



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

JOÃO MARCOS DE MENESES E SILVA

**AVALIAÇÃO DE OVÁRIOS CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICAÇÃO OU
CONGELAÇÃO LENTA APÓS INTERVALO PRECOCE E TARDIO DE
CASTRACÃO EM RATAS**

**FORTALEZA
2014**

JOÃO MARCOS DE MENESES E SILVA

AVALIAÇÃO DE OVÁRIOS CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICAÇÃO OU
CONGELAÇÃO LENTA APÓS INTERVALO PRECOCE E TARDIO DE CASTRAÇÃO
EM RATAS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular No Estresse.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro.

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S58a Silva, João Marcos de Meneses e.
Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce e tardio de castração em ratas. / João Marcos de Meneses e Silva. – 2014.
102 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Doutorado em Cirurgia, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro.
1. Criopreservação. 2. Vitrificação. 3. Ratos. 4. Variectomia. I. Título.

JOÃO MARCOS DE MENESES E SILVA

AVALIAÇÃO DE OVÁRIOS CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICAÇÃO OU
CONGELAÇÃO LENTA APÓS INTERVALO PRECOCE E TARDIO DE CASTRAÇÃO
EM RATAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.

Aprovada em 28/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Raimunda Magalhães da Silva
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Ivelise Regina Canito Brasil
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Ao Nosso Senhor e Salvador Jesus Cristo.

Aos meus pais e irmãos.

À minha esposa amada Lígia.

Às minhas preciosas filhas Sara e Sofia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Chefe do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da UFC Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Agradecimento especial desejo expressar ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro e co-orientador Prof. Dr. José Alberto Dias Leite pela orientação e sincera amizade.

Aos Professores e Colegas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina pelos ensinamentos repassados.

À colega ginecologista, ultrassonografista, que me auxiliou nos procedimentos cirúrgicos e trabalhos do programa de Doutorado, ajudou na escrita dos artigos e da Tese, mãe das minhas filhas, pessoa humana com maior coração que já conheci e merecedora de todo o meu amor, Dra. Lígia Helena Ferreira Melo e Silva.

Aos colegas e amigos professores da Faculdade de Medicina – Centro Universitário Christus, Dr. Antônio Miguel Furtado Leitão e Antônio Ribeiro da Silva Filho pelo incentivo e apoio por meio de estrutura física e financiamento de animais e materiais.

Aos meus sempre tutores Dr. Francisco José Costa Eleutério, Dr. Everardo Leite Gonçalves e Prof. Dr. José Ferreira Nunes pelos esclarecimentos das dúvidas que nos aparecem frequentemente.

Aos meus companheiros de equipe de pesquisa, Dr. Rômulo Cesar Costa Barbosa Filho, ex-aluno e hoje cirurgião e Dra. Franciele Lunardi, Doutoranda em Medicina Veterinária, pela ajuda de forma incondicional na parte experimental da pesquisa.

À equipe de plantonistas da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) – UFC nos turnos diurnos de domingo pelo apoio sempre presente e incentivo.

“Et cognoscetis veritatem et veritas liberabit vos. Dicit ei Pilatus: Quid est veritas? Dicit ei Jesus: Ego sum via, veritas et vita nemo venit ad Patrem nisi per Me.”

(Ioannem 8:32, 18:38, 14:6)

RESUMO

Comparar duas técnicas de criopreservação de ovário de ratas (vitrificação versus congelação lenta) e dois estágios pós-castração (intervalo precoce versus tardio) em relação à pega do enxerto. Trinta e três ratas Wistar foram submetidas à ooforectomia bilateral. Um ovário foi submetido à análise histológica, enquanto o outro foi criopreservado por congelação lenta ou vitrificação. O ovário criopreservado foi descongelado e reimplantado no omento maior uma semana (intervalo precoce) ou um mês (intervalo tardio) após ooforectomia. Um mês após o reimplante de ovário, a pega do enxerto foi avaliada macroscopicamente e histologicamente. Seis dos animais foram utilizados como controle e sete morreram. Os achados histológicos de 20 animais incluídos folículos atrésicos ($n = 4$), folículos primordiais ($n = 2$) e corpo lúteo com folículos primordiais ($n = 3$). No tecido ovariano foi encontrado em 11 animais. A vitrificação resultou em um enxerto com maior taxa de pega do que a congelação lento (50% versus 38,5%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. No entanto, as pegas dos enxertos foram 9,3 vezes maiores na precoce do que na pós-ooforectomia tardia (61,5% versus 14,3%) ($p = 0,043$). O tecido ovariano apresenta melhor taxa de pega quando reimplantado na fase tardia da pós-ooforectomia.

Palavras-chave: Criopreservação. Vitrificação. Ratas. Ooforectomia.

