



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

MARIA TEREZA PINTO MEDEIROS DIAS

**NEOVAGINOPLASTIA COM PELE DE TILÁPIA: NOVO ENXERTO BIOLÓGICO
PARA SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER**

FORTALEZA

2021

MARIA TEREZA PINTO MEDEIROS DIAS

NEOVAGINOPLASTIA COM PELE DE TILÁPIA: NOVO ENXERTO BIOLÓGICO
PARA SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D533n Dias, Maria Tereza Pinto Medeiros.
Neovaginoplastia com pele de tilápia: novo enxerto biológico para síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser / Maria Tereza Pinto Medeiros Dias. – 2021.
64 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra.
1. Vagina. 2. Procedimentos cirúrgicos ginecológicos. 3. Anormalidades congênitas. 4. Tilápia do Nilo. 5. Xenoenxertos. I. Título.

CDD 617

MARIA TEREZA PINTO MEDEIROS DIAS

NEOVAGINOPLASTIA COM PELE DE TILÁPIA: NOVO ENXERTO BIOLÓGICO
PARA SÍNDROME DE MAYER-ROKITANSKY-KÜSTER-HAUSER

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. ^a Dr. ^a Raquel Autran Coelho Peixoto

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. ^a Dr. ^a Zenilda Vieira Bruno

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho ao meu esposo Francisco Magalhães Junior, ao meu filho João Marcelo e à minha filha Maria Cecília que muito me apoiaram e me incentivaram a realiza-lo.

Razões da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Doutor Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra por ter um pensamento sempre a frente do seu tempo, empolgando a todos com suas ideias brilhantes, inclusive a mim.

Às Professoras Doutoras da Banca Examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Zenilda Vieira Bruno, Prof^ª. Dr^ª. Raquel Autran Coelho Peixoto, Prof^ª. Dr^ª. Andreisa Paiva Monteiro Bilhar, que prontamente aceitaram participar da banca.

À Maternidade Escola Assis Chateaubriand que sempre apoiou nosso estudo e me acolheu muito bem anos antes como médica da casa.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará que acreditou no estudo e forneceu a pele de tilápia do Nilo, nosso astro principal, além do trabalho do laboratório de patologia. Em especial ao Prof. Odorico de Moraes, à Prof, Ana Paula Negreiros Nunes Alves e ao Mestre Edmar Maciel, todos sempre tão envolvidos na qualidade e reconhecimento da pele de tilápia do Nilo.

Às pacientes envolvidas no estudo que confiaram e aceitaram participar do estudo.

À minha amiga e Mestre Claruza Braga Holanda Lavor que aceitou ser suplente na Banca Examinadora e que apoiamos uma na outra ao longo da trajetória do mestrado.

Ao meu pai Tarciso de Medeiros Dias que me ensinou a ser forte e não me deixar abater por nada.

À minha mãe Silvia Helena Pinto Medeiros Dias que sempre sonhou em me ver como Mestre e que foi uma Mestre em Economia em tempos que poucas mulheres chegavam lá.

RESUMO

A síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SMRKH) é a segunda causa mais comum de amenorreia primária, perdendo apenas para a disgenesia gonadal. Caracteriza-se por uma aplasia completa ou parcial de trompas, útero e dois terços superiores da vagina, podendo estar associada a malformações extragenitais. A neovaginoplastia é uma opção de tratamento adequada para agenesia vaginal naquelas pacientes que falharam na terapia de dilatação. Biomateriais têm sido utilizados neste procedimento, incluindo peritônio, âmnio, enxertos de pele e retalhos miocutâneos. A pele de tilápia do Nilo (PTN) tem uma microbiota não infecciosa, estrutura morfológica comparável à pele humana e boa compatibilidade com os seres humanos, sendo sugerida como um novo enxerto biológico para o manejo da agenesia vaginal. O objetivo desse trabalho é descrever uma nova técnica cirúrgica para agenesia vaginal em pacientes com SMRKH. Trata-se de um estudo descritivo, onde três pacientes com SMRKH foram acompanhadas e submetidas a uma neovaginoplastia com PTN. O processo de esterilização da PTN passa por uma etapa química e outra através de radiação ionizante com raios gama. O seguimento ambulatorial no pós-operatório foi realizado com 30, 60, 90 e 180 dias. Quando o uso correto de moldes após a cirurgia foi mantido, o comprimento vaginal permaneceu maior que 7 cm durante todo o seguimento de 180 dias. Análises histológicas e imuno-histoquímicas das neovaginas revelaram a presença de um epitélio escamoso estratificado com alta expressão de citoqueratinas e fatores de crescimento de fibroblastos, correspondendo às características do tecido vaginal adulto normal. A neovaginoplastia usando PTN forneceu a três pacientes uma neovagina anatômica e funcional, através de um método simples, seguro e minimamente invasivo. Mais estudos mostrarão que PTN é uma opção relevante no arsenal terapêutico da agenesia vaginal da síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser.

Palavras-chave: Vagina. Procedimentos cirúrgicos ginecológicos. Anormalidades congênitas. Tilápia do Nilo. Xenoenxertos.

ABSTRACT

Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKHS) is the second most common cause of primary amenorrhea, trailing only to gonadal dysgenesis. It is characterized by complete or partial aplasia of the fallopian tubes, uterus and upper two thirds of the vagina, and may be associated with extragenital malformations. Neovaginoplasty is an appropriate treatment option for vaginal agenesis in those patients who have failed dilation therapy. Several biomaterials have been used in this procedure, including peritoneum, amnion, skin grafts, and myocutaneous flaps. Nile Tilapia Fish Skin (NTFS) has noninfectious microbiota, morphologic structure comparable to human skin, and high in vivo bioresorption. NTFS is suggested as a new biological graft for the management of vaginal agenesis. The aim of this work is to describe a new surgical technique for vaginal agenesis in patients with MRKHS. This is a descriptive study, in which three patients with MRKHS were followed up and submitted a neovaginoplasty using Nile Tilapia Fish Skin. NTFS sterilization process goes through a chemical step and another through ionizing radiation with gamma rays. Postoperative outpatient follow-up was performed at 30, 60, 90 and 180 days. When postsurgical dilation was performed correctly, a vaginal length greater than 7 cm was maintained at 180 days follow-up. Histologic and immunohistochemical analyses revealed the presence of stratified squamous epithelium with high expression of cytokeratins and fibroblast growth factor, matching the characteristics of normal adult vaginal tissue. Neovaginoplasty using Nile Tilapia Fish Skin offered three patients an anatomic and functional neovagina via a simple method, safe and minimally invasive. More studies will show Nile Tilapia Fish Skin to be a relevant option in the therapeutic arsenal for vaginal agenesis of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome.

Keywords: Vagina. Gynecologic surgery. Congenital abnormalities. Nile Tilapia. Xenografts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 – | Esquema de um corte sagital da região pélvica de uma adulta normal e de uma paciente com Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser..... | 14 |
| Figura 2 – | Esquema da formação embriológica do sistema reprodutor masculino e feminino..... | 15 |
| Figura 3 – | Visão microscópica de uma vagina de mulher adulta normal, coloração hematoxilina-eosina (HE), mostrando o epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado com suas várias camadas e o tecido conjuntivo..... | 16 |
| Figura 4 – | Molde de acrílico vaginal antes e após a cirurgia de neovaginoplastia..... | 23 |
| Figura 5 – | Escores do FSFI, validado para o português..... | 26 |
| Figura 6 – | Paciente P3 com 60 dias da cirurgia..... | 29 |
| Figura 7 – | Paciente P4 com 180 dias da cirurgia..... | 29 |
| Figura 8 – | Paciente P5 com 30 dias da cirurgia..... | 30 |
| Figura 9 – | Fotos de cortes histológicos das paredes das neovaginas após 6 meses da cirurgia..... | 32 |
| Figura 10 – | Foto de corte histológico de neovagina após 180 dias com reação imuno-histoquímica anti-CK..... | 32 |
| Figura 11 – | Fotos de cortes histológicos das paredes das neovaginas após 6 meses da cirurgia..... | 33 |
| Quadro 1 – | Características individuais das pacientes submetidas à vaginoplastia com pele de tilápia do Nilo. | 27 |
| Quadro 2 – | Resultados da avaliação pós-operatória das pacientes submetidas à neovaginoplastia com PTN (pacientes que permaneceram com a pele após a retirada do molde de acrílico)..... | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AZ | Arizona |
| CA | Califórnia |
| CK | Citoqueratina |
| EGF | Fator de crescimento epitelial |
| EGFR | Receptores do fator de crescimento epitelial |
| FGF | Fator de crescimento de fibroblastos |
| FSFI | Índice de Satisfação Sexual Feminino |
| HE | Hematoxilina-eosina |
| INPI | Instituto Nacional da Propriedade Industrial |
| MEAC | Maternidade Escola Assis Chateaubriand |
| P1 | Paciente 1 |
| P2 | Paciente 2 |
| P3 | Paciente 3 |
| P4 | Paciente 4 |
| P5 | Paciente 5 |
| PTN | Pele de tilápia do Nilo |
| SMRKH | Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|-------------------------|
| % | Por cento |
| Cm | centímetros |
| kGy | Quilo Gray |
| M | Massa molar |
| mm | Milímetros |
| °C | Grau Celsius |
| pH | Potencial de Hidrogênio |
| rpm | Rotações por minuto |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 | Geral..... | 19 |
| 2.2 | Específicos..... | 19 |
| 3 | METODOLOGIA..... | 20 |
| 3.1 | Tipo do estudo..... | 20 |
| 3.2 | Local da pesquisa..... | 20 |
| 3.3 | Participantes..... | 20 |
| 3.4 | Comitê de ética..... | 21 |
| 3.5 | Pele de tilápia do Nilo..... | 21 |
| 3.6 | Internação hospitalar..... | 22 |
| 3.6.1 | <i>Pré-operatório</i> | 22 |
| 3.6.2 | <i>Intraoperatório</i> | 22 |
| 3.6.3 | <i>Pós-operatório</i> | 23 |
| 3.7 | Avaliação anatômica..... | 24 |
| 3.8 | Análise histológica..... | 25 |
| 3.9 | Análises imuno-histoquímicas..... | 25 |
| 3.10 | Avaliação funcional..... | 26 |
| 4 | RESULTADOS..... | 27 |
| 4.1 | Resultados clínicos..... | 27 |
| 4.2 | Resultados histológicos e imuno-histoquímicos..... | 31 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 34 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 38 |
| | REFERÊNCIAS..... | 39 |
| | APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 43 |
| | APÊNDICE B – PRIMEIRA PUBLICAÇÃO..... | 46 |
| | APÊNDICE C – SEGUNDA PUBLICAÇÃO..... | 49 |
| | ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| SUMÁRIO | |
| (FSFI) PARA USO EM LÍNGUA PORTUGUESA (HENTSCHEL <i>et al.</i>, 2007)..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SMRKH) é um distúrbio raro com prevalência de cerca de um a cada 5000 nascidos vivos do sexo feminino. Trata-se da segunda causa mais comum de amenorreia primária, perdendo apenas para a disgenesia gonadal (HERLIN *et al.*, 2016).

Provavelmente, as primeiras descrições de agenesia vaginal remontam a manuscritos antigos de Avicena (980 – 1037) e Albucasis (1013 – 1100). Na era moderna, Mayer associa a agenesia vaginal a uma síndrome com várias malformações em 1829. Posteriormente, Rokitansky descreve dois casos com um pequeno útero bipartido, ovários normais e ausência vaginal. Küster relata as anomalias renais e esqueléticas frequentemente associadas e, por fim, Hauser realça o espectro dessas anomalias presentes na síndrome em 1961. A partir de então, essa condição adquire seu atual nome, síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (SOUSA *et al.*, 2014; PANICI *et al.*, 2011).

A SMRKH caracteriza-se por uma aplasia completa ou parcial de trompas, útero e os dois terços superiores da vagina (figura 1). Pode ainda estar associada a anomalias extragenitais, sendo as mais comuns no sistema urinário. No entanto, os ovários são funcionantes com desenvolvimento adequado dos caracteres sexuais secundários e o cariótipo é feminino, sem anormalidades (46X,X) (HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020).

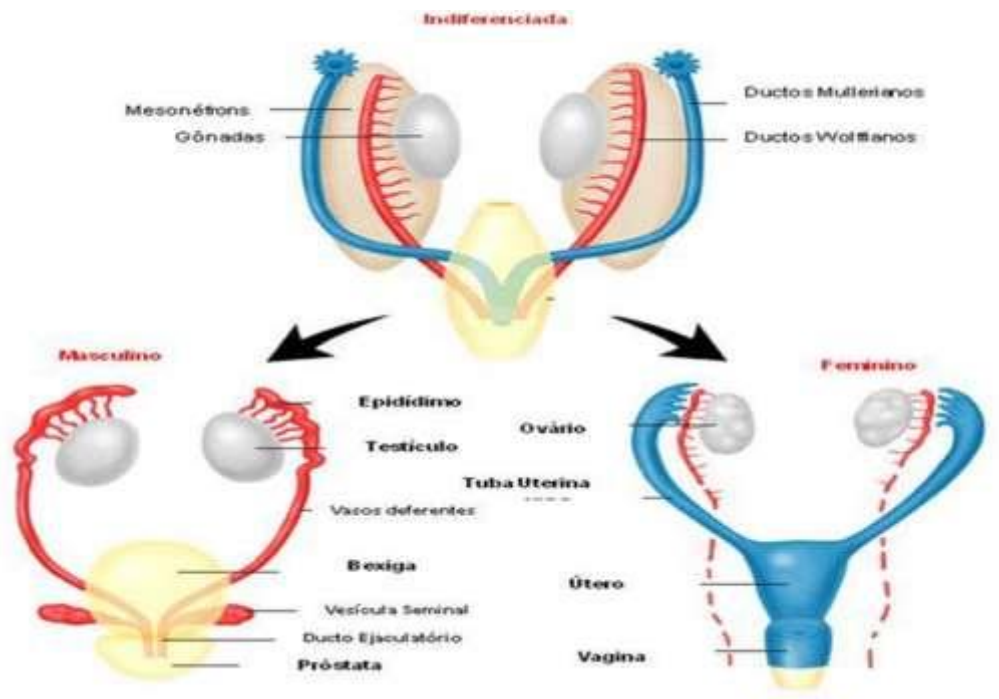
Figura 1 – Esquema de um corte sagital da região pélvica de uma adulta normal e de uma paciente com Síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser



Fonte: Site Doenças Raras Doem (2020).

As trompas de Falópio, útero, colo uterino e dois terços superiores da vagina originam-se dos ductos paramesonéfricos ou Müllerianos, enquanto a parte inferior da vagina se origina do seio urogenital. A fusão da parte caudal dos ductos paramesonéfricos formam o útero, o colo do útero e a parte superior da vagina, enquanto as partes superiores formam as trompas (figura 2). A SMRKH origina-se de um defeito parcial ou total da fusão desses ductos (HERLIN; PETERSEN; BRÄNNSTRÖM, 2020).

