmeas foram submetidas à ovariossalpingectomia bilateral. O ovário esquerdo foi encaminhado para processamento histológico. O córtex do ovário direito foi fragmentado e reimplantado nos locais especificados de acordo com os grupos. Os transplantes foram recuperados em 3/4 das camundongas em cada grupo tratado. No lavado vaginal, observou-se em metade das fêmeas do G3 e em 3/4 das fêmeas do G2 retorno da ciclicidade. Observou-se presença de corpos lúteos em 1/4 dos transplantes do G3 e metade nos do G2. Na população folicular, foram observados todos os estádios de desenvolvimento. Comparando os sítios receptores observou-se maior porcentagem de retorno à ciclicidade, bem como de folículos, nos animais que tiveram o perimétrio como local do transplante. Já no subcutâneo houve menor crescimento folicular e menor quantidade de corpos lúteos. Dessa forma, conclui-se que o transplante autólogo ovariano alocado no tecido subcutâneo e no perimétrio permitiu tanto a manutenção tecidual quanto o desenvolvimento folicular, porém, o sítio de escolha vai depender do objetivo final que se almeja com a técnica.

Palavras-Chave: transplante autólogo; ovário; subcutâneo; perimétrio; *Mus musculus*.

ABSTRACT – The aim of this study was to compare two receptor sites in ovarian autologous transplantation in mice. Twelve Balb-c mice were randomly divided into three groups of four animals each: G1 - non-transplanted animals, G2 - animals which received the ovarian fragment in the perimetrium, G3 - animals which had the abdominal subcutaneous tissue as a receptor site. For transplantation, mice were subjected to bilateral salpingectomy. The left ovary was submitted for histological processing. The right ovarian cortex was fragmented and reimplanted in the specified places according to the groups. Transplants were recovered in 3/4 of the mice in each treatment group. In vaginal washes, the return of the ovarian activity in half of the females of G3 and 3/4 females of G2 was observed. It was detected the presence of corpora lutea in 1/4 of G3 transplants and half in G2. In follicular population all stages of development were observed. Comparing the receptor sites, it was observed a higher percentage of return to cyclicity, as well as of follicles, in animals which had the perimetrium as the site of transplantation. In the subcutaneous, there was a lower follicular growth and lower quantity of corpus luteum. Thus, ovarian autologous transplantation allocated in the subcutaneous tissue and perimetrium allowed both tissue maintenance and follicular development; however, the site of choice will depend on the final goal one aims with the technique.

Keywords: autograft; ovarian; subcutaneous; perimetrium; *Mus musculus*.

* Autor para correspondência. E-mail: nanda_asantos@hotmail.com

Recebido: 20 de janeiro de 2016.

Aceito para publicação: 08 de março de 2016.

INTRODUÇÃO

O ato de introduzir cirurgicamente o ovário inteiro ou fragmentos de córtex ovariano no próprio animal, próximo (ortotópico) ou distante (heterotópico) de sua posição anatômica original é definido como autotransplante ovariano (Macedo, 2007).

O transplante ovariano ortotópico possibilita o retorno espontâneo das funções reprodutivas, fornece um ambiente favorável para o desenvolvimento folicular, além de possibilitar a concepção natural (Demeestere et al., 2009), com relatos de nascidos vivos (Carroll & Gosden 1993; Candy et al., 2000; Waterhouse et al., 2004). Entretanto possui como desvantagens o número menor de fragmentos que podem ser transplantados e o procedimento cirúrgico mais invasivo. Na realização do transplante heterotópico há um aumento no limite do número de fragmentos a serem transplantados, sendo um procedimento de fácil realização e que permite o monitoramento folicular e colheita de oócitos sem dificuldades.

O sucesso da técnica, o desenvolvimento dos fragmentos e a recuperação das funções ovarianas de acordo com o objetivo almejado estão intimamente relacionados com a escolha do local de implantação do transplante de córtex ovariano. Ao selecionar um sítio receptor, algumas questões devem ser consideradas, tais como: perfusão local, permissão ao desenvolvimento folicular, possibilidade de concepção natural, facilidade do procedimento, acesso conveniente para a coleta de oócitos e volume de tecido transplantado (Demeestere et al., 2009). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi observar se há manutenção da viabilidade tecidual, desenvolvimento folicular, vascularização e luteinização do tecido ovariano após o autotransplante, num estudo comparativo entre dois sítios receptores utilizando camundongas BALB/c como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), e aprovado pela comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) sob o protocolo 23091.002332/2013-85.