ABSTRACT

To compare two rat ovary cryopreservation techniques (vitrification vs. slow freezing) and two postmenopausal stages (early vs. late) with regard to graft take. Thirty-three Wistar rats were submitted to bilateral oophorectomy. One ovary was submitted to histological analysis while the other was cryopreserved by slow freezing or vitrification. The cryopreserved ovary was thawed and reimplanted in the greater omentum one week (early menopause) or one month (late menopause) after oophorectomy. One month after ovary reimplantation, the graft take was evaluated macroscopically and histologically. Six of the animals were used as controls and seven died. The histological findings of 20 animals included atretic follicles (n=4), primordial follicles (n=2), and corpus luteum with primordial follicles (n=3). No ovarian tissue was found in 11 animals. Vitrification resulted in a higher graft take rate than slow freezing (50% vs. 38.5%), but the difference was not statistically significant. However, the graft take rate was 9.3 times higher in the early than in the late postmenopausal stage (61.5% vs. 14.3%) ($p=0.043$). Ovary reimplantation is more likely to be successful in the late postmenopausal stage.

Key words: Cryopreservation. Vitrification. Rats. Ovariectomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático da anatomia do útero e ovários da rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	44
Figura 2 – Anatomia das estruturas do abdome e pelve de rata. A: útero; B: trompa uterina; C: útero (corno esquerdo); D: cérvix uterino; E: gordura abdominal; F: fígado; G: cecum; H: intestino delgado	52
Figura 3 – Injeção intraperitoneal em rata	52
Figura 4 – Estruturas reprodutivas de uma rata fêmea: Ovário (em vermelho, altamente vascularizado); Tuba (em branco) e Útero (corno esquerdo). Ovário (altamente vascularizado em vermelho), tubas (brancas) e útero.....	53
Figura 5 – Tecido ovariano de ratas após excisão cirúrgica e pré-congelação. Os diâmetros desta peça correspondem a 1,45mm (vertical) por 1,35 mm (horizontal)	54
Figura 6 – Secção de tecido ovariano de ratas em lâminas para congelação	54
Figura 7 – Fluxograma dos procedimentos de criopreservação de ovários utilizados nos animais	55
Figura 8 – Fluxograma com divisão dos animais em grupos por tempo de intervalo após a castração	56
Figura 9 – Cavidade abdominal de uma rata após laparotomia evidenciando-se (seta) o reimplante de tecido ovariano no omento maior. A coloração do tecido e a ausência macroscópica de áreas de necrose sugerem boa pega do enxerto. Acima da seta, mais escuro, o fígado. Abaixo do reimplante as alças intestinais, recobertas por tecido fibrótico e aderências, surgidos após a terceira intervenção abdominal.....	57
Figura 10 – Tecido ovariano reimplantado no omento maior de ratas (ponto negro- fio de sutura)	57
Figura 11 – Tecido ovariano reimplantado no omento maior de ratas Wistar (ponto negro- fio de sutura)	58
Figura 12 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 200x. Método de coloração	61
Figura 13 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 400x. Método de coloração	62
Figura 14 – Fluxograma dos resultados do grupo de ovários das ratas submetidos à congelação lenta.....	62

Figura 15 –Folículos atrésicos de ratas após o reimplante. Magnificação de 200x. Método de coloração	63
Figura 16 –Folículos atrésicos de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 400x. Método de coloração.....	64
Figura 17 –Fluxograma dos resultados do grupo de ovários de ratas submetidos à Vitriificação	64
Figura 18 –Fluxograma dos resultados de intervalo precoce pós-castração das ratas (Grupo A).....	66
Figura 19 –Fluxograma dos resultados de intervalo tardio pós-castração de ratas (Grupo B)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Falência ovariana precoce relacionada à dose de ciclofosfamida e idade	22
Tabela 2 – Risco de FOP e nº de ciclos de CMF (ciclofosfamida, metotrexate e fluoracil)	22
Tabela 3 – Gonadotoxicidade segundo o tipo de quimioterápico.....	22
Tabela 4 – Achados histológicos após o reimplante do tecido ovariano em 20 ratas Wistar ...	67
Tabela 5 – Comparação dos desfechos – sucesso ou falha por tempo de castração de ratas ...	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCIS	<i>Automated Childhood Cancer Information</i>
AMH	Hormônio Antimulleriano
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i> (Sociedade Americana de Oncologia Clínica)
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i> (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)
CACON	Centro de Alta Complexidade em Oncologia
CFA	Ciclofosfamida
CID	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CL	Corpo Lúteo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPBS	Solução Salina Tamponada de Dulbecco
E	Estrógeno
ER	Receptor de Estrógeno
EUA	Estados Unidos da América
EUROCARE	<i>European Cancer Registry-Based Study of Survival and Care of Cancer Patients</i>
FA	Folículo Atrésico
FIV	Fertilização In Vitro
FOP	Falência Ovariana Precoce
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
FP	Folículo Primordial
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GLUT	Transportador de Glicose
HC I	Hospital do Câncer I
HEPES	Ácido Hidroxietilpiperazinetanosulfônico
HSA	Soro de Albumina Humana
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
INCA	Instituto Nacional de Câncer (<i>National Cancer Institute</i>)