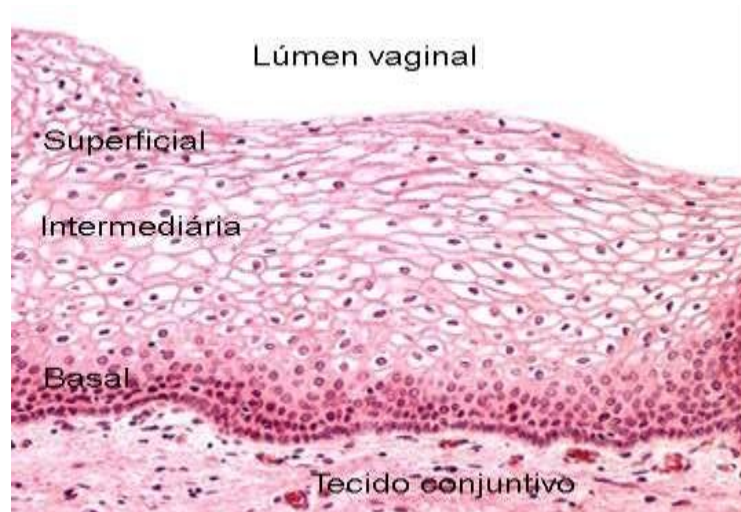
Figura 2 – Esquema da formação embriológica do sistema reprodutor masculino e feminino



Fonte: Jacobus (2009).

A vagina normal de uma mulher adulta é formada por um epitélio pavimentoso não queratinizado (figura 3). Esse epitélio é descamativo, rico em glicogênio e sofre influências hormonais. Não existem glândulas nas paredes vaginais e a lubrificação vaginal origina-se, principalmente, da cérvix uterina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Vasos presentes no tecido conjuntivo da mucosa vaginal podem contribuir também com uma difusão de fluido vaginal através do epitélio, o que aconteceria após a excitação sexual (JANNINI; AMATI; LENZI, 2005).

Figura 3 – Visão microscópica de uma vagina de mulher adulta normal, coloração hematoxilina-eosina (HE), mostrando o epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado com suas várias camadas e o tecido conjuntivo



Fonte: Abrahamsohn, MOL – Microscopia online, versão 3.0 (2020).

A imuno-histoquímica é um método bastante difundido para a localização de antígenos em tecidos, utilizando a ligação específica dos anticorpos aos antígenos (RAMOS-VARA, 2005). Permite a comprovação de biomarcadores não visualizados no estudo microscópico convencional, mostrando processos fisiológicos como a epitelização, angiogênese e diferenciação celular.

A citoqueratina (CK) é constituinte do citoesqueleto das células epiteliais, pertencendo aos filamentos intermediários, o que permite a sua utilização com um importante marcador na diferenciação celular do tecido epitelial (ALMEIDA JR, 2004).

EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial) é um marcador pleiotrófico, exercendo respostas biológicas variadas que vão da mitogênese à apoptose, migração celular para diferenciação e até indiferenciação dentro da mesma célula, a depender do contexto. A modulação do EGFR é usada na reparação de feridas e limitação de cicatrizes. Sua positividade no tecido estudado demonstra um processo de migração e proliferação celular (WELLS, 1999).

A presença do FGF (fator de crescimento de fibroblastos) influencia na diferenciação de uma variedade de tipos de células e promove a proliferação celular. Esse fator atua como mitógeno e exibe potente atividade angiogênica. FGF induz um fenótipo diferenciado, bem como parece ter um papel na manutenção das células diferenciadas (JOHNSON; WILLIAMS, 1992).

O principal objetivo do tratamento da agenesia vaginal é criar um canal vaginal com diâmetro e comprimento vaginais adequados, direção axial e lubrificação apropriadas para promover uma relação sexual satisfatória à paciente (GEORGAS *et al.*, 2018). Idealmente, o procedimento deve ser permanente, com ausência ou uso mínimo de dilatadores, ser não invasivo ou minimamente invasivo, sem deixar cicatrizes visíveis (PANICI *et al.*, 2011).

Vários estudos descrevem sentimentos de inadequação, baixa autoestima, ansiedade e sensação de ameaça à feminilidade nas pacientes com SMRKH, podendo levar a quadros de disfunção sexual. A impossibilidade de manter uma gravidez também contribui para esses sentimentos negativos em relação a si mesma (FACCHIN *et al.*, 2021).

O tratamento dessas pacientes com SMRKH inclui aconselhamento psicológico e correção das anomalias anatômicas, que pode ser realizado com dilatadores vaginais progressivos ou cirurgia (HERLIN *et al.*, 2016). A dilatação vaginal é considerada a primeira linha de tratamento para a agenesia vaginal característica da síndrome, visto que a cirurgia de neovaginoplastia está associada a um maior risco de complicações e resultados funcionais ou anatômicos pobres (CHEIKHELARD *et al.*, 2018).

No entanto, a cirurgia é uma opção adequada em pacientes pouco aderentes, que falharam no método de dilatação vaginal ou, ainda, naquelas que não querem iniciar o tratamento com os dilatadores. Apesar das altas taxas de sucesso da dilatação vaginal não cirúrgica, algumas mulheres expressam aspectos negativos a esse método, devido ao longo tempo de dilatação por até seis meses, cansaço, falta de privacidade e conforto ou até mesmo falta de tempo para dilatar a vagina diariamente (BOMBARD; MOUSA, 2014). Fatores culturais e limitações sociais também estão envolvidos na falha dos métodos de dilatação, com consequentes sentimentos de constrangimento (DABAGHI *et al.*, 2019).

Várias técnicas cirúrgicas para neovaginoplastia foram descritas, incluindo técnicas mais invasivas com rotação de segmentos intestinais, uso abdominal de sistemas de tração e ressecção de peritônio por via abdominal. A neovaginoplastia de Williams é uma técnica minimamente invasiva, porém cria uma neovagina com um eixo bem diferente de uma vagina normal (PIAZZA, 2014). A técnica de Abbe-McIndoe é a mais comumente realizada (PANICI *et al.*, 2007), utilizando enxertos de pele autólogos removidos da coxa, região glútea ou parede abdominal inferior. Trata-se de um método relativamente simples e minimamente invasivo, sendo amplamente difundido no mundo (PIAZZA, 2014).

Contudo, a técnica de Abbe-McIndoe ainda tem as desvantagens de tempo cirúrgico considerável, maior risco de infecções e desenvolvimento de cicatrizes abdominais ou inguinais estigmatizantes (PANICI *et al.*, 2011). Além disso, o enxerto de pele preserva grande parte de

suas características originais, com um potencial crescimento de pelos na neovagina (CALLENIS *et al.*, 2014). Modificações na técnica foram propostas com biomateriais diversos, como membranas amnióticas, enxertos autólogos de mucosa oral, materiais inertes e tecido vaginal cultivado em laboratório. Algumas dessas modificações apresentaram maior tempo de internação hospitalar e complicações infecciosas, bem como outras apresentaram um alto custo econômico e baixa aplicabilidade (PANICI *et al.*, 2011). Portanto, é necessário o desenvolvimento de um material alternativo e de baixo custo com fácil manipulação para um melhor manejo das mulheres diagnosticadas com SMRKH.

A pele de tilápia do Nilo (PTN) vem sendo estudada como um novo biomaterial para aplicabilidade clínica. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família dos ciclídeos, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África. No Ceará, a piscicultura da tilápia encontra-se difundida em diversos reservatórios, nas principais bacias hidrográficas do Estado (ALVES *et al.*, 2015).

A PTN apresenta uma microbiota não infecciosa (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2016), tem uma estrutura morfológica semelhante à pele humana (ALVES *et al.*, 2015) e alta bioreabsorção *in vivo* (SUGIURA *et al.*, 2009). A PTN contém uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno (SOUZA; SANTOS, 1997). O colágeno configura-se como um dos principais componentes dos biomateriais, devido a sua capacidade de orientar e definir a maioria dos tecidos biológicos (CEN *et al.*, 2008). Bons resultados foram mostrados quando a PTN foi usada como um xenoenxerto no tratamento de queimaduras de pacientes pediátricos (COSTA *et al.*, 2019) e adultos (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2019) em dois estudos recentes. Apesar desses estudos serem apenas relatos de casos de outras situações com risco de vida e que exigiam soluções inovadoras, que não é o caso das pacientes desse estudo, eles revelaram o poder de cicatrização e a falta de toxicidade e antigenicidade da PTN.

Assim, o presente trabalho considerou a PTN como um potencial biomaterial de qualidade para o tratamento da agenesia vaginal da SMRKH. O propósito desse estudo é apresentar a técnica cirúrgica de vaginoplastia de Abbe-McIndoe modificada com a utilização da PTN como um novo enxerto biológico, no lugar de autoenxertos ou aloenxertos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever uma nova técnica cirúrgica para o tratamento da agenesia vaginal em pacientes com síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser, utilizando a pele de tilápia do Nilo como um novo biomaterial, e seus resultados anatômicos, funcionais e histológicos.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a anatomia das neovaginas com PTN;
- b) Analisar as neovaginas com PTN através da histologia e imuno-histoquímica;
- c) Registrar a funcionalidade das neovaginas com pele de tilápia do Nilo.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo e experimental. A amostragem foi não probabilística por conveniência, visto que a SMRKH é uma condição patológica rara e seria preciso um longo período de tempo para uma amostra representativa da população em estudo.

3.2 Local da pesquisa

O estudo foi executado na Maternidade Escola Assis de Chateaubriand (MEAC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), entre abril de 2017 e abril de 2018.

3.3 Participantes

Os critérios de inclusão para participação no estudo foram definidos como pacientes com agenesia vaginal por SMRKH que eram atendidas no Ambulatório de Malformações Genitais da MEAC. Tais pacientes deveriam desejar a cirurgia de neovaginoplastia para correção da agenesia vaginal e optar por participar do estudo quando oferecido e explicado a elas. Foram excluídas aquelas pacientes que apresentavam agenesia vaginal por outras patologias, pacientes já submetidas a procedimentos prévios de dilatação não cirúrgica ou cirúrgica e, por fim, aquelas pacientes que optaram pelo tratamento de dilatação não cirúrgica como primeira opção.

O seguimento ambulatorial com anamnese cuidadosa, exame físico completo, avaliação hormonal, cariótipo e exames de imagem como ultrassonografia ou ressonância abdominal e pélvica foram realizados. Após a confirmação do diagnóstico de SMRKH, foi explicado a cada paciente e responsável legal (aplicável a duas pacientes que eram menores de idade na época) sobre a patologia e opções de tratamento. As participantes do estudo eram acompanhadas por uma equipe multidisciplinar, incluindo encaminhamento à psicoterapia. Cinco pacientes, em conjunto com seus familiares, desejavam tratamento imediato pelo desejo de iniciar atividade sexual, além da vontade de ter uma anatomia normal do trato genital.

As técnicas de dilatação vaginal foram ofertadas inicialmente. Em todos os cinco casos, a paciente ou responsável legal recusou a primeira opção e escolheu a correção cirúrgica,

mesmo com a explicação adequada da eficácia e riscos reduzidos da dilatação. Tradicionalmente, no serviço de ginecologia da MEAC, a técnica de neovaginoplastia de Abbe-McIndoe era realizada em pacientes com SMRKH (BRUNO *et al.*, 2017). Tanto o método padrão com enxerto de pele autólogo e o inovador com PTN foram oferecidos como opções de tratamento cirúrgico, porém todas as cinco pacientes decidiram pela neovaginoplastia modificada com PTN.

3.4 Comitê de Ética

O Comitê de Ética em Pesquisa da MEAC aprovou o estudo e encontra-se registrado na Plataforma Brasil sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética número 74027917.3.0000.5050 (ANEXO A). Após apropriado aconselhamento sobre os métodos e apresentação da natureza do material utilizado, bem como possíveis complicações inerentes à cirurgia e ao biomaterial, foi obtido o aval para participação no estudo por escrito e verbal de cada paciente e representante legal (caso de duas pacientes menores de idade), através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

3.5 Pele de tilápia do Nilo

A patente da PTN está registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob o número BR1020150214359. O biomaterial encontra-se na fase final de aprovação na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As amostras de pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foram recebidas de criadouros de peixes no açude Castanhão, localizado na cidade de Jaguaribara, Ceará. A pele é separada da musculatura do peixe e retirada as escamas da mesma. São cortes de pele ao redor de 10,0 por 5,0 cm. Após o processo de separação, a PTN é lavada em solução salina a 0,9%, sendo a seguir colocada em recipiente estéril com gluconato de clorexidina a 2% por sessenta minutos. Então, a pele é removida da solução anterior, lavada com solução salina a 0,9% estéril e colocada em um recipiente estéril e hermeticamente fechado com 75% de glicerol e 25% de solução salina, onde permanece por mais uma hora. É, novamente, lavada com solução salina a 0,9% estéril e colocada em uma máquina estéril e hermeticamente fechada dessa vez com solução de glicerol a 100%, sendo massageada por cinco minutos. Depois, ainda no glicerol a 100%, a pele é mantida por três horas em banho-maria em uma centrífuga a 37°C e 15 rpm.

A pele é embalada em envelopes de plástico com selagem dupla e armazenada a 4°C. O último passo do processo de esterilização da PTN é a radiação ionizante com raios gama, utilizando um Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 a 30 kGy (EDMONDS *et al.*, 2012). Ao final de todas as etapas, testes microbiológicos para bactérias e fungos são realizados em cada amostra. A PTN pode ser armazenada sob refrigeração entre 6 a 10°C por até dois anos.

3.6 Internação hospitalar

3.6.1 Pré-operatório

As cinco pacientes foram internadas um dia antes da cirurgia com revisão dos exames pré-operatórios e confirmação mais uma vez da vontade pelo tratamento cirúrgico e participação no estudo. Sempre foi oferecida a opção de fazer a cirurgia com o método padrão da neovaginoplastia, utilizando enxertos de pele autólogos.

No pré-operatório imediato, a preparação da PTN e do molde que será utilizado no procedimento deve ser realizada, já no ambiente do centro cirúrgico. Um molde de acrílico estéril adaptado ao procedimento, com medidas de 10 centímetros de comprimento por 3,5 cm de diâmetro, além de fenestrado para drenagem de secreções acumuladas na vagina, é necessário. A pele de tilápia é bem lavada com soro fisiológico a 0,9% para retirar o excesso de glicerol de forma estéril por vinte minutos. Então, a pele é envolvida no molde de acrílico, fixada com pontos cirúrgicos separados e fio de sutura de poliglactina multifilamentado 3.0 (Vycril 3.0).

3.6.2 Intraoperatório

A técnica cirúrgica utilizada é a de Abbe-McIndoe, modificando-se apenas o enxerto usado na neovaginoplastia. O procedimento cirúrgico é realizado apenas por via vaginal e todas as etapas são feitas em condições assépticas. As pacientes foram submetidas a uma raquianestesia e ficaram em posição litotômica. Depois do cateterismo vesical de demora, o intróito vaginal é identificado e uma incisão transversal mediana de três centímetros é feita. O espaço entre a bexiga e o reto é dissecado de forma romba até o peritônio parietal, evitando a entrada na cavidade abdominal. Muitas vezes essa dissecação romba é feita até de uma maneira digitiforme, visto que se trata de um tecido conjuntivo frouxo de fácil abertura e esse tipo de dissecação costuma sangrar menos. Logo após, um espéculo médio é introduzido e aberto de

forma a ampliar o diâmetro do canal vaginal. O exame especular serve também para revisar o recém criado canal, com a realização de uma adequada hemostasia com o auxílio de um bisturi elétrico para evitar sangramentos e possíveis hematomas que possam dificultar a aderência da PTN. A dimensão da neovagina deve ser capaz de, facilmente, acomodar o comprimento e a largura de um espéculo médio aberto. Subsequentemente, o molde de acrílico recoberto com a PTN é inserido no canal vaginal e fixado por quatro pontos cirúrgicos com fio de sutura de poliglactina multifilamentado 1.0 (Vycril 1.0) nos grandes lábios para evitar a expulsão do molde. A face interna da pele de tilápia deve ficar em contato com a parede da neovagina (Figura 4). Um vídeo tutorial com o passo a passo do procedimento cirúrgico foi publicado por essa equipe de pesquisadores (DIAS *et al.*, 2019).