Doze camundongas (*Mus musculus*) adultas (60 dias de idade), saudáveis e púberes foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais com 4 animais em cada grupo a saber: G1 - composto por animais inteiros; G2 - composto por animais que receberam amostras de córtex ovariano no

perimétrio; G3 - formado por animais que tiveram o tecido subcutâneo abdominal como sítio receptor ao tecido ovariano.

O transplante foi realizado após anestesia com 2,2,2 tribromoetanol 2,5% (20 ml/kg por via intraperitoneal (IP)). As fêmeas dos grupos G2 e G3 foram submetidas à ovariossalpingectomia bilateral por laparotomia sublombar prévia ao transplante, fragmentação do tecido cortical ovariano com remoção de folículos antrais e corpos lúteos com posterior alocação das amostras no sítio receptor especificado para cada grupo. Foram autotransplantados três fragmentos (1 mm³ cada) de tecido ovariano no subcutâneo abdominal (G3) e um fragmento (medindo 3 mm³ fixado com fio absorvível) no perimétrio (G2). Os ovários esquerdos foram encaminhados para processamento histológico com posterior avaliação histopatológica.

Transcorridos cinco dias dos transplantes, iniciou-se a avaliação por lavado vaginal a cada 12 horas durante 25 dias nas fêmeas transplantadas e nas fêmeas controle para observação do ciclo estral. Os lavados foram avaliados sob microscopia de luz a fresco e sem coloração (20x) e a classificação foi baseada nos critérios estabelecidos por Cooper et al. (1993).

Após 30 dias do início do experimento, as fêmeas transplantadas foram eutanasiadas, os transplantes coletados e encaminhados para processamento histopatológico de rotina. Os ovários esquerdos foram também submetidos a esta avaliação para constituir o controle.

Os folículos visibilizados foram contabilizados e classificados quando evidenciavam o núcleo do oócito. Foram observadas também, microscopicamente, características como presença ou ausência e tipo do suprimento vascular para o tecido transplantado; e presença ou ausência de luteinização. A classificação morfológica tanto nos ovários controle quanto nos fragmentos transplantados seguiu os padrões morfológicos de Pedersen & Peters (1968) e a avaliação qualitativa (normais e atrésicos) ocorreu de acordo com Braw & Tsafirri (1989).

As proporções entre os diferentes folículos ovarianos (normais e atrésicos) em função do local do transplante foram comparados pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). Para a análise estatística utilizou-se o BioEstat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação dos transplantes ocorreu em 75% das camundongas de ambos os grupos, acreditando-se que os transplantes não recuperados foram

reabsorvidos, pois foi observado, a partir de avaliação histopatológica, tecido conjuntivo fibroso no local do transplante.

Em relação ao retorno da ciclicidade, no G2 (perimétrio) observou-se que 75% das fêmeas tiveram esse retorno, ocorrendo o primeiro ciclo em 240 ± 48 horas após a realização do transplante. No G3 (subcutâneo), apenas metade das fêmeas retornaram à ciclicidade após 264 ± 96 horas da realização do transplante. No G3, os fragmentos foram recuperados em três dos quatro animais, porém, apenas duas fêmeas tiveram retorno de ciclicidade. Uma dessas fêmeas apresentava apenas um folículo em seu fragmento, sendo esse, um pré-ovulatório. Sabe-se que o estrogênio produzido pelos folículos induz à mudança na citologia vaginal das fêmeas (Cooper et al., 1993), porém um folículo apenas, mesmo sendo pré-ovulatório, não é suficiente para produzir alterações nos padrões citológicos vaginais.

As fêmeas transplantadas tiveram aumento na duração do ciclo estral, sendo esse mesmo resultado, observado nos animais do grupo controle. A provável explicação para esse aumento, é que fêmeas alojadas em gaiolas, sem a presença de machos, podem exibir a fase chamada anestro, caracterizada pela ausência de ciclos estrais (Santos, 2002), ou então, ter o diestro como fase predominante.

Analisando a morfologia dos folículos pré-antrais (Figura 1) e antrais (Figura 2) não se observou diferenças entre os folículos existentes nos fragmentos dos grupos transplantados para aqueles encontrados no órgão *in situ*, comprovando que os sítios receptores fornecem condições fisiológicas apropriadas para o desenvolvimento folicular. Foram observadas todas as características preconizadas por Pedersen & Peters (1968) durante a avaliação folicular desse estudo, indicando que os folículos em desenvolvimento nos transplantes não apresentaram alterações morfológicas.