LH	Hormônio Luteinizante
LLA	Leucemia Linfática Aguda
OMS	Organização Mundial da Saúde
PH	Potencial Hidrogeniônico
QT	Quimioterapia
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
RHC	Registros Hospitalares de Câncer
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i> (Vigilância, epidemiologia e resultados finais)
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TRE	Terapia de Reposição Estrogênica
V/V	Relação Volume por Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Mortalidade e sobrevida em pacientes portadoras de neoplasias	17
2.2	Falência ovariana após quimioterapia: menopausa precoce e osteoporose	21
2.3	Preservação da fertilidade em pacientes neoplásicos	25
2.4	Neoplasias em crianças	28
2.5	Técnicas de criopreservação	39
2.6	Criopreservação de tecido ovariano e restauração da fertilidade	40
2.7	Reimplante do tecido ovariano	42
2.8	Rato: modelo animal comparado na criopreservação ovariana	44
2.9	Desenvolvimento folicular	47
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo geral	50
3.2	Objetivo específicos	50
4	MÉTODOS	51
5	RESULTADOS	61
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICES	82

1 INTRODUÇÃO

Com o advento de novas terapias contra as doenças crônico-degenerativas, especialmente as neoplasias, a expectativa de vida de muitas pacientes jovens foi aumentada. Os avanços no tratamento do câncer têm permitido taxas de sobrevivência cada vez mais elevadas (ANDERSON *et al.*, 2006; BLUMENFELD, 2007; CARTER *et al.*, 2005; GREENBERG; URBACH, 2006; HEATH; STERN 2006; MALTARIS *et al.*, 2007).

Após cinco anos do diagnóstico, essa taxa excede 70% em relação a crianças e adolescentes (DECHERNEY *et al.*, 2005), aproxima-se de 80% naqueles tratados para leucemia linfoblástica aguda e ultrapassa 90% no grupo tratado por linfoma de Hodgkin (LINET *et al.*, 1999; THOMSON; WALLACE, 2004). Com esses progressos, entretanto, os sobreviventes estão expostos às consequências da Quimioterapia (QT) e/ou radioterapia. O risco relativo para morte por câncer pediátrico nos Estados Unidos chega a 1,10, para a incidência de câncer chega a 1,13 e a mortalidade geral em crianças alcança risco relativo de 1,21, todos com intervalo de confiança não contendo a unidade (BALSARA, 2013).

A elevada taxa de sobrevivência tem gerado grande interesse na qualidade de vida desses pacientes. Hoje tem sido dada mais atenção a esta questão, considerando-se a qualidade de vida física, psicológica, social e espiritual desses sobreviventes (KIM *et al.*, 2001; MAUNSELL *et al.*, 2006; PENTHEROUDAKIS; PAVLIDIS, 2007). Uma qualidade de vida satisfatória deve incluir a capacidade de constituir e criar uma família (MALTARIS *et al.*, 2006; SPEECHLEY *et al.*, 2006).

A função do ovário pode ser comprometida prematuramente como resultado de tratamento para a neoplasia (dependendo da idade do paciente), o regime de QT e os níveis de irradiação utilizados. Além disso, mesmo que a ovulação seja retomada após tratamento oncológico, a fertilidade pode ter sido comprometida. Essa perda de função reprodutiva é uma das consequências mais importantes da QT e afeta tanto o sexo masculino como o feminino (BINES; OLESKE; COBLEIGH, 1996; BLUMENFELD; HAIM, 1997; GHOSH *et al.*, 2001; GREENBERG; URBACH, 2006; IHA *et al.*, 2001; MARHHOM; COHEN, 2006; OKTAY *et al.*, 2007; SKLAR *et al.*, 2006; SÖNMEZERE; OKTAY, 2006; WALLACE; ANDERSON; BAIRD, 2004).

A Falência Ovariana Precoce (FOP) ou a perda da função ovariana durante ou logo após o tratamento ocorre em elevado número de mulheres submetidas à QT, principalmente quando realizadas com agentes alquilantes como a Ciclofosfamida (CFA). Esses agentes produzem dano ao tecido gonadal, agindo quimicamente com o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) desses tecidos, provocando queda na fertilidade e diminuição da reserva folicular (TEINTURIER, 1998).

Para esses pacientes, a manutenção da função ovariana é muitas vezes uma prioridade, com implicações diretas na qualidade de vida futura. Assim, muitas mulheres procuram atendimento médico em uma tentativa de adiar a menopausa e suas complicações e manter a função ovariana o maior tempo possível (TEINTURIER, 1998).

Diante de toda a necessidade de se programar uma rede de estratégias para a manutenção da fertilidade em pacientes portadoras de câncer, torna-se imperioso o desenvolvimento de pesquisas e protocolos experimentais de criopreservação e autotransplante. Além da busca de melhorias nas técnicas, de forma a auxiliar a responder questões sobre a forma e o tempo ideal para o reimplante do tecido ovariano, tais pesquisas devem visar ainda o treinamento de profissionais e equipes multidisciplinares que desejem oferecer às suas pacientes opções de preservação da fertilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mortalidade e sobrevida em pacientes portadoras de neoplasias

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A carga do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Naqueles, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (INCA, 2014).