Figura 4 – Molde de acrílico vaginal antes e após a cirurgia de neovaginoplastia



Fonte: elaborado pela autora.

3.6.3 Pós-operatório

No pós-operatório imediato, as pacientes permanecem internadas com o molde de acrílico por nove dias e devem ficar completamente restritas ao leito. Essa conduta já era realizada nas cirurgias anteriores do serviço da MEAC com o procedimento de MacIndoe usando pele de enxerto autólogo (BRUNO *et al.*, 2017). Fisioterapia motora é indicada a todas como forma de prevenção de fenômenos tromboembólicos. Mantém-se sonda vesical de demora para evitar retenção urinária. É comum com o passar dos dias, pela pressão constante do molde na região, ocorrer edema vulvar e uma boa analgesia com sintomáticos, tipo dipirona ou anti-inflamatórios não esteroidais, é prescrita. Metronidazol oral também foi mantido por

sete dias, pois trata-se de uma cirurgia potencialmente contaminada com extensa área cruenta e uso de próteses. Lavagens diárias com soro fisiológico a 0,9% pelo orifício de drenagem do molde de acrílico são realizadas pela equipe de enfermagem.

Inicialmente, a técnica cirúrgica descrita nesse trabalho consistia em retirar a PTN junto com o molde e as duas primeiras pacientes do estudo foram conduzidas dessa forma. No entanto, observou-se sangramento vaginal em grande quantidade após a retirada da pele. Essas duas pacientes (P1 e P2) não necessitaram de transfusões sanguíneas, porém tiveram que, novamente, ser levadas ao centro cirúrgico para uma revisão da hemostasia com cauterização de vários pontos sangrantes. Posteriormente, com estudos histológicos da biópsia da neovagina de sete dias e da pele retirada, observou-se uma neovascularização intensa do novo canal vaginal e ausência de processos de reação de corpo estranho na face interna da pele de tilápia. Isso corroborou os trabalhos que indicaram a baixa antigenicidade da PTN (LIMA JR *et al.*, 2019). Diante do exposto, foi optado por retirar apenas o molde e deixar a PTN na neovagina das próximas pacientes do estudo (P3, P4 e P5). Os dois primeiros casos acabaram sendo excluídos do estudo de acompanhamento, visto terem uma realidade diferente das demais pacientes em que deixamos a PTN, ficando um total de três casos para seguimento.

Por ocasião da alta hospitalar, logo após a retirada do molde de acrílico, as pacientes são orientadas a usarem um molde de silicone envolvido por um condom de forma contínua por trinta dias, retirando apenas para higiene corporal. Depois desse período, o molde vaginal deve ser mantido em torno de oito horas por dia, de preferência quando a paciente estiver dormindo, até iniciar a atividade sexual. Após início da vida sexual, o molde deve ser usado nos dias que a paciente não tiver relação sexual. Se a frequência do coito for igual ou superior a duas vezes por semana, poderá ficar sem usar o molde (DABAGHI *et al.*, 2019). Essas instruções já constam no TCLE (APÊNDICE A) e, mesmo ainda no acompanhamento ambulatorial inicial, são explicadas às participantes. O molde de silicone é adquirido pela própria paciente e as medidas mínimas exigidas são de 9,0 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro. Também são aconselhadas a terem relação sexual apenas após a liberação pela equipe médica.

3.7 Avaliação anatômica

O acompanhamento ambulatorial pós-operatório foi agendado para 30, 60, 90 e 180 dias após a cirurgia. Em cada consulta, foram avaliadas as queixas das pacientes, uso correto do molde, bem como o exame ginecológico com medição do comprimento vaginal, através de uma espátula previamente demarcada em centímetros, e observação do aspecto macroscópico

da neovagina, como a presença de granulomas ou sinais inflamatórios. As pacientes foram sempre questionadas quanto a presença de sangramentos ou secreções, dificuldades para inserir o molde e sobre atividade sexual. O sucesso anatômico foi definido como a geração de uma neovagina de pelo menos 6,0 cm de comprimento e que permitisse a introdução fácil de um espéculo médio aberto em seis meses após a cirurgia (DING *et al.*, 2015).

3.8 Análise histológica

Para a análise histopatológica, uma biópsia da parede vaginal lateral foi realizada, utilizando a pinça cirúrgica de Eppendorf esterilizada, com 90 e 180 dias após a cirurgia em cada uma das pacientes. Foi padronizado, como local das biópsias, o terço superior da parede vaginal lateral direita. As amostras eram divididas em dois grupos, dependendo do número de dias após a cirurgia: grupos do dia 90 e do dia 180. Os fragmentos de tecidos foram imersos em formol tamponado a 10% por 48 horas. Em seguida, foram lavados em água corrente e analisados macroscopicamente quanto a mudanças de forma, cor e consistência. Após passar pelo processador automatizado de tecidos Leica, foram imersos em banhos de parafina a 56°C, resultando na formação de blocos de parafina em temperatura ambiente. Por fim, os fragmentos foram seccionados em série até a espessura de 4 mm e submetidos à coloração padrão de hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e analisadas em microscópio óptico padrão.

3.9 Análises imuno-histoquímicas

As análises imuno-histoquímicas também foram realizadas com 90 e 180 dias da cirurgia, aproveitando-se o material das biópsias realizadas. Usou-se um método padrão de estreptavidina-biotina-peroxidase em cortes de tecido de 4,0 mm de espessura, obtidos dos blocos de parafina e montados em lâminas microscópicas silanizadas. Anticorpos anti-CK (1:200, Dako, Carpinteria, CA) e anti-receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (1:200, Dako) foram usados em um sistema de coloração automática (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), e a recuperação do epítipo induzida pelo calor foi realizada usando uma solução EZ Prep (Ventana) por trinta minutos. A coloração manual foi utilizada para anti-FGF (1:1250, Abcam) e sua recuperação antigênica obteve-se utilizando citrato (Dynamics), 0,01 M (pH 6,0) no calor por 45 minutos. As imunorreações foram detectadas usando o sistema XT ultraView diaminobenzidina v.3 (Ventana) para anti-CK (Dako) e anti-

EGFR (Dako) e com cromogênio diaminobenzidina por cinco minutos para o anti-FGF (Abcam). Todas as secções foram subseqüentemente coradas com hematoxilina de Harris por trinta segundos. Amostras de controle positivas extrínsecas e intrínsecas foram utilizadas em cada ensaio. Os controles negativos ocorreram com a supressão dos anticorpos primários em cada reação.

3.10 Avaliação funcional

A atividade sexual foi permitida três meses após a cirurgia. A funcionalidade da neovagina foi avaliada pelo Índice de Satisfação Sexual Feminino (FSFI), com questionários validados para o português (THIEL *et al.*, 2008). Eles foram aplicados após quatro semanas do início da vida sexual. O instrumento contém dezenove questões com respostas de múltipla escolha e associadas a seis domínios: desejo, excitação, lubrificação, orgasmo, satisfação com a vida sexual e dor durante ou após a relação (ANEXO B). As participantes devem responder o instrumento, escolhendo a opção que melhor descreve sua situação nas últimas quatro semanas. Uma pontuação abaixo de 26 no FSFI, sugere a presença de disfunção sexual (WIEGEL; MESTON; ROSEN, 2005).

Os escores dos domínios e a escala geral de escores do FSFI são calculados conforme demonstrado abaixo (Figura 5). Para escores dos domínios, somam-se os escores individuais e multiplica-se pelo fator correspondente. Para obter o escore total da escala soma-se os escores para cada domínio. Deve ser observado que dentro dos domínios, um escore zero indica que a paciente relatou não ter tido atividade sexual nas últimas quatro semanas (HENTSCHEL *et al.*, 2007).

Figura 5 – Escores do FSFI, validado para o português

| Tabela 1 – Escores dos domínios do FSFI | | | | | |
|---|-------------|-------------------|-------|---------------|---------------|
| Domínio | Questão | Varição do escore | Fator | Escore mínimo | Escore máximo |
| Desejo | 1, 2 | 1 - 5 | 0,6 | 1,2 | 6,0 |
| Excitação | 3, 4, 5, 6 | 0 - 5 | 0,3 | 0 | 6,0 |
| Lubrificação | 7, 8, 9, 10 | 0 - 5 | 0,3 | 0 | 6,0 |
| Orgasmo | 11, 12, 13 | 1 - 5 | 0,4 | 0 | 6,0 |
| Satisfação | 14, 15, 16 | 0 (ou 1) - 5* | 0,4 | 0,8 | 6,0 |
| Dor | 17, 18, 19 | 0 - 5 | 0,4 | 0 | 6,0 |
| Escore total | | | | 2,0 | 36,0 |

*Variação para o item 14 = 0-5; variação para os itens 15 e 16 = 1-5.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados clínicos

As cinco pacientes iniciais tinham um quadro de amenorreia primária com desenvolvimento normal dos caracteres sexuais secundários. Algumas características das pacientes podem ser vistas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características individuais das pacientes submetidas à vaginoplastia com pele de tilápia do Nilo

| Pacientes | Idade na cirurgia (anos) | Cariótipo | Anomalias associadas | Estado hormonal | Estágio de Tanner | Comprimento vaginal prévio (cm) |
|-----------|--------------------------|-----------|--------------------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|
| P1 | 23 | 46, XX | Rim pélvico | Normal | M5P5 | 2 |
| P2 | 21 | Não fez | Rim direito de volume reduzido | Normal | M4P5 | 0 |
| P3 | 16 | 46, XX | Agenesia renal à direita | Normal | M4P5 | 0 |
| P4 | 17 | 46, XX | Nenhuma | Normal | M4P5 | 0 |
| P5 | 22 | 46, XX | Nenhuma | Normal | M5P5 | 1 |

Fonte: elaborado pela autora.

Em todas as pacientes estudadas, a cirurgia obteve o objetivo final de criar uma vagina funcional, não havendo necessidade de refazer o procedimento pela técnica antiga. No entanto, as duas pacientes iniciais (P1 e P2) apresentaram algumas complicações no pós-operatório. A primeira proposta de cirurgia consistia em deixar a paciente com o molde por nove dias e retirar o molde juntamente com a pele de tilápia. A pele já se encontrava incorporada ao novo canal vaginal e retirando-a, complicações como sangramentos volumosos ocorreram. Houve queda de hemoglobina, porém sem necessidade de transfusões sanguíneas. As 2

pacientes voltaram ao centro cirúrgico para cauterização com bisturi elétrico de focos de sangramentos, em prováveis vasos neoformados. Também o esquema de antibióticos foi ampliado nessas pacientes por terem apresentado episódios de febre (temperatura maior ou igual a 37,8°C). No entanto, depois de resolvido o sangramento e possível infecção, receberam alta e tiveram uma boa evolução no acompanhamento ambulatorial, ainda que de uma forma mais lenta que as pacientes que permaneceram com a PTN. Credita-se a isso, provavelmente, a uma incorporação parcial de fatores presentes na PTN que não foram completamente removidos por ocasião da retirada do molde.

Depois desses episódios e conforme já descrito na sessão de Metodologia, foi decidido pela não retirada da PTN. E, de fato, ao retirar-se o molde sem a pele após 9 dias da cirurgia, até mesmo o molde saía com mais facilidade. A pele já se encontrava aderida e, de acordo com o relato das 3 pacientes seguintes (P3, P4 e P5), apenas pequenos pedaços de pele que estavam na região mais distal da vagina eram eliminados aos poucos ao longo dos primeiros 15 dias. Por esse estudo tratar-se da descrição de uma nova técnica cirúrgica que será com a permanência da PTN, as pacientes P1 e P2 foram excluídas.

Nessas três últimas pacientes do estudo (P3, P4 e P5), a cirurgia foi funcionalmente satisfatória e sem complicações pós-operatórias. A duração do procedimento variou entre 20 a 80 minutos e o comprimento da neovagina após a cirurgia foi de 9 a 10 cm. Observou-se uma certa discrepância no tempo cirúrgico por conta que, inicialmente, a preparação do molde foi incluída no total de tempo. No entanto, o preparo do molde é uma condição pré-cirúrgica e não há necessidade de anestesia ou incisão cirúrgica nesse momento. Então, a partir da paciente P4, o tempo de cirurgia foi calculado do momento da incisão da mucosa vaginal até a finalização da sutura dos grandes lábios.

O retorno ambulatorial com a avaliação dos resultados pós-operatórios foi realizado em 30, 60, 90 e 180 dias após a cirurgia em todas as pacientes e revelou, ao longo das visitas, uma neovagina bem formada em cada paciente (Figura 6, Figura 7 e Figura 8), com eixo vaginal semelhante a uma vagina adulta normal e um aspecto macroscópico de uma mucosa vaginal lisa, sem granulomas importantes ou secreções anormais. O espéculo médio foi inserido sem dificuldades em todas as três pacientes até a visita de 60 dias. A partir da visita de 90 dias, não foi mais possível introduzir o espéculo inteiramente no comprimento vaginal da paciente P3.

Figura 6 – Paciente P5 com 30 dias da cirurgia



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 7 – Paciente P3 com 60 dias da cirurgia



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 8 – Paciente P4 com 180 dias da cirurgia



Fonte: elaborada pela autora.

As pacientes foram liberadas para atividade sexual com 90 dias da cirurgia, porém apenas a paciente P5 teve relação sexual (dez meses após a cirurgia) até o presente momento. O questionário FSFI foi preenchido por essa paciente quatro semanas após o início da vida sexual, resultando em uma pontuação de 28,8, o que é consistente com uma qualidade de vida sexual satisfatória (WIEGEL; MESTON; ROSEN, 2005). A perda de pontos em relação à pontuação máxima foi, predominantemente, associada aos pontos que mostram dificuldades em manter a lubrificação vaginal. Os resultados cirúrgicos e os parâmetros avaliados durante os retornos ambulatoriais são mostrados na Quadro 2.