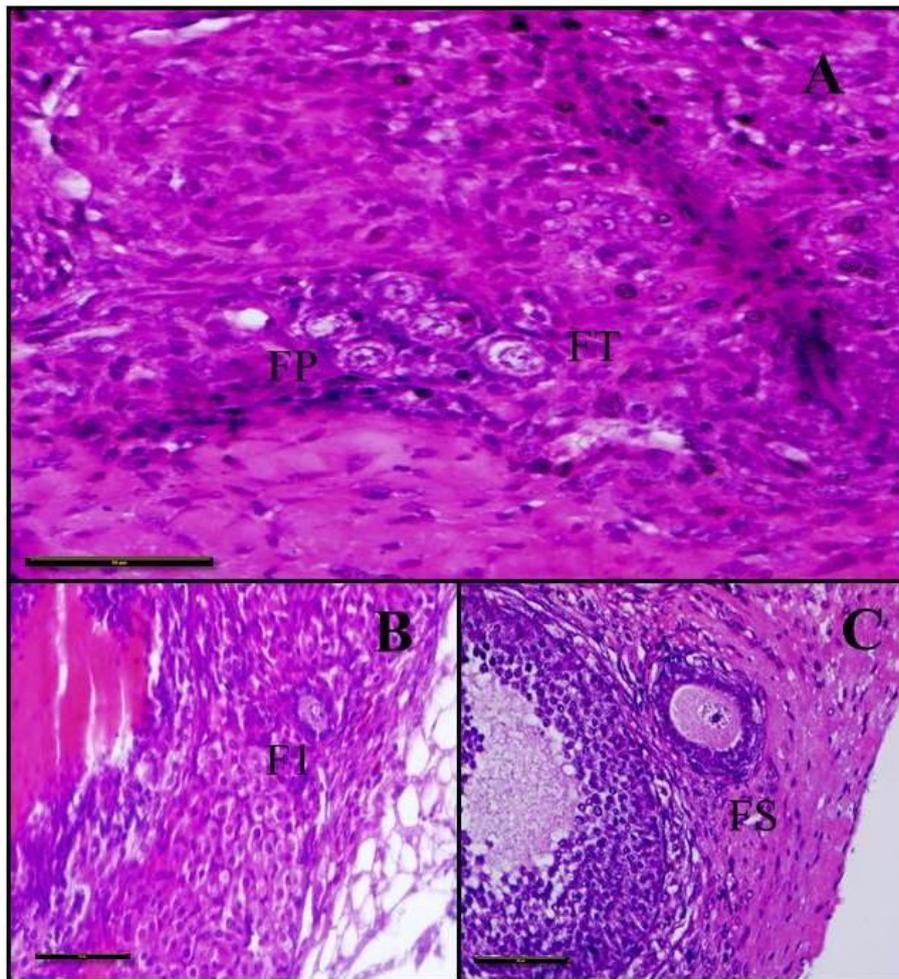


Figura 1. Fotomicrografia de folículos pré-antrais observados nos fragmentos ovarianos transplantados em camundongas Balb-c. **A.** Folículo primordial (FP), folículo de transição (FT) – G3; **B.** Folículo primário (F1) – G2; **C.** Folículo secundário (FS) – G2. HE. G2 – transplante alocado no perimétrio. G3 – transplante alocado no subcutâneo. Fonte: autoria própria. Barra de escala: 100 μ m.