Em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Baseado nos 23 Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), alimentados por uma rede de 282 Registros Hospitalares de Câncer (RHC), o sistema de morbidade por câncer calcula informações representativas da população brasileira. A esse sistema, agrega-se o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) para a elaboração da estimativa dos principais 19 tipos de câncer de ocorrência no território nacional brasileiro (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino, em 2014. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujos controles e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas até às mais desiguais (INCA, 2014).

As abordagens orientadas para enfrentar esse problema de saúde são, necessariamente, múltiplas, incluindo: ações de educação para saúde em todos os níveis da sociedade; prevenção orientada para indivíduos e grupos; geração de opinião pública; apoio e estímulo à formulação de legislação específica para o enfrentamento de fatores de risco relacionados à doença; e fortalecimento de ações em escolas e ambientes de trabalho (INCA, 2014).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) (*National Cancer Institute*) nos Estados Unidos cita que entre 1987 e 1999 houve aumento de 0,3% ao ano na incidência de câncer em mulheres. Apesar desse aumento, a mortalidade por câncer em mulheres diminuiu 0,6% ao ano no mesmo período (MARHHOM; COHEN, 2006). De 1999 a 2010, a curva no gráfico de novos casos tem sem mantido estável, com leve decréscimo matemático. Em 1992 eram 500 novos casos para cada 100 mil habitantes. Em 2010, esse valor aproxima-se a 480 (INCA, 2014).

Dados do governo americano revelam ainda que, em 2013, 1.660.290 pessoas possuíam diagnóstico de câncer. Destas, aproximadamente 3,6%, ou 60.000, encontram-se abaixo de 35 anos de idade (www.seer.cancer.gov) e a quantidade de mortes estimadas é de 580 mil. Já o percentual de sobrevivência em cinco anos chega a 65,8%, quando analisados dados entre 2003 e 2009 (INCA, 2014).

Nos Estados Unidos, estimava-se que entre 2006 e 2010, 411 mulheres em cada 100.000 desenvolveram câncer. Aproximadamente um em 1.000 adultos era sobrevivente ao câncer (DECHERNEY *et al.*, 2005) e, em 2010, uma em 250 mulheres seria sobrevivente de câncer (MALTARIS *et al.*, 2006; MARRHOM; COHEN, 2006).

No Brasil, segundo dados do INCA, em 2008 foram diagnosticados 74.620 novos casos de câncer em mulheres, levando à incidência de 325 casos por 100.000. A taxa de mortalidade no sexo feminino no período de 1995 a 1999 encontrava-se em 56,88 por 100.000 mulheres. Em 2014 a estimativa de novos casos de câncer em mulheres é de 274.230 casos. (INCA, 2014).

Alguns autores descrevem taxa de sobrevida próxima de 90% para portadores de linfoma de Hodgkin (LINET *et al.*, 1999; MAGRATH, 1997; OKTAY *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, mais de 90% das neoplasias malignas de mama são diagnosticadas em estágio inicial, alcançando taxa de sobrevida acima de 80% em cinco anos (JEMAL *et al.*, 2006). Na Austrália e Nova Zelândia, cerca de 750 crianças e adolescentes recebem anualmente o diagnóstico de câncer, sendo que atualmente o esperado é que em torno de 75% delas sejam sobreviventes em longo prazo. Uma pesquisa realizada em centros de oncologia pediátrica nesses países mostrou que todos esses centros oferecem criopreservação de sêmen e, apesar de ser experimental, a preservação do tecido ovariano é oferecida em 83% deles. Dois entre 13 desses centros utilizam os análogos do GnRH para proteção da fertilidade em meninas pós-púberes, apesar de não apresentarem protocolos para este uso (HEATH; STERN, 2006).

Quando se pesquisa pelos principais cânceres em mulheres nos países em desenvolvimento, destacam-se: câncer de mama, de colo do útero e de pulmão. Destes, o mais associado com a possibilidade de preservação de fertilidade é o de mama. Em um dos principais programas públicos de preservação de fertilidade na Europa, o programa valenciano de infertilidade, as duas principais neoplasias que demandam criopreservação ovariana são o câncer de mama e a doença de Hodgkin (INCA, 2014).

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Suas taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas em 2012 na Europa Ocidental (96/ 100 mil) e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental (27/ 100 mil), (INCA, 2014).

Mais de 80% dos cânceres de mama têm origem no epitélio ductal, enquanto a minoria se origina do epitélio lobular. Nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando nos países desenvolvidos e, atualmente, é de 85% em cinco anos, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60%. O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012. É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (INCA, 2014).

A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos. Após essa idade, o aumento ocorre de forma mais lenta, o que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença. Cerca de quatro em cada cinco casos ocorrem após os 50 anos (INCA, 2014).

A história familiar de câncer de mama está associada a um aumento no risco de cerca de duas a três vezes para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Alterações em alguns genes, por exemplo, BRCA1 e BRCA2, aumentam o risco de desenvolver câncer de mama, embora essas mutações sejam raras e contribuam para uma parcela mínima de casos de câncer de mama. Cerca de nove em cada 10 casos ocorrem em mulheres sem história familiar (INCA, 2014).