Quadro 2 – Resultados da avaliação pós-operatória das pacientes submetidas à neovaginoplastia com PTN (pacientes que permaneceram com a pele após a retirada do molde de acrílico)

| Pacientes | P3 | P4 | P5 |
|--|---------------------|---------------------|------|
| Tempo de cirurgia (minutos) | 80 | 35 | 20 |
| Dias de hospitalização | 10 | 10 | 10 |
| Complicações (sangramentos e/ou infecções) | Não | Não | Não |
| Comprimento vaginal após a cirurgia (cm) | 10 | 10 | 9 |
| Comprimento vaginal após 180 dias da cirurgia (cm) | 4 | 7,5 | 9 |
| Uso apropriado do molde no acompanhamento ambulatorial | Não | Sim | Sim |
| Tempo da primeira relação sexual após a cirurgia (meses) | Nega relação sexual | Nega relação sexual | 10 |
| Pontuação do FSFI | Nega relação sexual | Nega relação sexual | 28,8 |

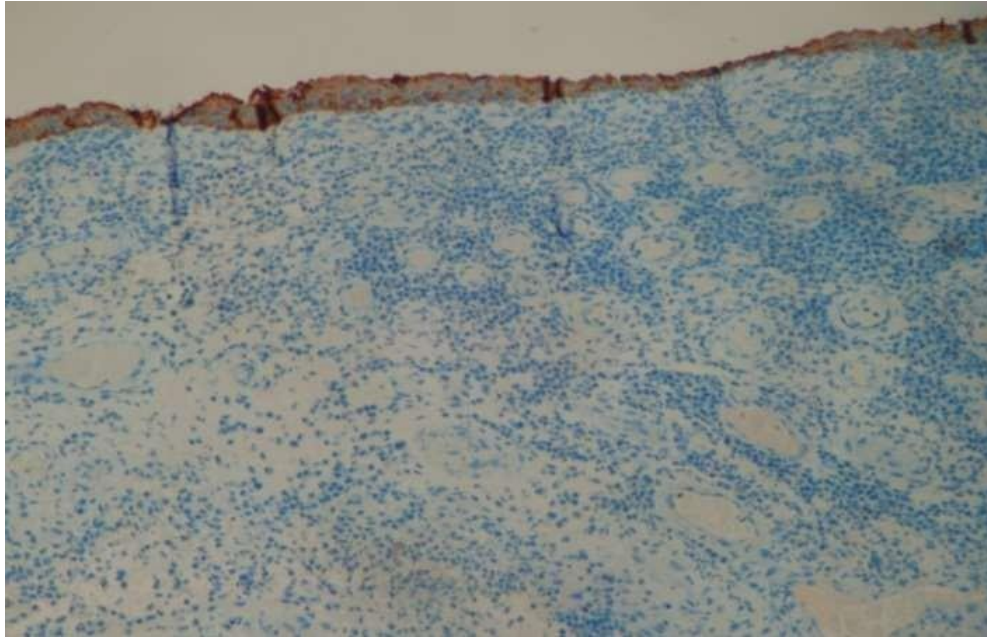
Fonte: elaborado pela autora.

4.2 Resultados histológicos e imuno-histoquímicos

A análise microscópica e imuno-histoquímica dos fragmentos de parede vaginal lateral no dia 90 revelou tecido conjuntivo revestido por epitélio escamoso estratificado com cerca de cinco camadas de células e uma expressão anti-CK mais fina (Figura 9). Já nas amostras do dia 180, a análise microscópica revelou uma camada epitelial já bem hiperplásica (Figura 10) e, sob esse epitélio, um tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear, no lugar da predominância de neutrófilos (Figura 11A e 11B). Presença de acantose com retificação das células foram vistas no epitélio, com um tecido conjuntivo denso com sangue e, ocasionalmente, presença de alguns vasos ectásicos. Além disso, infiltrados inflamatórios com neutrófilos granulócitos polimorfonucleares foram detectados. A imuno-histoquímica mostrou, no epitélio de ambos os grupos, uma intensa reatividade ao grupo de anticorpos anti-CK (citoqueratinas AE1 e AE3) (Figura 9, 10 e 11C). No entanto, a expressão do anticorpo EGFR foi visualizada apenas no grupo com 180 dias de uma forma discreta (Figura

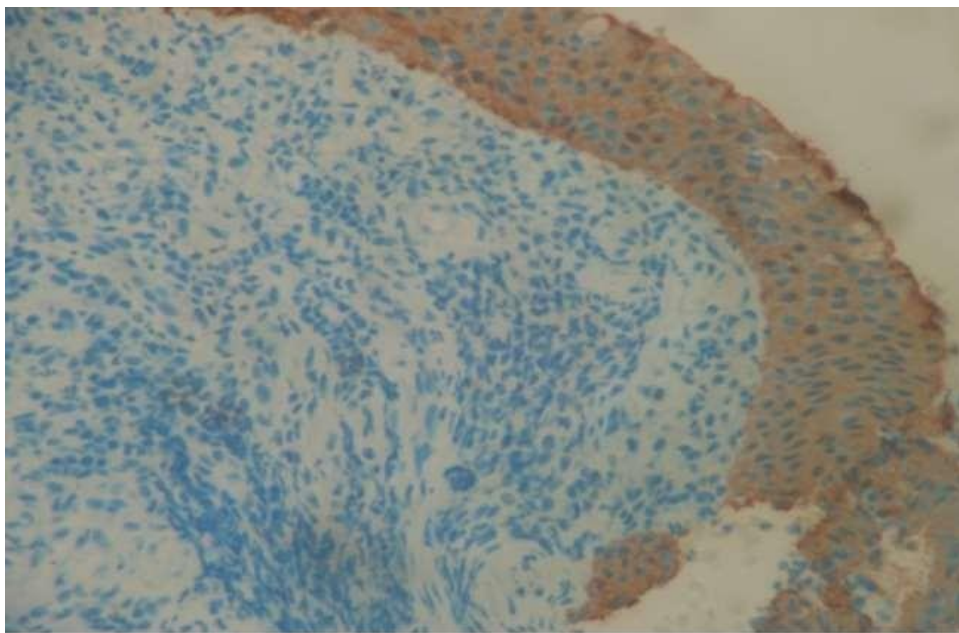
11D). Uma imunorreatividade difusa com o anticorpo anti-FGF foi observada em células epiteliais e células do tecido conjuntivo de ambos os grupos (Figura 11E e 11F).

Figura 9 – Foto de corte histológico de neovagina após 90 dias com reação imunohistoquímica anti-CK



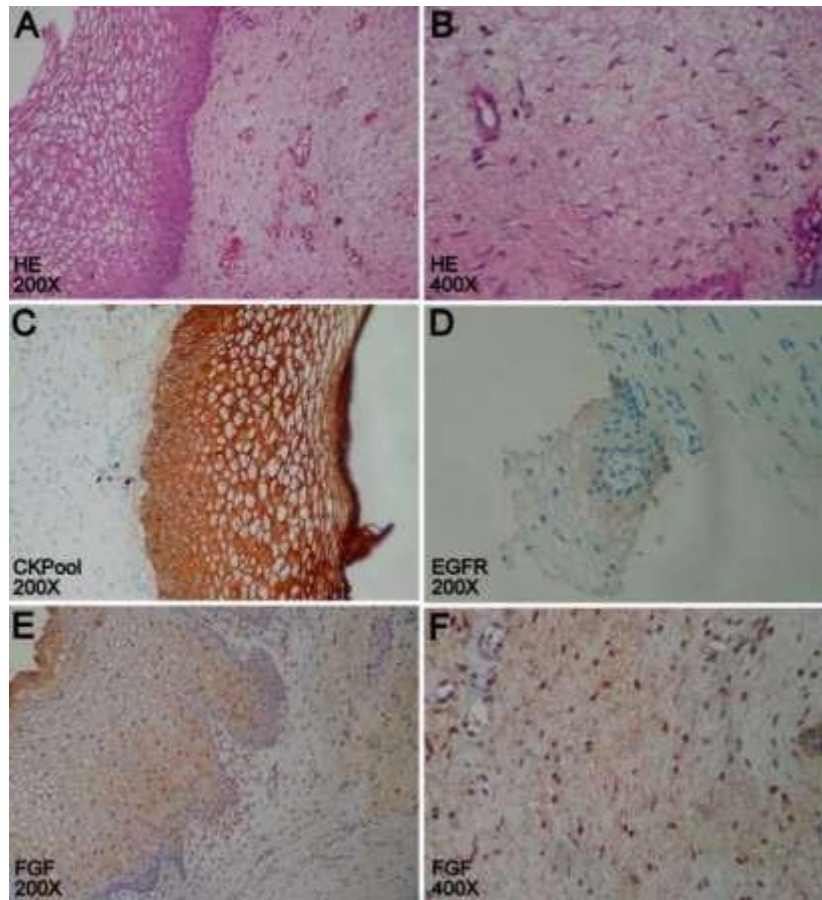
Fonte: Laboratório de Anatomopatologia do NPDN. ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes.

Figura 10 – Foto de corte histológico de neovagina após 180 dias com reação imunohistoquímica anti-CK



Fonte: Laboratório de Anatomopatologia do NPDN. ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes.

Figura 11 – Fotos de cortes histológicos das paredes das neovaginas após 6 meses da cirurgia



Fonte: Laboratório de Anatomopatologia do NPDN. ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes.

Legenda: (A) Epitélio hiperplásico com presença de acantose. (B) Discreto infiltrado inflamatório mononuclear no tecido conjuntivo. (C) Intensa expressão de anti-CK no epitélio. (D) Discreta expressão do EGFR no epitélio. (E) Expressão difusa do anti-FGF no epitélio. (F) Expressão difusa do anti-FGF no tecido conjuntivo.

5 DISCUSSÃO

A técnica cirúrgica de neovaginoplastia com PTN revelou bons resultados anatômicos e funcionais. Trata-se de material mais acessível e de baixo custo econômico, que pode substituir os enxertos de pele, bem como outros materiais. No Ceará, região desse estudo, a tilápia do Nilo é facilmente encontrada nos açudes, e, mesmo com o preparo para descontaminação e irradiação, não torna o processo demasiado dispendioso, tornando a PTN mais viável do que outros materiais sintéticos. O papel da PTN parece ser o de um arcabouço que estimula a proliferação de um novo epitélio vaginal em pacientes com SMRKH. As pacientes relatadas nesse estudo são os cinco primeiros casos em que esse material foi usado com sucesso. A técnica sofreu uma pequena modificação ao longo do estudo com a manutenção da PTN na neovagina e essa discussão será focada nas três últimas pacientes do estudo (P3, P4 e P5).

A PTN atua não apenas como uma camada protetora, mas também como um verdadeiro arcabouço, permitindo a migração de células que irão contribuir para o processo de metaplasia e epitelização. Embora ainda não exista um completo entendimento como tudo ocorre, a hipótese é de que células com potencial pluripotente presentes no espaço dissecado entre a bexiga e o reto contribuam na diferenciação do tecido. O trauma físico causado pelo uso do molde pode estar relacionado à expressão gênica celular e modificação dos fatores de transcrição (DORNELAS *et al.*, 2012). Outra possibilidade é um crescimento progressivo do tecido da mucosa do vestíbulo vaginal (PANICI *et al.*, 2011). Além disso, em estudo recente, as nanofibras de colágeno de tilápia acelerou a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, promovendo a adesão, proliferação e diferenciação celular (ZHOU *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, têm-se utilizado vários materiais inertes na neovaginoplastia, como a pele artificial, o fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante e celulose oxidada regenerada. A pele artificial e a celulose oxidada regenerada são materiais ricos em colágeno, sendo capazes de atuarem como arcabouços para a proliferação de células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (PANICI *et al.*, 2011). O colágeno constitui uma grande porção da matriz extracelular e afeta as funções celulares, como diferenciação, migração e síntese de proteínas (WU *et al.*, 2017). O fator de crescimento de fibroblastos básico recombinante estimula a proliferação e diferenciação dos tecidos neuroectodérmicos e mesodérmicos, células endoteliais e fibroblastos, exercendo papel importante na regeneração de tecido de granulação (PANICI *et al.*, 2011). A PTN contém extensas camadas de colágeno e, nas amostras de biópsias

das neovaginas com 180 dias, observou-se atividade difusa do FGF, tanto no epitélio, como no tecido conjuntivo.

A neovagina com PTN é semelhante a uma vagina adulta normal, com a mesma elasticidade, capacidade e eixo anatômico. Há uma relação positiva significativa entre a satisfação sexual conjugal nas mulheres e um maior comprimento vaginal. A média de comprimento vaginal com a dilatação não cirúrgica varia de 7 a 8 cm (DABAGHI *et al.*, 2019). Com exceção da neovaginoplastia com segmento intestinal, que pode chegar a comprimentos vaginais de 15 a 20 cm, as outras técnicas estão associadas a neovaginas entre 6 e 10 cm (DABAGHI *et al.*, 2019; PANICI *et al.*, 2011).

As pacientes P4 e P5 seguiram as recomendações sobre o uso do molde de silicone no pós-operatório e, conseqüentemente, mantiveram um comprimento vaginal de 7,5 e 9,0 cm, respectivamente, em 180 dias de acompanhamento. Em contraste, seis meses após o procedimento, a paciente P3 tinha um comprimento vaginal de apenas 4,0 cm. Credita-se esse achado ao uso inadequado do molde, relatado pela própria paciente, bem como a falta de interesse em manter atividade sexual com penetração. Ao longo do seguimento ambulatorial, após a cirurgia, observou-se um conflito entre a paciente P3 e sua família. Tratava-se da paciente mais jovem do estudo e ela acabou relatando ter orientação homossexual e que a família a havia pressionado a fazer logo a cirurgia para tentar influenciar na sua orientação sexual. Por sentir dor ao colocar o molde e não ter interesse de manter um canal vaginal longo, deixou de usar o molde por completo após 60 dias da cirurgia.

A idade dessa paciente e a imaturidade pode ter atuado como possíveis fatores contribuintes adicionais (HERLIN *et al.*, 2018), apesar da paciente ter passado por acompanhamento e avaliação psicológica no pré-operatório. Estudos mostram que a qualidade da relação entre mãe e filha merece atenção especial nas pacientes com SMRKH, onde as mães podem ser percebidas como excessivamente envolvidas e intrusivas durante o tratamento (FACCHIN *et al.*, 2021). No entanto, caso haja vontade por parte dessa paciente de uma vagina mais longa no futuro, há relatos na literatura da criação de um canal vaginal adequado com repetidas relações sexuais e a neovagina pode ser alongada adicionalmente em 2,0 a 3,0 cm durante a excitação sexual (EDMONDS *et al.*, 2012; PASTOR *et al.*, 2017; MÖBUS *et al.*, 1996).

As biópsias das paredes das neovaginas mostraram que, macroscopicamente e microscopicamente, esse neopitélio é indistinguível ao epitélio de uma vagina normal. A expressão de marcadores de proteínas também é significativamente similar. Várias citoqueratinas são encontradas primariamente em tecidos estratificados, ou em tecidos com

potencial de estratificação, sugerindo que a presença delas estão de alguma forma relacionadas ao processo de estratificação (BOSCH *et al.*, 1988; ALMEIDA JR, 2004). A mucosa da neovagina criada não apenas exhibe histologicamente um epitélio escamoso estratificado, mas também tem características comparáveis às daquelas da mucosa vaginal normal no padrão de expressão de citoqueratinas. Após 6 meses da cirurgia, a imunorreatividade para citoqueratinas foi detectada em mais camadas celulares quando comparada com os resultados de 3 meses, revelando uma progressão na expressão da citoqueratina.

O FGF é um dos fatores de crescimento envolvidos na neovascularização, cicatrização de feridas e embriogênese. Estudos recentes têm sugerido um papel significativo do FGF na proliferação e diferenciação do epitélio vaginal (NAGATA *et al.*, 2017; NAKAJIMA *et al.*, 2011) e spray contendo fator de crescimento de fibroblasto recombinante tem sido utilizado após uma vaginoplastia para acelerar a epitelização da neovagina (NOGUCHI *et al.*, 2004). Os resultados de imuno-histoquímica desse estudo mostraram uma alta expressão do FGF tanto no tecido epitelial, como no tecido conjuntivo das neovaginas, apoiando um provável papel da PTN na regulação positiva do FGF a longo prazo.