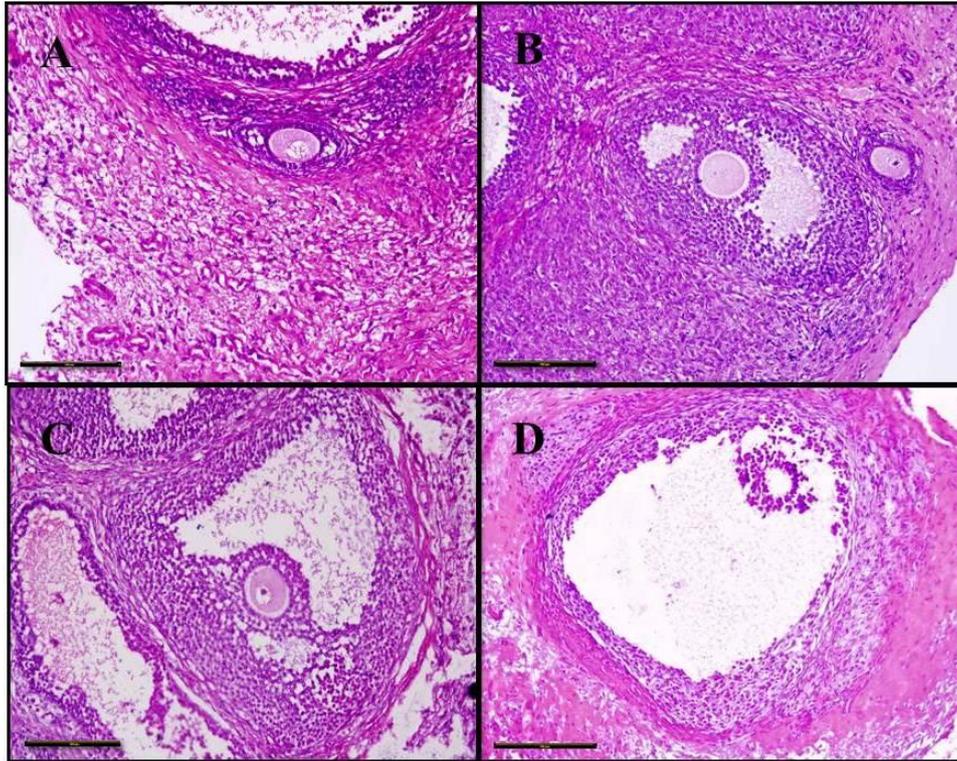


Figura 2. Fotomicrografia de folículos antrais observados nos fragmentos ovarianos transplantados em camundongas Balb-c. **A.** Folículo antral inicial – G3; **B.** Folículos antral – G3; **C.** Folículo antral – G2; **D.** Folículo pré-ovulatório – G2. HE. G2 – transplante alocado no perimétrio. G3 – transplante alocado no subcutâneo. Fonte: autoria própria. Barra de escala: 100 μ m.

Para avaliação quantitativa e qualitativa, os dados obtidos a partir da contagem dos folículos normais e atresícos (Tabela 1) encontrados nos ovários e fragmentos transplantados foram convertidos em porcentagens de folículos em função do local do transplante. Não foram observadas diferenças nas categorias de folículos atresícos em função do local do transplante. Já nos folículos normais, observou-

se diferença quanto à categoria dos pré-ovulatórios. Essa diferença ocorreu pelo fato de que 75% dos transplantes recuperados no subcutâneo apresentaram todas as categorias foliculares, mas em 33% houve apenas a presença de folículo pré-ovulatório, aumentando assim a quantidade desses folículos no grupo 3.

Tabela 1. Proporções (%) dos diferentes folículos ovarianos normais e atresícos em função dos locais de transplante.

Normais							
Grupos experimentais	Primord.	Trans.	Primár.	Secund.	A. Inicial	Antral	Pré-Ovulat.
G1 (n = 1238)	28,2 ^a	14,9 ^a	27,5 ^a	14,2 ^a	6,0 ^a	4,6 ^a	1,4 ^a
G2 (n = 108)	31,3 ^a	17,4 ^a	26,1 ^a	8,7 ^a	4,3 ^a	3,5 ^a	2,6 ^a
G3 (n = 57)	25,8 ^a	11,3 ^a	21,0 ^a	11,3 ^a	6,5 ^a	4,8 ^a	11,3 ^b
Atresícos							
Grupos experimentais	Primord.	Trans.	Primár.	Secund.	A. Inicial	Antral	Pré-Ovulat.
G1 (n = 41)	0,3 ^a	0,0 ^a	0,4 ^a	1,7 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a	0,0 ^a
G2 (n = 7)	0,9 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	1,7 ^a	1,7 ^a	0,9 ^a	0,9 ^a
G3 (n = 5)	1,6 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	1,6 ^a	1,6 ^a	1,6 ^a	1,6 ^a

G1 – grupo I, controle; G2 – grupo II, transplante no perimétrio; G3 – grupo III, transplante no subcutâneo. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste do χ^2 ($p < 0,05$).

Em todos os grupos do experimento, observou-se que a maior população de folículos normais é de pré-antrais, sendo a maior porcentagem de

primordial, transição e primário. Resultados semelhantes foram observados em experimentos com camundongas (Huang et al., 2010), ratas

(Macedo, 2007) e gatas domésticas (Crestana, 2006) e se justificam pelo fato de que folículos nos estádios iniciais, principalmente primordiais e primários, são pequenos e estruturalmente simples (Israely et al., 2003), possuem baixo metabolismo permitindo melhor sobrevivência em ambiente isquêmico (Huang et al., 2010). Além disso, encontram-se mais na periferia do córtex ovariano e são os primeiros a se beneficiarem com a revascularização após o transplante (Nugent et al., 1997).