Amamentação, prática de atividade física e alimentação saudável com a manutenção do peso corporal estão associadas a um menor risco de desenvolver esse tipo de câncer. A prevenção primária dessa neoplasia é um campo de pesquisa e de intervenções bastante promissor. Cerca de 30% dos casos de câncer de mama podem ser evitados por medidas como uma alimentação saudável, prática de atividade física regular e manutenção do peso ideal (INCA, 2014).

No Brasil, a mamografia bienal para mulheres entre 50 a 69 anos e o exame clínico das mamas anualmente a partir dos 40 anos é a estratégia recomendada para a detecção precoce do câncer de mama em mulheres com risco padrão. Para as mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau), recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos (INCA, 2014).

Nos últimos três anos, o INCA e o Ministério da Saúde vêm ampliando a estratégia de “estar alerta” (*awareness*) à população feminina e aos profissionais de saúde. Essa estratégia de comunicação preconiza que todas as mulheres devem conhecer os principais fatores de risco para o câncer de mama, a idade de maior risco de ocorrência da doença e seus mais frequentes sinais e sintomas. Também recomenda que as mulheres, ao identificarem tais sinais e sintomas, procurem imediatamente um serviço de saúde para esclarecimento diagnóstico (INCA, 2014).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. A sobrevida em um, cinco, dez e 20 anos, em países desenvolvidos, como a Inglaterra, é de 95,8%, 85,1%, 77% e 64% respectivamente. O estudo do INCA, já citado acima, apresentou, para o câncer de mama, uma sobrevida aproximada de 80% (INCA, 2014).

2.2 Falência ovariana após quimioterapia: menopausa precoce e osteoporose

As mulheres submetidas a tratamento oncológicos podem apresnetar desde irregularidades menstruais até a FOP, e ainda a infertilidade, devido ao dano germinal com redução do pool e da qualidade folicular (DOMINGO, 2013).

O grupo de risco para FOP aumenta de acordo com a idade e está relacionado com vários outros fatores como dose e tempo de quimioterapia, dose total de radiação, tipos e esquemas quimioterápicos utilizados e ainda pode variar de acordo com a resposta individual de cada paciente. O risco de FOP em adolescentes aumenta em média quatro vezes, podendo chegar a vinte e quatro vezes se o grupo etário estiver entre 21 e 35 anos (DOMINGO, 2013).

O efeito da QT sobre o ovário não obedece à lei do “tudo ou nada”, mas pode ser agudo e cumulativo. Os ovários possuem uma capacidade limitada de recuperação. O número de folículos primordiais que sobrevivem após a exposição às drogas vai depender de uma série de fatores, destacando-se entre os principais: 1) Idade: O risco de gonadotoxicidade está diretamente relacionado à idade. Por volta de 40% das mulheres terão FOP com menos de 40 anos de idade. Esse valor, se a idade for maior que 40 anos, pode chegar a 76%; 2) Tipo de câncer: o linfoma é o tipo de câncer que mais afeta a fertilidade feminina, seguida do câncer de mama. Seguem as leucemias, cânceres digestivos, ovário, de colo uterino, ósseo e de tireoide; 3) Dose, número de ciclos e tipo de agente utilizado: uma dose acumulada de 20,4 gramas de ciclofosfamida em mulheres de 20 a 25 anos pode provocar esterilidade, quando associado em esquemas múltiplos sua toxicidade aumenta, conforme tabelas 1, 2 e 3 (DOMINGO, 2013).

Tabela 1 – Falência ovariana precoce relacionada à dose de ciclofosfamida e idade

Idade (anos)	Dose Total (g)
> 40	5,2
30-39	9,3
20-29	20,4

Fonte: Adaptada pelo autor de Domingo (2013).

Tabela 2 – Risco de FOP e nº de ciclos de CMF (ciclofosfamida, metotrexate e fluoracil)

Nº Ciclos CMF	30 anos	40 - 50 anos
1	10%	33%
6	33%	81%
12	61%	95%

Fonte: Adaptada pelo autor de Domingo (2013).

Tabela 3 – Gonadotoxicidade segundo o tipo de quimioterápico

ALTO RISCO	MÉDIO RISCO	BAIXO RISCO
CICLOFOSFAMIDA	CISPLATINA	METOTREXATE
CLORAMBUCIL	ADRIAMICINA	5-FLUORACIL
MELFALAN	DOXORRUBICINA	VINCRISTINA
PROCARBACINA		BLEOMICINA
BISSULFAN		ACTINOMICINA D

Fonte: Adaptada pelo autor de Domingo (2013).

A QT é geralmente administrada como parte do tratamento do câncer, mas também pode ser dado a mulheres com doenças do tecido conjuntivo graves, como lúpus eritematoso sistêmico ou doenças renais, tais como granulomatose de Wegener. As taxas de sobrevivência para muitos tipos de câncer em mulheres em idade reprodutiva estão

umentando. No entanto, muitos tratamentos utilizados para combater a doença apresentam um risco substancial para a infertilidade futura (HSU *et al.*, 2014).

A QT é tóxica para os ovários causando perda de ovos e destruição do tecido ovariano de apoio. Isto pode causar cessação temporária dos períodos menstruais ou menopausa precoce, que podem se desenvolver rapidamente ou gradualmente (HSU *et al.*, 2014).