O fator de crescimento epitelial (EGF) é implicado no desenvolvimento uterino e vaginal, como mediadores da ação estrogênica. Por meio da ligação ao EFGR, o EGF promove a queratinização e crescimento vaginal, funcionando como um fator de crescimento autócrino e parácrino para queratinócitos. A presença de EGFR também é requerida para o desenvolvimento do estroma vaginal (HOM *et al.*, 1998; NELSON *et al.*, 1991). Os resultados desse estudo mostraram apenas uma positividade focal para EGFR na biópsia de 6 meses da cirurgia, o que sugere uma expressão tardia do mesmo após o procedimento.

O FSFI é a ferramenta mais utilizada para avaliar satisfação sexual nas cirurgias de neovaginoplastia. Em revisão sistemática sobre a satisfação sexual em pacientes com SMRKH após tratamento cirúrgico ou não cirúrgico, os escores do FSFI variaram entre 25,6 e 30,4, comparável ao resultado da paciente desse estudo com pontuação de 28,8. Até mesmo na técnica de dilatação vaginal, a pontuação relativa à lubrificação vaginal diminuiu após um ano (DABAGHI *et al.*, 2019). A técnica cirúrgica com rotação de segmento do sigmóide fornece um revestimento vaginal com lubrificação natural. A produção do muco, entretanto, pode levar a uma descarga excessiva e a mucosa do cólon é mais vulnerável às infecções sexualmente transmissíveis (GEORGAS *et al.*, 2018).

Mesmo que a lubrificação na neovagina com PTN seja reduzida, fato ainda não comprovado, nenhuma outra diferença significativa funcional ou anatômica foi encontrada. A lubrificação vaginal adequada pode ser inversamente proporcional ao tempo da cirurgia,

resultante da progressiva epitelização da neovagina (CALLENS *et al.*, 2014). Portanto, esse problema pode diminuir com o passar do tempo.

A PTN é uma candidata para agir como um arcabouço clínico na epitelização da neovagina. Isto permite a realização de uma cirurgia, exclusivamente, por acesso vaginal em apenas um tempo cirúrgico, sem auxílio de laparoscopia ou laparotomia, ou qualquer outra tecnologia de dilatação vaginal de alto custo, como a descrita por Giuseppe Vecchiatti (CEZAR *et al.*, 2014). O tempo de hospitalização das pacientes desse estudo foi de dez dias. No entanto, em estudo de revisão de técnicas cirúrgicas de Abbe-McIndoe modificada esse tempo variou muito, chegando até quatorze dias com membranas amnióticas e enxertos autólogos de mucosa oral. Nos enxertos de pele autólogos, os dias de hospitalização foram aproximadamente de dez dias. Os estudos descritos com menor tempo de internação foram aqueles com a celulose oxidada regenerada, variando entre dois a oito dias (PANACI *et al.*, 2011).

Mesmo assim, limitações na análise dos resultados dessa nova técnica cirúrgica com a PTN existem, pois foram apenas três pacientes estudadas e um curto tempo de acompanhamento. Faz-se necessário uma avaliação a longo prazo para a revisão adequada da neovaginoplastia com a PTN. Um estudo em andamento propõe avaliar o comprimento vaginal com um, dois e três anos da cirurgia, bem como documentar a necessidade ou não do uso de moldes a longo prazo.

Existem perspectivas ainda de realização de um ensaio clínico multicêntrico randomizado, comparando essa nova técnica com técnicas já estabelecidas. Embora a SMRKH seja uma doença rara, a MEAC é um centro de referência e outros centros pelo país já foram contactados. Dessa forma, espera-se comprovar, ou não, a eficácia da PTN na cirurgia de neovaginoplastia em relação aos resultados anatômicos e funcionais, satisfação da paciente, segurança do tratamento e custo-benefício da técnica.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo descritivo, a neovaginoplastia usando pele de tilápia do Nilo ofereceu a três pacientes uma anatômica e funcional neovagina através de uma técnica cirúrgica simples, segura, de fácil reprodução, rápida e minimamente invasiva. Quando o uso correto do molde de silicone no pós-operatório foi realizado, comprimentos vaginais esperados para a técnica de Abbe-McIndoe modificada foram mantidos. As análises histológicas e imuno-histoquímicas revelaram a presença de epitélio escamoso estratificado com uma alta expressão de citoqueratinas e FGF e uma fraca expressão de EFGR, correspondendo às características de um tecido vaginal adulto saudável. Mais estudos devem ser conduzidos para demonstrar que a PTN é uma opção relevante no arsenal terapêutico da SMRKH, melhorando a qualidade de vida das pacientes e produzindo um significativo impacto financeiro e social para o sistema de saúde.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JÚNIOR, H. L. Citoqueratinas. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 1-8, abr. 2004.
- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilapia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 203-210, mar. 2015.
- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell Tissue Bank**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 373-382, set. 2018.
- BOMBARD, D. S.; MOUSA, S. A. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: complications, diagnosis and possible treatment options: a review. **Gynecol Endocrinol**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 618-623, set. 2014.
- BOSCH, F. X. *et al.* Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. **J Cell Biol.**, Mainz, v. 106, n. 5, p. 1635-1648, maio 1988.
- BRUNO, Z. V. *et al.* Vaginoplasty using inguinal flap in a tertiary care center. **Internacional Journal of Research Studies in Biosciences**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 29-33, fev. 2017.
- CALLENS, N. *et al.* An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. **Hum Reprod Update**, Ghent, v. 20, n. 9, p. 775-801, set. 2014.
- CEN, L. *et al.* Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatr Res.**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 492-496, maio 2008.
- CEZAR, C. *et al.* Efficacy risks of the minimal-invasive plastic and reconstructive neovagina Vecchietti technique in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW**, Kerala, v. 3, n. 12, p. 1-8, dez. 2014.
- CHEIKHELARD, A. *et al.* Surgery is not superior to dilation for the management of vaginal agenesis in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a multicenter comparative observational study in 131 patients. **Am J Obstet Gynecol.**, Paris, v. 219, n. 9, p. 281-289, set. 2018.
- COSTA, B. A. *et al.* Use of tilapia skin as a xenograft for pediatric burn treatment: a case report. **J Burn Care Res.**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 714-717, ago. 2019.
- DABAGHI, S.; ZANDI, M.; ILKHANI, M. Sexual satisfaction in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome after surgical and non-surgical techniques: a systematic review. **Int Urogynecol J.**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 353-362, mar. 2019.
- DIAS, M. T. P. M. *et al.* Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertil Steril.**, [s. l.], v. 112, n. 7, p. 174-176, jul. 2019.

DING, J. X. *et al.* Sexual and functional outcomes of vaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft or laparoscopic peritoneal vaginoplasty: a comparative study. **Hum Reprod.**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 581-589, mar. 2015.

DORNELAS, J. *et al.* Vaginoplasty with oxidized cellulose: anatomical, functional and histological evaluation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, [s. l.], v. 163, n. 8, p. 204-209, ago. 2012.

EDMONDS, D. K. *et al.* Mayer-RokitanskyKüster-Hauser syndrome: a review of 245 consecutive cases managed by a multidisciplinary approach with vaginal dilators. **Fertil Steril.**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 686-690, mar. 2012.

FACCHIN, F. *et al.* Psychological impact and health-related quality-of-life outcomes of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a systematic review and narrative synthesis. **J Health Psychol.**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 26-39, jan. 2021.

GEORGAS, K. *et al.* Bowel vaginoplasty: a systematic review. **J Plast Surg Hand Surg.**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 265-273, maio 2018.

HENTSCHEL, H. *et al.* Validação do female sexual function index (FSFI) para uso em língua portuguesa. **Rev. HCPA**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1-9, jan. 2007.

HERLIN, M. *et al.* Prevalence and patient characteristics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a nationwide registry-based study. **Hum Reprod.**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 2384-2390, out. 2016.

HERLIN, M. K., PETERSEN, M. B., BRÄNNSTRÖM, M. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: a comprehensive update. **Orphanet J Rare Dis.**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 214-220, ago. 2020.

HERLIN, M. *et al.* Treatment of vaginal agenesis in syndrome in Mayer-RokitanskyKüster-Hauser syndrome in Denmark: a nationwide comparative study of anatomical outcome and complications. **Fertil Steril.**, [s. l.], v. 110, n. 9, p. 746-753, set. 2018.

HOM, Y. K. *et al.* Uterine and vaginal organ growth requires epidermal growth factor receptor signaling from stroma. **Endocrinology**, São Francisco, v. 139, n. 3, p. 913-921, mar. 1998.

JANNINI, E. A.; D'AMATI, G.; LENZI, A. Histology and immunohistochemical studies of female genital tissue. **Women's Sexual Function and Dysfunction: Study, Diagnosis and Treatment**, [s. l.], v. 1, n. 7, p. 125-132, jul, 2005.

JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Advances in Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 1-41, jan. 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LIMA JR, E. M. *et al.* Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. **J Heal Biol Sci.**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 193-197, maio 2016.

- LIMA JR, E. M. *et al.* Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **J Surg Case Rep.**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 181-187, jun. 2019.
- MÖBUS, V. J. *et al.* Long-term results after operative correction of vaginal aplasia. **Am J Obstet Gynecol.**, [s. l.], v. 175, n. 9, p. 617-624, set. 1996.
- NAGATA, T. *et al.* Efficacy of fibroblast growth factor on epithelialization of the neovagina in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome who underwent vaginoplasty. **J Pediatr Adolesc Gynecol.**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 400-404, jun. 2017.
- NAKAJIMA, T. *et al.* The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. **Differentiation**, [s. l.], v. 82, n. 7, p. 28-37, jul. 2011.
- NELSON, K. G. *et al.* Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 21-25, jan. 1991.
- NOGUCHI, S. *et al.* Use of artificial dermis and recombinant basic fibroblast growth factor for creating a neovagina in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1629-1632, jul. 2004.
- PANICI, P. B. *et al.* Vaginal reconstruction with the Abbe-McIndoe technique: from dermal grafts to autologous in vitro cultured vaginal tissue transplant. **Semin Reprod Med.**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 45-54, jan. 2011.
- PANICI, P. B. *et al.* Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Hum Reprod.**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 2025-2028, jul. 2007.
- PASTOR, Z. *et al.* Sexual life of women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome after laparoscopic Vecchietti vaginoplasty. **Sex Med.**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 106-113, jun. 2017.
- PIAZZA, M. J. Neovaginoplastias: uma revisão dos diversos métodos de tratamento / Neovaginoplasty: a review of different treatment methods. **Femina**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 121-127, jun. 2014.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol.**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 405-426, abr. 2005.
- SOUSA, S. *et al.* Abordagem diagnóstica e terapêutica no syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser. **Acta Obstet Ginecol Port.**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 8-13, jan. 2014.
- SOUZA, M. L. R.; SANTOS, H. S. L. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz. **Rev Unimar**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 881-888, mar. 1997.
- SUGIURA, H. *et al.* In vivo biological responses and bioresorption of tilapia scale collagen as a potential biomaterial. **J Biomater Sci Polym Ed.**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 1353-1368, out. 2009.

THIEL, R. R. C. *et al.* Tradução para português, adaptação cultural e validação do Female Sexual Function Index. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, Campinas, v. 30, n. 10, p. 504-510, out. 2008.

WELLS, Alan. EGF receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 637-643, jun. 1999.

WIEGEL, M.; MESTON, C.; ROSEN, R. The Female Sexual Function Index (FSFI): cross-validation and development of clinical cutoff scores. **J Sex Marital Ther.**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1-20, jan. 2005.

WU, S. *et al.* Oxidized regenerated cellulose/collagen dressings: review of evidence and recommendations. **Adv Skin Wound Care**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1-18, nov. 2017.

ZHOU, T. *et al.* Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. **Colloids Surf B Biointerfaces**, [s. l.], v. 143, n. 7, p. 415-422, jul. 2016.

APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NEOVAGINOPLASTIA COM USO DE PELE DE TILÁPIA DO NILO

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo sobre correção de malformação vaginal.

Estamos realizando em nosso departamento cirurgias para correção de malformação vaginal, usando a pele da tilápia do Nilo processada, um biomaterial nobre e de alta qualidade com sua resistência peculiar, embora não existam estudos que evidenciem sua resistência como pele não submetida ao curtimento. Esse material já é utilizado em queimaduras e feridas com segurança e bons resultados. O processamento, descontaminação e esterilização foi registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número BR1020150214359.

Para a cirurgia será necessário um preparo intestinal, com uso de laxativos. Abriremos a cavidade vaginal, que será preenchida por um conformador vaginal recoberto com a pele da tilápia processada para criar uma nova vagina. Este conformador utilizado nos dias de internação é providenciado pelo serviço de ginecologia da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC/UFC), mas um novo conformador deve ser providenciado pela paciente para seu uso na residência, sem nenhum tipo de ajuda de custo pela instituição.

Após a cirurgia deve ser feito um repouso absoluto no leito hospitalar por sete a dez dias para cicatrização. Tendo boa evolução, você receberá alta hospitalar após esse período e receberá as orientações para os cuidados que deverá seguir em casa, retornando regularmente ao ambulatório de Gineco-endocrinologia. Serão feitas 3 avaliações com intervalo de 1 mês, 3 meses e 6 meses da cirurgia, onde será feito exame físico ginecológico e pequenas biópsias da vagina para estudar o tecido novo que está se formando.

Os riscos desta cirurgia são os mesmos de qualquer outra cirurgia: riscos da anestesia, sangramento e infecção. Além destes, há uma possível complicação das cirurgias de reconstrução vaginal: má resposta do corpo ao material e estenose (estreitamento) vaginal. Não encontramos nos estudos nenhum risco específico da pele da tilápia do Nilo processada. Além desse material, há outros tipos de material que podem ser utilizados para reconstrução da vagina. Podem ser utilizados retalhos (pedaços) de pele da própria paciente, esta cirurgia tem como desvantagens a cicatriz na coxa ou abdome e maior taxa de infecção. Podem ser utilizados

também fragmentos (pedaços) do intestino e peritônio, esta cirurgia tem como desvantagens a abertura da barriga e maior tempo de cirurgia.

Sua participação nesse estudo não levará a nenhum desconforto além do já previsto para a realização da cirurgia de reconstrução vaginal que você deseja fazer para melhorar sua qualidade de vida.

Eu, Dra. Maria Tereza Pinto Medeiros Dias, médica ginecologista e preceptora da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), situada na Rua Coronel de Melo Nunes, sem número, bairro Rodolfo Teófilo, telefone 3366-8506, como pesquisadora principal desse estudo, estou a sua disposição para esclarecimentos, informações dos resultados e assistência durante o período pós operatório.

Em caso de dano pessoal diretamente causado por procedimentos ou tratamentos propostos nesse estudo, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição. Em caso de dúvida sobre a ética da pesquisa entrar em contato com o Comitê de Ética da Maternidade Escola Assis Chateaubriand no mesmo endereço acima citado.

É garantida a retirada de consentimento e participação no estudo a qualquer momento, podendo você continuar seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão usadas exclusivamente na realização desse estudo, estando garantida a confidencialidade na identidade de seus participantes.