O tecido ovariano é fonte de fatores angiogênicos que estimulam a rápida migração de células endoteliais nos casos de transplantes, o que leva ao restabelecimento da circulação sanguínea (Nisolle et al., 2000). Adicionalmente, sabe-se que, para que haja manifestação de estro, é necessário que substâncias estrogênicas produzidas pelas células da granulosa e teca, existentes principalmente nos folículos antrais, sejam liberadas na corrente sanguínea e hajam no órgão alvo, no caso, o canal vaginal (Cooper et al., 1993) e no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal para controle da atividade ovariana. Neste trabalho, o suprimento vascular ofertado pelo tecido subcutâneo abdominal e perimétrio ao córtex ovariano foi considerado morfológicamente semelhante àquele existente no ovário *in situ* de camundonga a partir de 10 dias de transplante, quando se observou retorno de ciclicidade das fêmeas, sendo que no perimétrio, a neovascularização ocorreu em 75% dos animais transplantados, já no subcutâneo ocorreu em 50%. A quantidade de animais transplantados que tiveram retorno da ciclicidade foi a mesma dos que obtiveram neovascularização, sendo isso comprovado microscopicamente a partir da visualização de vasos sanguíneos nas lâminas histológicas e de forma indireta, observando-se mudanças no lavado vaginal.

Foram observados corpos lúteos em 33% dos transplantes recuperados no subcutâneo abdominal e em 75% dos transplantes no perimétrio. A presença dessas estruturas indica que houve desenvolvimento dos folículos e que esses atingiram tamanho propício à ovulação (Samuelson, 2007).

O local do transplante influencia tanto no processo de neovascularização como no desenvolvimento folicular (Demeestere et al., 2009), já que melhor aporte sanguíneo facilita o processo de revascularização do transplante (Liu et al. 2002). Nesse trabalho, o perimétrio forneceu melhor aporte vascular para os transplantes, por ser uma região melhor perfundida e, provavelmente, a fixação dos fragmentos ovarianos neste local, colaborou para a redução do tempo de isquemia pós-transplante, permitindo consequentemente, um

retorno mais rápido da ciclicidade e melhor desenvolvimento folicular, podendo ser esse o sítio de escolha quando o objetivo final for obter folículos viáveis, num período de tempo menor, para produção *in vitro* de embriões. Já o subcutâneo permitiu melhor monitoramento do tecido transplantado e apresentou um retardo maior no desenvolvimento folicular, podendo ser selecionado quando a intenção for manter funções hormonais da fêmea e o tecido viável por uma fração de tempo mais extensa.

CONCLUSÃO

As técnicas executadas nesse trabalho mantiveram a viabilidade dos órgãos avaliados, havendo preservação das funções desses.

O autotransplante ovariano no tecido subcutâneo abdominal e perimétrio permitiu o desenvolvimento folicular satisfatório, havendo diferenças, principalmente, quanto ao tempo requerido para tal. A escolha entre esses diferentes sítios estará na dependência do objetivo final esperado, seja produção de embriões ou manutenção de tecidos e funções hormonais da fêmea transplantada.

REFERÊNCIAS

- BRAW, R. H.; TSAFRIRI, A. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. **Journal of reproduction and fertility**, v. 59, n. 2, p. 267-272, 1980.
- CARROLL, J.; GOSDEN, R. G. Physiology: Transplantation of frozen—thawed mouse primordial follicles. **Human Reproduction**, v. 8, n. 8, p. 1163-1167, 1993.
- CANDY, C. J. et al. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1300-1304, 2000.
- COOPER, R. I. et al. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In: HEINDEL, J. J.; CHAPIN, R. E.(eds). **Female Reproductive Toxicology, Methods in Toxicology**, v. 3, Part B. San Diego: Academic Press, 1993. Cap.4, p. 45.55.
- CRESTANA, F. M.. **Autotransplantação de ovário no subcutâneo e consumo folicular em gatas domésticas (felis catus)**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
- DEMEESTERE, I. et al. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 6, p. 649-665, 2009.
- HUANG, K. et al. Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. **Cryobiology**, v. 60, n. 2, p. 129-137, 2010.
- ISRAELY, T. et al. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 6, p. 2055-2064, 2003.
- MACEDO, M. F. **Avaliação cirúrgica e histopatológica da viabilidade do auto-enxerto de tecido ovariano na região**

subcapsular do rim de ratas. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista.

NISOLLE, M. et al. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 1, p. 122-129, 2000.

NUGENT, D. et al. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 3, p. 267-280, 1997.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, p. 555-557, 1968.

SAMUELSON, P. **Tratado de histologia veterinária.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade, A., Pinto, S. C., Oliveira, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. p.115.

WATERHOUSE, T. et al. Offspring produced from heterotopic ovarian allografts in male and female recipient mice. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 689-694, 2004.