Para a Sociedade Australiana de Menopausa, essa fase é chamada de menopausa prematura ou falência ovariana prematura em mulheres com menos de 40 anos de idade. Aquela que ocorre entre 40-45 anos de idade é chamada de menopausa precoce. O diagnóstico de insuficiência ovariana devido à menopausa prematura ou precoce tem importantes consequências físicas e psicológicas em longo prazo.

A menopausa pode ser um período muito doloroso e debilitante, com uma série de manifestações que acompanham, incluindo sintomas vasomotores, insônia, dor de cabeça, distúrbios genito – urinários, flutuações da libido, alterações osteoarticulares e osteoporose (BINKLEY, 2005).

Em uma importante publicação de revisão, as chances de gestação espontânea foram estimadas em 28% e de 5% para mulheres com menos de 20 e mais de 25 anos de idade, respectivamente, após o tratamento para câncer com radioterapia e QT (LOBO, 2005).

A menopausa precoce não apresenta sintomas isolados, pelo contrário, sua gama de apresentações destacam vários distúrbios funcionais, tais como disfunção sexual, níveis alterados de lipoproteínas, maior risco de osteoporose e ainda de doenças cardíacas. Alguns trabalhos inclusive associam-na a distúrbios do sono e quadro neurológicos, como alterações de cognição e demência (DAVIS, 1996; ROCCA, 2014; SPEROFF 1991).

A osteoporose, caracterizada por diminuição significativa da densidade mineral óssea e por considerável aumento do risco de fraturas, é uma das doenças mais comuns e incapacitantes associadas com o envelhecimento em mulheres. Quando associada ao processo normal de envelhecimento é classificada como primária. Porém, quando associada a outras patologias, os pesquisadores chamam-na de osteoporose secundária (HSU *et al.*, 2014).

A osteoporose primária é mais comumente causada por perda de estrogênio nas mulheres após a menopausa. Perda óssea relacionada à idade pode afetar também os homens, principalmente a partir de seus 70 anos (HSU *et al.*, 2014).

Identifica-se atualmente uma lista crescente de fatores que contribuem para a deterioração dos ossos, incluindo doenças crônicas e alguns dos medicamentos usados para tratá-las. Em mono ou politerapia, tais medicamentos podem interferir no metabolismo ósseo, alterando o equilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos. Alguns medicamentos podem inclusive alterar a absorção de nutrientes importantes na dinâmica óssea, como o cálcio e vitamina D (HSU *et al.*, 2014).

Como a osteoporose não se apresenta com sintomas evidentes, não é incomum que ela diagnosticada até que o paciente sofra uma fratura. Tem-se aumentado esforços para identificar os pacientes que estão em risco para a osteoporose secundária de forma cada vez mais precoce, diante da possibilidade iminente da fragilidade óssea e o risco acentuado de lesão e incapacidade (HSU *et al.*, 2014).

As principais medidas recomendadas incluem: a realização da densitometria óssea para os pacientes que não estariam normalmente nos critérios de inclusão para a realização dos exames de forma rotineira; o tratamento de doenças que contribuam para a perda de massa óssea; mudanças de estilo de vida e ainda suplementos de cálcio e de vitamina D, ou medicamentos específicos para osteoporose como bifosfonados, por exemplo (HSU *et al.*, 2014).

A osteoporose secundária é cada vez mais diagnosticada em pacientes jovens com câncer, doença celíaca, artrite reumatóide e doença inflamatória do intestino, bem como naqueles que fazem uso de medicamentos para úlceras e doença do refluxo gastro-esofágico e alguns antidepressivos. Estão em risco de osteoporose secundária ainda os pacientes pós-cirurgia bariátrica bem como aqueles que recebem tratamentos hormonais para evitar a recidiva de câncer de mama ou de próstata (HSU *et al.*, 2014).

Uso de corticosteróides, como prednisona, por exemplo, aumenta o risco, de acordo com o American College of Rheumatology. Drogas antiinflamatórias e aquelas utilizadas para prevenir a rejeição de órgãos após transplante têm um efeito negativo direto

sobre as células do osso e podem interferir com o metabolismo de cálcio no organismo (HSU *et al.*, 2014).

De acordo com a *National Osteoporosis Foundation*, nove milhões de adultos nos Estados Unidos da América (EUA) têm osteoporose e um adicional de 43 milhões têm baixa densidade mineral óssea, ou osteopenia, o que aumenta o risco de osteoporose e fraturas. A mesma fundação estima que até 2030, o número de adultos acima de 50 anos com osteoporose e baixa massa óssea vai crescer mais de 30%, podendo chegar ao número de 68 milhões (HSU *et al.*, 2014).

Em 2013, um estudo realizado por pesquisadores da *Universidade Loyola Medical Center*, em Maywood, Illinois, descobriu que causas secundárias de perda óssea estão relatadas em até 60% dos homens, mais de 50% das mulheres na pré-menopausa e cerca de 30% das mulheres na pós-menopausa que são diagnosticados com osteoporose (HSU *et al.*, 2014).