A participação deste estudo não acarreta em despesas pessoais com exames, consultas, internação ou honorários médicos. A compra do conformador vaginal não tem relação com esse estudo, já faz parte da sua cirurgia (seu tratamento), mesmo que você não queira participar deste estudo. O hospital não dispõe deste recurso. Não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que me foram lidas, descrevendo o estudo sobre o uso da pele processada da tilápia para cirurgia de reconstrução vaginal.

Discuti com a Dra. Maria Tereza Pinto Medeiros Dias sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em

participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao meu atendimento nesse serviço.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente ou Representante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

Data ____ / ____ / ____

Maria Tereza Pinto Medeiros Dias

Pesquisador principal

APÊNDICE B – PRIMEIRA PUBLICAÇÃO

VIDEO



Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report

Maria Tereza Pinto Medeiros Dias, M.D.,^a Edmar Maciel Lima Júnior, M.D., M.S.,^d
 Ana Paula Negreiros Nunes Alves, B.Dent., Ph.D.,^c Andreisa Paiva Monteiro Bilhar, M.D., Ph.D.,^e
 Lívia Cunha Rios, M.D.,^a Bruno Almeida Costa, B.M.,^b Eduarda Syhara Rocha Matos, B.M.,^b
 Ana Cecília Venancio, B.M.,^b Zenilda Vieira Bruno, M.D., Ph.D.,^a Manoel Odorico de Moraes Filho, M.D., Ph.D.,^b
 and Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra, M.D., Ph.D.^a

^a Maternidade Escola Assis Chateaubriand, ^b Clinical Pharmacology Unit, Drug Research and Development Center, and ^c Nursing, Dentistry, and Pharmacy School, Federal University of Ceará; and ^d Burn Treatment Center, Dr. José Frota Institute, Fortaleza, Ceará, Brazil

Objective: To describe a McIndoe procedure technique for surgical management of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome with the use of Nile tilapia skin as a scaffold for the proliferation of new vaginal epithelium.

Design: Surgical video article. Local Institutional Review Board approval and written permission from the patient were obtained. There were no conflicts of interest.

Setting: University hospital.

Patient(s): A 17-year-old woman who presented at our gynecology department with the complaint of primary amenorrhea. At physical examination, she had a phenotypically normal vulva with no vaginal canal. Magnetic resonance imaging of the abdomen and pelvis revealed normal ovaries and absence of uterus and vaginal canal. No other congenital malformations were found. Karyotype was 46,XX.

Intervention(s): The McIndoe procedure involved only a vaginal approach. Labia minora were separated, and a transverse midline incision of 3 cm was made. The vesicorectal space was progressively dissected. Blunt dissection was performed initially with digital separation of tissues. The neovagina was then inspected with the introduction of a vaginal speculum, allowing for review of hemostasis. Blunt dissection was continued with the aid of the speculum, to reach the appropriate vaginal dimensions. Subsequently, a vaginal acrylic mold covered with two pieces of processed and sterilized tilapia fish skin was inserted and accommodated into the newly created cavity. The external side of the tilapia skin, which maintained its grayish coloration after the removal of the scales, stayed in contact with the acrylic mold, while the white internal side of the tilapia skin, which was previously attached to the fish's muscle, stayed in contact with the walls of the neocavity. The mold was held in position by four multifilament polyglactin 1.0 sutures in the labia majora, thus preventing expulsion.

Main Outcome Measure(s): Anatomic data, such as measurement of the final canal length, and histomorphologic analysis, 180 days after surgery.

Result(s): The patient remained on bed rest for 9 days, after which the tilapia fish skin had been partially reabsorbed. After this time, the acrylic mold was removed. A larger plastic mold was then inserted and the patient was advised to wear it day and night for the first postoperative month. The vaginal mold had to be worn each night until normal sexual intercourse was possible. The final canal length 180 days after surgery was between 8 and 9 cm. For the histopathologic analysis, fragments of the lateral vaginal wall were removed 180 days after surgery and showed the presence of stratified squamous epithelium with five cell layers, ectatic blood vessels, and occasional desquamated epithelial cells.

Received March 4, 2019; revised March 31, 2019; accepted April 1, 2019; published online May 15, 2019.

All authors hold a patent for Tilapia Skin from the National Institute of Industrial Property (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) under protocol number INPI: BR 10 2015 021435 9

Reprint requests: Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra, M.D., Ph.D., Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Federal University of Ceará (UFCE), General Tertuliano Potiguara St. 272 ap. 1800, Aldeota, Zip code: 60135280, Fortaleza, Ceará, Brazil (E-mail: leonardobezerragineco@gmail.com).

Fertility and Sterility® Vol. 112, No. 1, July 2019 0015-0282/\$36.00
 Copyright ©2019 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.003>

Conclusion(s): The procedure described offered this patient an anatomic and functional neovagina by means of a simple, safe, easy, effective, quick, and minimally invasive procedure. Limitations include the experimental nature of this study, based on a single case report with no long-term outcome results. The tilapia fish skin is a low-cost and widely available biomaterial. (Fertil Steril® 2019;112:174–6. ©2019 by American Society for Reproductive Medicine.)

El resumen está disponible en Español al final del artículo.

Key Words: Vaginal agenesis, vaginoplasty, Nile tilapia fish skin

Discuss: You can discuss this article with its authors and other readers at <https://www.fertstertdialog.com/users/16110-fertility-and-sterility/posts/45995-27918>.



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the video for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

NOW AVAILABLE ON YOUTUBE

<https://youtu.be/35jq3WDfInU>

SUGGESTED READING

1. Botero LR, Moraes MD, Bruns ZV, Lima Junior EM, Alves AP, Biliver AP, et al. Tilapia fish skin: a new biologic graft in gynecology. *Rev Med UFC*. 2018;58:6–8.
2. Alves APWK, Lima Junior EM, Piccolo NS, Miranda MB, Verde MEOL, Ferreira Junior AEC, et al. Study of tensometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. *Cell Tissue Bank*. 2018;19:373–82.
3. Lima Junior EM, Bandeira T de JFG, Miranda MB, et al. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. *J Heal Biol Sci* 2016;4:153–7.
4. Cullen N, de Cuppère G, de Sutter P, Monstrey S, Wuyers S, Hordhele P, et al. An update on surgical and nonsurgical treatments for vaginal Hypoplasia. 2014;20:775–801.

VIDEO

Piel de pez tilapia como nuevo injerto biológico para neovaginoplastias en el síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser: un video del caso

Objetivo: describir un procedimiento técnico de McIndoe para el tratamiento quirúrgico del síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser con el uso de la piel de tilapia del Nilo como una sujeción para la proliferación de un nuevo epitelio vaginal.

Diseño: vídeo-artículo quirúrgico. Se obtuvo la aprobación de la Junta de Revisión Institucional local y el permiso por escrito del paciente. No hubo conflictos de intereses.

Lugar: hospital universitario.

Paciente(s): una mujer de 17 años se presentó en nuestro departamento de ginecología con el diagnóstico de amenorrea primaria. En el examen físico, tenía una vulva fenotípicamente normal sin canal vaginal. La imagen por resonancia magnética del abdomen y la pelvis revelaron ovarios normales y ausencia de útero y canal vaginal. No se encontraron otras malformaciones congénitas. El cariotipo fue 46, XX.

Intervención(es): el procedimiento de McIndoe involucró solo un abordaje vaginal. Se separaron los labios menores y se realizó una incisión en la línea media transversal de 3 cm. El espacio vesicorectal se diseccionó progresivamente. La disección roma se realizó inicialmente con separación digital de tejidos. Luego se inspeccionó la neovagina con la introducción de un espéculo vaginal, lo que permitió la revisión de la hemostasia. La disección roma se continuó con la ayuda del espéculo, para alcanzar las dimensiones vaginales apropiadas. Posteriormente, se insertó un molde vaginal de acrílico recubierto con dos piezas de piel de tilapia procesada y esterilizada y se colocó en la cavidad recién creada. El lado externo de la piel de tilapia, que mantuvo su coloración grisácea después de la eliminación de las escamas, permaneció en contacto con el molde acrílico, mientras que el lado interno blanco de la piel de tilapia, que antes estaba adherida al músculo del pez, se mantuvo en contacto con los lados de la neocavidad. El molde se mantuvo en esa posición mediante cuatro suturas de poliglactina 1-0 multifilamento en los labios mayores para evitar así la expulsión.

Principal(es) medida(s) de resultados: datos anatómicos, como la medición final de la longitud del canal y el análisis histomorfológico, 180 días después de la cirugía.

Resultado(s): el paciente permaneció en reposo en cama durante 9 días, después de lo cual la piel de pez tilapia se reabsorbió parcialmente. Después de este tiempo, se eliminó el molde acrílico. Luego se insertó un molde de plástico más grande y se le recomendó a la paciente que lo usara día y noche durante el primer mes postoperatorio. El molde vaginal tenía que ser usado cada noche hasta que las relaciones sexuales fueran posibles. La longitud final del canal 180 días después de la cirugía fue entre 8 y 9 cm. Para el análisis histopatológico, los fragmentos de la pared vaginal lateral se retiraron 180 días después de la cirugía y mostraron la presencia de epitelio escamoso estratificado con cinco capas de células, vasos sanguíneos ectásicos y células epiteliales descamadas ocasionales.

Conclusión (es): el procedimiento descrito ofreció a esta paciente una neovagina funcional y anatómica a través de un procedimiento simple, seguro, fácil, efectivo, rápido y mínimamente invasivo. Las limitaciones incluyen la naturaleza experimental del estudio, basado en un solo caso sin resultados a largo plazo. La piel del pez tilapia es un biomaterial de bajo costo y ampliamente disponible.

APÊNDICE C – SEGUNDA PUBLICAÇÃO



Instruments and Techniques

Neovaginoplasty Using Nile Tilapia Fish Skin as a New Biologic Graft in Patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome

Maria Tereza Pinto Medeiros Dias, MD, Andreisa Paiva Monteiro Bilhar, MD, PhD, Livia Cunha Rios, MD, Bruno Almeida Costa, BM, Edmar Maciel Lima Júnior, MD, MS, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, BDent, PhD, Zenilda Vieira Bruno, MD, PhD, Manoel Odorico de Moraes Filho, MD, PhD, and Leonardo Robson Pinheiro Sobreira Bezerra, MD, PhD

From the Maternity School Assis Chateaubriand, Federal University of Ceará (UFC) (Drs. Pinto Medeiros Dias, Monteiro Bilhar, Cunha Rios, and Pinheiro Sobreira Bezerra), Fortaleza, CE, Brazil, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC) (Drs. Almeida Costa and Odorico de Moraes Filho), Fortaleza, CE, Brazil, Burn Treatment Center, Dr. José Frota Institute (Dr. Lima Júnior), Fortaleza, CE, Brazil, and Nursing, Dentistry and Pharmacy School, Federal University of Ceará (UFC) (Dr. Negreiros Nunes Alves), Fortaleza, CE, Brazil.

ABSTRACT Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome is the second most common cause of primary amenorrhea, trailing only to gonadal dysgenesis. Neovaginoplasty is an appropriate treatment option for patients who have failed dilation therapy. Several biomaterials have been used in this procedure, including peritoneum, amnion, skin grafts, and myocutaneous flaps. Nile Tilapia Fish Skin has noninfectious microbiota, morphologic structure comparable to human skin, and high in vivo bioreabsorption. In addition, it showed good outcomes when used as a xenograft for burn treatment. Thus, we suggest it as a new biologic graft for vaginal agenesis management. In this descriptive study, neovaginoplasty using Nile Tilapia Fish Skin offered 3 patients an anatomic and functional neovagina via a simple method with potential long-term effectiveness. When postsurgical dilation was performed correctly, a vaginal length greater than 6 cm was maintained at 180 days follow-up. Histologic and immunohistochemical analyses revealed the presence of stratified squamous epithelium with high expression of cytokeratins and fibroblast growth factor, matching the characteristics of normal adult vaginal tissue. We believe that further studies will show Nile Tilapia Fish Skin to be a relevant option in the therapeutic arsenal of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* (2020) 27, 966–972. © 2019 AAGL. All rights reserved.

Keywords: Tilapia; Neovagina; Vaginoplasty; Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome; Vaginal agenesis

Although a rare disorder, with a prevalence of around 1 in 5000 live female births, Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKHS) is the second most common cause of primary amenorrhea, trailing only to gonadal dysgenesis. Management includes psychological counseling

and treatment of the anatomic anomalies, accomplished via progressive dilation or surgery [1].

Dilation is considered the first treatment choice because neovaginoplasty is associated with an increased risk of complications and poor functional or anatomic results [2]. Even so, surgery is regarded as an appropriate option in patients who are poorly compliant and have failed dilation therapy, or for those who do not want to start vaginal dilation therapy. Several biomaterials have been reported as appropriate for this procedure, such as peritoneum, different segments of the colon, amnion, skin grafts, and myocutaneous flaps [3].

The most commonly performed technique has been the Abbè-McIndoe vaginoplasty [4], using the removal of a skin graft from the thigh, the gluteal region, or the lower abdominal wall. Although improvements have been made, the method still has the disadvantages of considerable surgical time, major risk of infections, and the development of

The authors declare that they have no conflict of interest.

The institutional review board responsible (March 22, 2018; No. 74027917.3.0000.5050) is 5050 - UFC - Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará / MEAC - UFC.

Corresponding author: Bruno Almeida Costa, MBBS, Clinical Pharmacology Unit, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará (UFC), Rua Cel. Nunes de Melo 1000, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará 60430-275, Brazil.

E-mail: bruno_almeida_costa@hotmail.com

Submitted July 8, 2019, Revised September 12, 2019, Accepted for publication September 13, 2019.

Available at www.sciencedirect.com and www.jmig.org

1553-4650/\$ — see front matter © 2019 AAGL. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jmig.2019.09.779>

abdominal or inguinal scars [5]. In addition, the skin allograft preserves most of its original characteristics, such as potential hair growth [3]. Therefore, the development of an alternative and cost-effective material with an easy application is needed for better management of women diagnosed with MRKHS.

Nile Tilapia Fish Skin (NTFS) has noninfectious microbiota [6], a morphologic structure similar to that of human skin [7], and high *in vivo* bioresorption [8]. In addition, NTFS showed good outcomes when used as a xenograft for pediatric [9] and adult [10] burn treatment in 2 recent studies. Even though those studies are just case reports and are focused on life-threatening cases necessitating innovative solutions, which was not the case with our patients, they revealed the wound healing activity and lack of toxicity and antigenicity of NTFS. Thus, we considered NTFS as an option of a new biologic graft for MRKHS management. This study describes a new technique and material for the creation of a neovagina using NTFS instead of autografts or allografts.