Os inibidores de aromatase, drogas hormonais utilizadas para o câncer de mama, também podem causar perda óssea. Nestes casos, a associação com bifosfonados pode ajudar a combater a perda óssea (HSU *et al.*, 2014).

2.3 Preservação da fertilidade em pacientes neoplásicos

As evidências disponíveis sugerem que a preservação da fertilidade constitui uma importante preocupação para a população com câncer (IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008), mas esse fato é desconhecido pelos oncologistas, uma vez que eles geralmente não questionam sobre este assunto e raramente este tópico é abordado pelo paciente (GANZ *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2006; MALTARIS *et al.*, 2007). Uma pesquisa realizada por meio da internet mostrou que, para 29% das mulheres, a preocupação com a fertilidade poderia influenciar a decisão no tratamento de neoplasias (PARTRIDGE; WINER, 2004).

Durante a 4ª Conferência Internacional em Medicina do Câncer em Adolescentes e Jovens (*4th International Conference on Teenage and Young Adult Cancer Medicine*), ocorrida em Londres em março de 2006, especialistas dissertaram sobre a importância de se discutir com os jovens que se submeterão à QT as possíveis consequências do tratamento na

sua fertilidade futura e oferecer-lhes as opções cabíveis para manutenção da fertilidade. Adam Glaser afirmou que em uma pesquisa realizada com 271 jovens pacientes portadores de câncer, apenas 34% tinham sido alertados sobre os possíveis danos na fertilidade, sendo que, destes, apenas 27% receberam essa informação antes do início da QT (LEE *et al.*, 2006).

A *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) e a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) recomendam que os oncologistas avaliem os possíveis danos da QT na fertilidade e alertem os pacientes sobre esses danos e as possibilidades existentes para minimizá-los (ASRM, 2005; LEE *et al.*, 2006).

As principais alternativas para a preservação de fertilidade usadas na rotina clínica são limitadas à proteção dos ovários contra a radiação (ooforopexia) ou retirada de oócitos com posterior utilização da Fertilização In Vitro (FIV), e em seguida criopreservação dos oócitos ou de embriões (OKTAY, 2007). Embora ooforopexia possa oferecer alguma proteção para as células germinativas, esta técnica pode reduzir muito as chances de futuras gestações bem-sucedidas (WALLACE *et al.*, 2004).

Há também sérias limitações no uso de FIV em pacientes com câncer. Isso se deve principalmente aos protocolos de estimulação hormonal necessários para a obtenção de ovos maduros, o que pode atrasar o início do tratamento do câncer e, portanto, não é recomendado para pacientes pré-púberes (OKTAY, 2007) além do fato de que alguns tumores possuem receptores hormonais, contra-indicando a estimulação nesses casos. Danos às células germinativas de ovários causados por radioterapia e / ou quimioterapia podem ser evitados pela remoção e criopreservação de fragmentos do ovário antes do início da terapia, de forma a manter o tecido imaturo não exposto às drogas citotóxicas e propiciar uma possível restauração da fertilidade (SHEA *et al.*, 2008).

O transplante de tecido do ovário e a cultura de folículo in vitro estão emergindo como abordagens promissoras para a restauração de fertilidade, especialmente em mulheres que são submetidas a tratamentos oncológicos, que não podem postergar o início da QT ou ainda que não são boas candidatas para a FIV (WOODRUFF, 2008).

Apesar do transplante de tecido ovariano já ter produzido sucesso viável em humanos (DORR *et al.*, 2004; MEIROW *et al.*, 2005), a abordagem da cultura de folículos

ovarianos *in vitro* tem sido considerada mais segura porque elimina a possibilidade de reintrodução de células cancerosas para a paciente (SHEA *et al.*, 2008). Embora a viabilidade e a capacidade de desenvolvimento de células após a meiose de oócitos humanos cultivados a partir de etapas em fases pré-antrais *in vitro* não tenham sido ainda descritas, os estudos em animais indicam que, a cultura folicular *in vitro* pode ser uma perspectiva promissora em seres humanos (SHEA *et al.*, 2008).

A determinação do impacto da QT na função reprodutiva é importante antes de se pensar na preservação desta. Como citado anteriormente, esse impacto tem sido investigado a partir da história menstrual, do uso de marcadores bioquímicos como o Hormônio Antimülleriano (AMH), inibinas, Estrógeno (ER) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e da avaliação ultra-sonográfica do volume ovariano e contagem de folículos antrais (ANDERSON *et al.*, 2006; BATH *et al.*, 2003; BLUMENFELD, 2007; LANTINGA *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2003).

Em 2006, a ASCO publicou recomendações para a preservação da fertilidade em pacientes com câncer. Nessas recomendações inclui-se o resultado de uma busca na literatura por artigos relacionados ao tema. A pesquisa bibliográfica foi realizada entre 1987 e 2005 utilizando-se as bases de dados MEDLINE, PreMEDLINE, Cochrane Library, *National Cancer Institute database* e *National Library of Medicine's clinical trials*. O Painel de especialistas selecionou 405 artigos. Não foi possível a realização de metanálises devido ao baixo número de pacientes e heterogeneidade entre os artigos.