Methods

Patient Population

Between September 2017 and April 2018, 3 patients with MRKHS admitted to a local tertiary care hospital underwent a modified McIndoe vaginoplasty procedure with NTFS. Each of the participants had primary amenorrhea and normal secondary sex characteristics. A preoperative workup with complete clinical evaluation, complete physical examination, evaluation of hormonal status, karyotyping, abdominal ultrasound, and pelvic magnetic resonance imaging was performed (results are shown in Table 1). After the diagnosis was explained to each patient and/or the patient's legal caregiver (applicable for 2 of the patients, who were minors), study participants were evaluated by a multidisciplinary team, including referral for psychotherapy. Counseling on treatment time and options was then carried out. All patients, in conjunction with their family, wished for immediate treatment, because of their desire to begin sexual activity and/or simple desire for normal genital tract anatomy. Vaginal dilation techniques were initially offered. In all 3 cases, the patient or the patient's legal caregiver refused and

opted for surgical correction, even though the efficacy and decreased risks of dilation were adequately explained. Traditionally, in our gynecology service, the Abbé-McIndoe technique is performed for neovaginoplasty in patients with MRKHS. Both the standard method with split-skin grafts and the innovative method with NTFS were offered as options for surgical management, but all 3 patients opted for neovaginoplasty with NTFS.

Ethical Approval

The local institutional review board approved this study, as did the Brazil Platform, an electronic system created by the Brazilian Federal Government to systematize the receipt of research projects that involve humans in ethics committees all over the country. In addition, after appropriate counseling regarding the methods and the investigational nature of the material used, as well as possible complications, both written and verbal consent was obtained from each patient and/or the patient's legal caregiver (applicable for 2 of the patients, who were minors), before surgery.

Tilapia Skin Preparation

The patent for NTFS is registered at the National Institute of Industrial Property under the number BR1020150214359. The biomaterial is currently in the final stages for registration as an approved medical graft by the National Sanitary Surveillance Agency. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) samples were obtained from fish farms in the Castanhão dam, located in the city of Jaguaribara, Ceará. NTFS is separated from the muscle attached to it, cut into pieces of around 10.0 × 5.0 cm, washed with 0.9% saline, and placed in a sterile container with 2% chlorhexidine gluconate, where it stays for 60 minutes. The skin is removed from the previous solution, washed with sterile 0.9% saline and placed in a sterile, hermetically sealed container with 75% glycerol and 25% saline. After 1 hour, the skin is again rinsed with sterile 0.9% saline and placed in another sterile, hermetically sealed container, this time with a solution of 100% glycerol, in which it is massaged for 5 minutes. Then, the skin, still in the solution of 100% glycerol, is kept for 3 hours in a water bath in a

Table 1

Individual characteristics of patients undergoing neovaginoplasty with use of NTFS

| Patient | 1 | 2 | 3 |
|-----------------------------|--|---------|---------|
| Age at operation, yrs | 16 | 17 | 22 |
| Karyotype | 46, XX | 46, XX | 46, XX |
| Associated anomalies | Unilateral renal agenesis (right side) | None | None |
| Hormonal status | Regular | Regular | Regular |
| Tanner staging | M4, P5 | M4, P5 | M5, P5 |
| Existent vaginal dimple, cm | 0 | 0 | 1 |

NTFS = Nile Tilapia Fish Skin.

Fig. 1

Acrylic vaginal mold before and after insertion into the newly created canal. The external side of the tilapia skin, which maintained its grayish coloration after removal of the scales, stayed in contact with the acrylic mold, whereas the white internal side of the tilapia skin stayed in contact with the walls of the neocavity.



centrifuge at 37°C and 15 rpm. The skin is then packaged in double-sealed plastic envelopes and stored at 4°C. The last step of the sterilization process is gamma irradiation on a cobalt-60 multipurpose irradiator at 30 kGy [11]. Finally, microbiological tests for bacteria and fungi are performed on each sample. The skin can be stored for up to 2 years in sterile refrigerated packaging.

Surgical Procedures

The first step of surgery consists of preparation of the tilapia skin and the mold. A sterile acrylic mold suitable for the procedure and with fixing holes is required. Two 10.0 × 5.0-cm pieces of tilapia skin are thoroughly washed with 0.9% saline to remove excess glycerol in an intraoperative sterile environment. The skin is then attached to the mold using separate stitches with multifilament polyglactin 3.0 (Vicryl 3.0; Johnson & Johnson, Somerville, NJ).

The procedure involves only a vaginal approach, and all steps are performed under aseptic conditions. Patients were under spinal anesthesia and in the lithotomy position. After urethral catheterization, the vaginal dimple was identified, and a transverse midline incision of 3 cm was made. The median raphe was divided, and the space between bladder and rectum was progressively dissected as high as possible, taking care not to enter the peritoneal cavity. Based on the principle of blunt dissection, a canal was created with digital separation of tissues. The newly created cavity was then inspected with the introduction of a vaginal speculum. It was noted that the canal was lined by smooth tissue and that the dome of the cavity was formed by peritoneum reflected from the superior surface of the bladder to the anterior aspect of the rectum. Hemostasis was ensured with the aid of bipolar energy because the vaginal cavity should be as dry as possible to prevent failure of NTFS adherence. Blunt dissection is

continued with the aid of the speculum to reach the appropriate vaginal dimensions. The newly created vaginal cavity is capable of easily accommodating the length and width of 2 fingers. Subsequently, an acrylic vaginal mold (adjustable vaginal stent) covered with 2 pieces of NTFS was inserted into the canal and held in position by 4 sutures with multifilament polyglactin 1.0 (Vicryl 1.0; Johnson & Johnson) in the labia majora to prevent expulsion. The white inner side of the NTFS remained in contact with the walls of the newly created cavity (Fig. 1). Operation time was calculated from the first incision in the vaginal mucosa until finalization of the sutures in the labia majora.

A step-by-step video tutorial of the procedure described is presented in a video recently published by our team of researchers [12].

Follow-up

Immediate postoperative follow-up involved instructions for the patients regarding continuous use of the vaginal mold and avoidance of sexual activity for the first postoperative month. Patients were maintained on a urinary catheter for the first week to avoid postoperative urinary retention. In addition, sterilized dressings were applied to protect surgical sutures and patients were monitored for bleeding, which did not occur. Pain medications, such as dipyrrone and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, were administered as needed. Postoperative follow-up visits were scheduled at 30, 60, 90, and 180 days after surgery. In each visit, the cosmetic outcome was assessed and neovaginal length was measured. Anatomic success was defined as the generation of a neovagina of at least 6 cm in length, which consistently allowed the easy introduction of 2 fingers within 6 months after surgery [13]. Sexual activity was permitted 3 months after surgery. Female Sexual Function Index (FSFI)

questionnaires, validated to be used by Portuguese speakers [14], were used for each participant who started sexual activity, after 4 weeks of initiating intercourse. The instrument contains 19 questions with multiple-choice responses associated with 6 domains: desire, arousal, lubrication, orgasm, satisfaction with sexual life, and pain during or after intercourse. Participants completed the instrument by choosing the option that best described their situation in the last 4 weeks. A score of 26 or less on FSFI suggests the presence of sexual dysfunction [15].

Histologic Analysis

For the histopathologic analysis, 2 full-thickness biopsies, the first one 90 days after surgery and the second one 180 days after surgery, were performed in each of the 3 patients, without complications. The site for biopsy was the upper third of the right lateral vaginal wall. The samples were divided into 2 groups, depending on the number of days after surgery: day-90 and day-180 groups.

The soft tissue fragments were immersed in 10% neutral-buffered formalin for 48 hours; they were then washed in running tap water, and analyzed macroscopically for changes in shape, color, and consistency. The fragments were then placed in cassettes and processed by an automated Leica tissue processor. They were then immersed in a bath containing paraffin at 56°C, resulting in the formation of paraffin-shaped blocks at room temperature. Finally, the fragments were serially sectioned to a thickness of 4 μ m and submitted to routine staining using hematoxylin and eosin. Slides were mounted with Canada Balsam and analyzed under a standard light microscope.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses were performed using a standard streptavidin-biotin-peroxidase method in 4- μ m-thick tissue sections, which had been obtained from paraffin-embedded blocks and mounted on silanized microscopic slides. Anti-CK Pool (1:200, Dako, Carpinteria, CA) and anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies (1:200, Dako) were used in an automatic staining system (BenchMark XT; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and the heat-induced epitope retrieval was performed using an EZ Prep Solution (Ventana) for 30 minutes. Manual staining was used for anti-FGF (1:1250, Abcam) and its antigenic recovery was performed using citrate (Dynamics) 0.01 M (pH 6.0) in heat for 45 minutes. Immunoreactions were detected using the XT ultraView diaminobenzidine v.3 system (Ventana) for anti-CK Pool (Dako) and anti-EGFR (Dako), and with chromogen diaminobenzidine for 5 minutes for anti-FGF (Abcam). All sections were subsequently counterstained with Harris hematoxylin for 30 seconds. Positive extrinsic and intrinsic control samples were used in each assay. Negative controls were performed by suppressing the primary antibody in each reaction.

Results

Clinical Outcomes

In all 3 patients, the operation was functionally satisfactory, with no postoperative complications. The duration of the procedure varied between 20 and 80 minutes, and the length of the neovagina after surgery was 9 to 10 cm.

We opted for bed rest for the patients for 9 days because of our previous experience with the McIndoe procedure using split-skin grafts in our service. On the ninth day of bed rest after surgery, the acrylic mold was removed, allowing examination of the neovagina. At this point, the NTFS had been partially reabsorbed, and minor old blood secretions were found. After gentle irrigation with antiseptic lotion, on the condition that no signs of necrosis were detected, a larger silicone mold covered by a condom was inserted. Patients were advised to wear the vaginal mold day and night for the first postoperative month. After this period, the vaginal mold had to be worn each night until regular sexual intercourse was possible.

Evaluation of the postoperative results was performed at 30, 60, 90, and 180 days after surgery and revealed, throughout the visits, a well-formed neovagina with a 2-finger width in each patient (Fig. 2). The results of the operation and the parameters evaluated during follow-up visits are shown in Table 2. Considering the innovative nature of the procedure, we intend to continue the follow-up visits until 5 years after surgery to adequately evaluate long-term results.

Histologic and Immunohistochemical Outcomes

Microscopic analysis of the lateral vaginal wall fragments in the day-90 group revealed connective tissue covered by stratified squamous epithelium with around 5 cell layers. The epithelium showed acanthosis in some points and rectification of the epithelial ridges, under which a dense fibrovascular core with occasionally ectatic blood vessels was visualized. In addition, moderate mixed inflammatory infiltrates with a predominance of neutrophil polymorphonuclear granulocytes were detected. Microscopic analysis of the fragments from the day-180 group revealed that the epithelial lining was already hyperplastic and that

Fig. 2

Speculum examination performed 60 days after surgery showing, in each patient, a well-formed neovagina with a 2-finger width.



Table 2

| Postoperative assessment of results of patients undergoing neovaginoplasty with use of NTFS | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|-----------|
| Patient | 1 | 2 | 3 |
| Operation time, minutes | 80 | 35 | 20 |
| Hospitalization, days | 10 | 10 | 10 |
| Complications | None | None | None |
| Vaginal length after surgery, cm | 10 | 10 | 9 |
| Vaginal length at 6 months' follow-up, cm | 4 | 7.5 | 9 |
| Appropriate use of the mold during follow-up | No | Yes | Yes |
| Time until first postoperative sexual intercourse | No sexual intercourse yet | No sexual intercourse yet | 10 months |
| FSFI score | No sexual intercourse yet | No sexual intercourse yet | 28.8 |

FSFI = Female Sexual Function Index; NTFS = Nile Tilapia Fish Skin.
 Operation time was calculated from the first incision in the vaginal mucosa until finalization of the sutures in labia majora. Sexual intercourse was permitted 3 months after surgery and performed based on the patient's preference. FSFI questionnaires were used for the participant who started sexual activity after 4 weeks of initiating intercourse.

the underlying fibrous connective tissue had discrete mononuclear inflammatory infiltrates, instead of a predominance of neutrophils. Immunohistochemistry (IHC) showed, in the epithelial lining of both groups, intense reactivity with the anti-CK pool antibody (cytokeratins AE1 and AE3). However, the expression of EGFR antibody was visualized only in the epithelial tissue of the day-180 group. Diffuse immunoreactivity with the anti-FGF antibody was observed in epithelial and connective tissue cells of both groups (Fig. 3).

Discussion

In a search for new surgical techniques with easily accessible and cost-effective materials that may substitute as skin grafts, as well as other types of grafts, our researchers considered the use of NTFS as a scaffold for the proliferation of a new vaginal epithelium in patients with MRKHS. The patients reported in this study are the first 3 cases in whom this technique was used successfully.

Patients 2 and 3 followed recommendations regarding postoperative silicone mold use and, consequently, were able to maintain, at 180-day follow-up, a vaginal length of 7.5 and 9 cm, respectively. In contrast, 6 months after the operation, patient 1 had a vaginal length of only 4 cm. Insufficient postsurgical dilation was the likely explanation for nonmaintenance of at least 6 cm of vaginal length, most probably owing to inadequate use of the vaginal dilator and/or lack of sexual activity. This patient's young age and immaturity may have acted as possible additional contributing factors [16]. Even so, creation of an adequate vaginal cavity using repeated natural intercourse is reported in literature, and the neovagina can be additionally elongated by 2 to 3 cm during sexual arousal [17–19]. Thus, future initiation of coital activity will help this patient to further increase vaginal length.

Regarding sexual function, even though sexual intercourse was permitted 3 months after surgery, only patient 3 reported sexual activity (10 months after the operation). Four weeks later, the FSFI questionnaire was filled in by

this patient, resulting in a score of 28.8, which is consistent with a satisfactory quality of sexual life [15]. Point loss from maximal score was predominantly related to difficulties with maintenance of lubrication.

We believe NTFS acts not only as a protective layer but also as a true scaffold, allowing scar tissue to undergo metaplasia and epithelization. Although we currently do not understand how this process happens, we hypothesize that cells in the dissected space between the rectum and bladder have pluripotent potential for tissue differentiation. The physical trauma caused by vaginal dilation seems to be related to cellular gene expression and modification of transcription factors [20]. In addition, in a recent study, tilapia collagen nanofibers hastened skin wound healing in rats by promoting cell adhesion, proliferation, and differentiation [21].

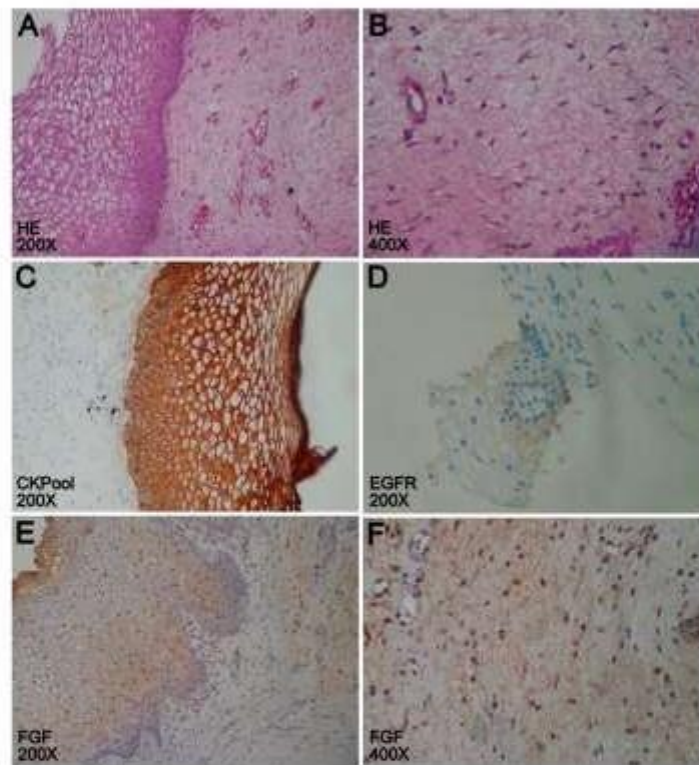
The neovagina is similar to the normal adult vagina as far as elasticity, capacity, and anatomic axis are concerned. Even though the neovagina has decreased self-lubrication, no other significant functional or anatomic differences were found. Adequate lubrication may be inversely proportional to the time since operation, resulting from the progressive epithelialization of the neovagina [3]. Thus, this problem could diminish with time.

Biopsies of the neovaginal walls showed that macroscopically and microscopically, this neoeplithelium is indistinguishable from the normal epithelium of the vagina. Expression of protein markers is also significantly similar. Several cytokeratins are found primarily in stratified tissues, or in tissues with potential to stratification, suggesting that their production may be somehow related to the stratification process, [22]. The neovaginal mucosa created not only exhibited stratified squamous epithelium histologically but also had characteristics comparable to those of normal vaginal mucosa in the expression pattern of cytokeratin. After 6 months, immunoreactivity for cytokeratin was detected in more cellular layers compared with results at 3 months, revealing a progression of cytokeratin expression.

FGF is 1 of the growth factors involved in neovascularization, wound healing, and embryogenesis. Recent studies have

Fig. 3

Vaginal wall tissue photomicrographs after 6 months of the surgical procedure. (A) Hyperplastic epithelium with a dense underlying fibrovascular core (H&E). (B) Discrete mononuclear inflammatory infiltrate in the connective tissue below the stratified squamous epithelium (H&E). (C) Intense expression of CK in the epithelium. (D) Discrete expression of EGFR in the epithelium. (E) Diffuse expression of FGF in the epithelium. (F) Diffuse expression of FGF in the underlying connective tissue. CK = cytokeratin; EGFR = epidermal growth factor receptor; FGF = fibroblast growth factor; H&E = hematoxylin and eosin.



suggested a significant role for FGF on proliferation and differentiation of vaginal epithelium [23,24], and recombinant basic fibroblast growth factor spray has been used after vaginoplasty to accelerate epithelialization of the neovagina [25]. Our IHC results showed a high FGF expression in both epithelial and connective tissue cells, supporting a probable role for NTFS in long-term upregulation of FGF.

The epidermal growth factor (EGF) family of ligands is implicated in uterine and vaginal development, particularly as mediators of estrogen action. Through binding to EGFR, EGF promotes vaginal growth and keratinization, functioning as an autocrine/paracrine growth factor for keratinocytes. EGFR signaling is also required for the growth of vaginal stroma [26,27]. Our results showed only focal positivity for EGFR at the 6-month follow-up biopsy, which suggests late-onset expression after the procedure.

We believe NTFS to be a compelling candidate for use in making a clinical scaffold for neovaginal epithelialization. It allows performance of surgery exclusively by vaginal access, in only 1 step, without laparoscopy or laparotomy, or any other technology of high-cost vaginal dilation, such as the one described by Giuseppe Vecchiatti [28]. Even so, we recognize the limitations of analyzing the results of our method in only 3 patients and the short follow-up provided. Long-term follow-up is essential for proper review of outcomes of neovaginoplasty procedures, owing to the risk of postoperative shrinkage and the need of regular compliant dilation after operation. Even though MRKHS is a rare disorder, we are currently gathering patients for future publication of a larger study. We also intend to perform a multicentric randomized clinical trial comparing this new technique with already established techniques. In this way, we hope to prove, or not, the efficacy of

NTFS regarding anatomic and functional outcomes, patient satisfaction, treatment safety, and cost-effectiveness.

Conclusion

In this descriptive study (Canadian Task Force classification III), neovaginoplasty using NTFS offered 3 patients an anatomic and functional neovagina through a simple, safe, easy, effective, quick, and minimally invasive procedure. When postsurgical dilation was performed correctly, a vaginal length greater than 6 cm was maintained at the 180-day follow-up. Histologic and immunohistochemical analyses revealed the presence of stratified squamous epithelium with high expression of cytokeratins and FGF and weak expression of EGFR, matching the characteristics of healthy adult vaginal tissue. We believe that further studies conducted by our researchers will show NTFS to be a relevant option in the therapeutic arsenal of MRKHS, thereby improving the quality of life of patients and producing significant financial and social impact for the health system.

References

- Herlin M, Björn AM, Raamussen M, Trille B, Petersen MB. Prevalence and patient characteristics of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a nationwide registry-based study. *Hum Reprod*. 2016;31:2384–2390.
- Cheikhelani A, Bider M, Baptiste A, et al. Surgery is not superior to dilation for the management of vaginal agenesis in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a multicenter comparative observational study in 131 patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2018;219:281.e1–281.e9.
- Cailens N, De Cuypere G, De Sutter P, et al. An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. *Hum Reprod Update*. 2014;20:775–801.
- Panicci PB, Bellati F, Boni T, Francescangeli F, Frati L, Marchese C. Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Hum Reprod*. 2007;22:2025–2028.
- Panicci PB, Ruscio I, Gaspari ML, Maffucci D, Marchese C, Bellati F. Vaginal reconstruction with the Abbé-McIndoe technique: from dermal grafts to autologous in vitro cultured vaginal tissue transplant. *Semin Reprod Med*. 2011;29:45–54.
- Lima Júnior EM, TâDPO Bandeira, Miranda MHB, et al. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. *J Heal Biol Sci*. 2016;4:193–197.
- Alves APNN, Verde MEQL, Ferreira Júnior AEC, et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Rev Bras Quimioter*. 2015;14:203–210.
- Sugitani H, Yunoki S, Kondo E, Ikoma T, Tanaka J, Yasuda K. In vivo biological responses and biorestitution of tilapia scale collagen as a potential biomaterial. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2009;20:1353–1368.
- Costa BA, Lima Júnior EM, de Moraes Filho MO, et al. Use of tilapia skin as a xenograft for pediatric burn treatment: a case report. *J Burn Care Res*. 2019;30:714–717.
- Lima Júnior EM, de Moraes Filho MO, Costa BA, et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *J Surg Case Rep*. 2019;2019.rjz181.
- Alves APNN, Lima Júnior EM, Piccolo NS, et al. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. *Cell Tissue Bank*. 2018;19:373–382.
- Pinto Medeiros Dias MT, Lima Júnior EM, Negreiros Nunes Alves AP, et al. Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a video case report. *Fertil Steril*. 2019;112:174–176.
- Ding JX, Chen LM, Zhong XY, Zhong Y, Hua KQ. Sexual and functional outcomes of vaginoplasty using acellular porcine small intestinal submucosa graft or laparoscopic peritoneal vaginoplasty: a comparative study. *Hum Reprod*. 2015;30:581–589.
- Thiel RRC, Dambros M, Palma PCR, Thiel M, Ricetto CLZ, Ramos MF. Tradução para português, adaptação cultural e validação do Female Sexual Function Index. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30:504–510.
- Wiegel M, Meaton C, Rosen R. The Female Sexual Function Index (FSFI): cross-validation and development of clinical cutoff scores. *J Sex Marital Ther*. 2005;31:1–20.
- Herlin M, Bay Björn AM, Jørgensen LK, Trille B, Petersen MB. Treatment of vaginal agenesis in syndrome in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome in Denmark: a nationwide comparative study of anatomical outcome and complications. *Fertil Steril*. 2018;110:746–753.
- Edmonds DK, Rose GL, Lipton MG, Quek J. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a review of 245 consecutive cases managed by a multidisciplinary approach with vaginal dilators. *Fertil Steril*. 2012;97:686–690.
- Pastor Z, Froněk J, Novácková M, Chmel R. Sexual life of women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome after laparoscopic Vecchietti vaginoplasty. *Sex Med*. 2017;5:e106–e113.
- Möbus VJ, Kortenhorn K, Kreienberg R, Friedberg V. Long-term results after operative correction of vaginal aplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:617–624.
- Dornelas J, Järmy-Di Bella ZI, Heinke T, et al. Vaginoplasty with oxidized cellulose: anatomical, functional and histological evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;163:204–209.
- Zhou T, Wang N, Xue Y, et al. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing by inducing keratinocytes proliferation and differentiation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;143:415–422.
- Bosch FX, Leube RE, Achorstätter T, Moll R, Franke WW. Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *J Cell Biol*. 1988;106:1635–1648.
- Nagata T, Kawano A, Koyama M, et al. Efficacy of fibroblast growth factor on epithelialization of the neovagina in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome who underwent vaginoplasty. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017;30:400–404.
- Nakajima T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T. The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation*. 2011;82:28–37.
- Noguchi S, Nakatsuka M, Sugiyama Y, Chekir C, Kamada Y, Hiramoto Y. Use of artificial dermis and recombinant basic fibroblast growth factor for creating a neovagina in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Hum Reprod*. 2004;19:1620–1632.
- Hsu YK, Young P, Wiesen JF, et al. Uterine and vaginal organ growth requires epidermal growth factor receptor signaling from stroma. *Endocrinology*. 1998;139:913–921.
- Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:21–25.
- Cezar C, Devassy R, Larbig A, De Wilde RL. Efficacy risks of the minimal-invasive plastic and reconstructive neovagina Vecchietti technique in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2014;3. Doc13.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIACÃO ÉTICA

Portal do Governo Brasileiro

Plataforma Brasil

Informe e E-mail Informe e Senha LOGIN

Esqueceu a senha? Cadastre-se v.2

Verifique seu e-mail - Confirme aprovação pelo CAAE do Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE DO PARECER

Informe o número do CAAE do Parecer

Número do CAAE: Número do Parecer: Pesquisar

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apareça nenhuma resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa
NEOVAGINOPLASTIA COM PELE DE TILÁPIA:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Quem Aprovou o Parecer: Pesquisador Responsável:

Data início da Coorte/Grupos: Data Fim do Cronograma: Contato Público:

Validar

Aponte e informe: (OBS - copiar o código e colar no campo de busca da Plataforma Brasil)
 Se o sistema não encontrar o seu parecer consulte a Plataforma Brasil

MINISTÉRIO DA SAÚDE

PLATAFORMA BRASIL

Fonte: site oficial Plataforma Brasil

**ANEXO B – ÍNDICE DE SATISFAÇÃO SEXUAL FEMININO (FSFI) PARA
USO EM LÍNGUA PORTUGUESA (HENTSCHEL *et al.*, 2007)**

Questionário de avaliação da resposta sexual feminina - FSFI validado
para o português

Instruções:

Estas questões são sobre seus sentimentos e respostas sexuais nas últimas 4
semanas.

Por favor, responda às perguntas que seguem da forma mais clara e honesta
possível.

Suas respostas serão mantidas em sigilo (segredo) completo.

PARA CADA ITEM, MARQUE APENAS UMA RESPOSTA

As definições a seguir se aplicam nas respostas:

O desejo ou interesse sexual é um sentimento que abrange a vontade de ter
uma experiência sexual, a receptividade às iniciativas sexuais do parceiro, e
pensamentos ou fantasias sobre o ato sexual.

1. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você sentiu desejo
ou interesse sexual?

- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Poucas vezes (menos do que a metade do tempo)
- Nunca ou quase nunca

2. Durante as últimas 4 semanas, como você classifica seu nível(grau) de desejo ou interesse sexual?

- Muito alto
- Alto
- Moderado
- Baixo
- Muito baixo ou nenhum

A excitação sexual é uma sensação com aspectos físicos e mentais. Pode aparecer uma sensação de calor ou de vibração na genitália, lubrificação (umidade), ou contrações musculares.

3. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você se sentiu excitada durante o ato ou atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (metade das vezes)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)
- Nunca ou quase nunca

4. Durante as 4 últimas semanas, como você classificaria seu nível (grau) de excitação sexual durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Muito alto

- Alto
- Moderado
- Baixo
- Muito baixo ou nenhum

5. Durante as últimas 4 semanas, qual foi seu grau de confiança sobre sentir-se excitada durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Altíssima confiança
- Alta confiança
- Moderada confiança
- Baixa confiança
- Baixíssima ou nenhuma confiança

6. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você ficou satisfeita com seu nível(grau) de excitação durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)
- Nunca ou quase nunca

7. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você ficou

lubrificada (“molhada”) durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)
- nunca ou quase nunca

8. Durante as últimas 4 semanas, qual foi o grau de dificuldade para ficar lubrificada (molhada) durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Extremamente difícil ou impossível
- Muito difícil
- Difícil
- Pouco difícil
- Nada difícil

9. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você manteve sua lubrificação até o final da atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)

Nunca ou quase nunca

10. Durante as últimas 4 semanas, qual foi o grau de dificuldade para manter sua lubrificação até terminar a atividade sexual?

Sem atividade sexual

Extremamente difícil ou impossível

Muito difícil

Pouco difícil

Nada difícil

11. Durante as últimas 4 semanas, na atividade sexual ou quando sexualmente estimulada, com que frequência você atingiu o orgasmo

(clímax)?

Sem atividade sexual

Sempre ou quase sempre

Muitas vezes (mais da metade do tempo)

Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)

Poucas vezes (menos da metade do tempo)

Nunca ou quase nunca

12. Durante as últimas 4 semanas, na atividade sexual ou quando sexualmente estimulada, qual foi o grau de dificuldade para atingir o orgasmo (clímax)?

Sem atividade sexual

Extremamente difícil ou impossível

- Muito difícil
- Difícil
- Pouco difícil
- Nada difícil

13. Durante as últimas 4 semanas, qual foi o grau de satisfação com sua habilidade de chegar ao orgasmo (clímax) durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Muito satisfeita
- Moderadamente satisfeita
- Indiferente
- Moderadamente insatisfeita
- Muito insatisfeita

14. Durante as 4 últimas semanas, qual foi o grau de satisfação com a quantidade de envolvimento emocional entre você e seu parceiro durante a atividade sexual?

- Sem atividade sexual
- Muito satisfeita
- Moderadamente satisfeita
- Indiferente
- Moderadamente insatisfeita
- Muito insatisfeita

15. Durante as últimas 4 semanas, qual foi o grau de satisfação na relação sexual com seu parceiro?

- Muito satisfeita
- Moderadamente satisfeita
- Indiferente
- Moderadamente insatisfeita
- Muito insatisfeita

16. Durante as últimas 4 semanas, de forma geral, qual foi o grau de satisfação com sua vida sexual?

- Muito satisfeita
- Moderadamente satisfeita
- Indiferente
- Moderadamente insatisfeita
- Muito insatisfeita

17. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você sentiu desconforto ou dor durante a penetração vaginal?

- Não houve tentativa de penetração
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)
- Nunca ou quase nunca

18. Durante as últimas 4 semanas, com que frequência você sentiu desconforto ou dor após a penetração vaginal?

- Não houve tentativa de penetração
- Sempre ou quase sempre
- Muitas vezes (mais da metade do tempo)
- Algumas vezes (aproximadamente a metade do tempo)
- Poucas vezes (menos da metade do tempo)
- Nunca ou quase nunca

19. Durante as últimas 4 semanas, como você classifica seu grau(nível) de desconforto ou dor durante ou após a penetração vaginal?

- Não houve tentativa de penetração
- Altíssimo
- Alto
- Moderado
- Baixo
- Baixíssimo ou nenhum