A revisão da literatura descobriu poucas pesquisas randomizadas ou que apresentem números suficientes de pacientes. A maioria dos dados era de estudos de coorte, série ou relato de casos ou pequenos estudos clínicos não randomizados. O Painel encorajou o desenvolvimento de estudos adicionais bem desenhados, mas reconheceu que estudos terapêuticos controlados, randomizados ou duplo-cegos em humanos possivelmente não podem ser realizados nesta área.

As opções de preservação da fertilidade em mulheres dependem: da idade da paciente, tipo de tratamento, diagnóstico, possibilidade de envolvimento ovariano, se ela tem ou não um parceiro – implicando no tempo em que ela pode esperar até a tentativa da gestação, o tempo disponível antes de se iniciar a QT e o potencial de metástase ovariana (ASRM, 2005;

LEE *et al.*, 2006; OKTAY, 2007). Ao contrário do sério dano gonadal observado em mulheres adultas submetidas à QT, a função ovariana é preservada na maioria das pacientes pré-púberes submetidas a esses tratamentos (IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; ORTIN; SHOS-TAK; DONALDSON, 1990). Isto sugere, como citado anteriormente, que os danos da QT são maiores nas células germinativas em maturação (RIVKEES; CRAWFORD, 1988; WALLACE *et al.*, 1993). As células em divisão são mais sensíveis aos efeitos dos agentes alquilantes que as células em repouso (BLUMENFELD *et al.*, 2002; BLUMENFELD, 2007). Portanto, a supressão do funcionamento ovariano parece ser um mecanismo capaz de preservar a fertilidade feminina.

Diferentes terapêuticas não invasivas têm sido usadas para evitar a FOP pós-QT. Todos esses regimes se focam na interrupção da maturação oocitária durante a QT. Absolom *et al.* (2006) citam que usuárias de contraceptivos orais apresentavam incidência de FOP mais baixa (12%) que as não-usuárias (40%). Estudos iniciais foram então realizados com contraceptivos orais na tentativa de se evitar o dano ovariano. Entretanto, como esses medicamentos não são capazes de promover inibição ovariana completa, seu uso foi abandonado (CHAMPAN; SUTCLIFFE, 1981; FALCONE *et al.*, 2004; LETTERIE, 2004). Além disto, o uso de estrogênios e progestagênos não é seguro em pacientes com câncer hormônio-dependente (BOKSER; SZENDE; SCHALLY, 1990).

2.4 Neoplasias em crianças

O câncer infanto-juvenil (abaixo de 19 anos) é considerado raro quando comparado com os tumores do adulto, correspondendo entre 2% e 3% de todos os tumores malignos. Estimativa realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o biênio 2008/09 revelava que ocorreriam cerca de 9.890 casos por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade (INCA, 2008). O Brasil possui uma considerável população jovem. A estimativa populacional para o ano de 2007 apontava que 38% da população brasileira encontrava-se abaixo dos 19 anos (INCA, 2008).

As taxas de mortalidade por câncer são as melhores medidas do progresso na luta contra o câncer (*Extramural Committee to Access Measures of Progress Against Cancer*, 1990). No Brasil, em 2005, a mortalidade por câncer em crianças e adolescentes com idade entre 1 e 19 anos correspondeu a 8% de todos os óbitos, colocando-se, assim, como a segunda

causa de morte nesta faixa etária. Considerando-se que a primeira causa de mortalidade refere-se às causas externas, como acidentes e violências, entende-se que a mortalidade por câncer é, atualmente, a primeira causa de mortes por doença nesta população. Tal constatação implica relacionar esse perfil de óbitos à organização específica dos serviços de saúde, particularmente da rede de atenção à saúde da criança e do adolescente, trazendo novos desafios para a atenção oncológica e o Sistema Único de Saúde (SUS), (INCA, 2008).

Em países desenvolvidos, o câncer pediátrico é a segunda causa de óbito entre 0 e 14 anos, atrás apenas dos acidentes (LITTLE, 1999). Em 2008, destacava-se como a mais importante causa de óbito nos países em desenvolvimento. Isto talvez se deva às atuais políticas de prevenção em outras doenças infantis (INCA, 2008).

Atualmente, de forma semelhante aos países desenvolvidos, no Brasil, o câncer já representa a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, para todas as regiões (BRASIL, 2013).

Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Hoje, em torno de 70% das crianças e adolescentes acometidos de câncer podem ser curados, se diagnosticados precocemente e tratados em centros especializados. A maioria deles terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado (BRASIL, 2013).

O câncer infanto-juvenil deve ser estudado separadamente do câncer do adulto por apresentar diferenças nos locais primários, diferentes origens histológicas e diferentes comportamentos clínicos. Tende a apresentar menores períodos de latência, costuma crescer rapidamente e torna-se bastante invasivo, porém responde melhor à QT. A maioria dos tumores pediátricos apresenta achados histológicos que se assemelham a tecidos fetais nos diferentes estágios de desenvolvimento, sendo considerados embrionários. Essa semelhança a estruturas embrionárias gera grande diversidade morfológica resultante das constantes transformações celulares, podendo haver um grau variado de diferenciação celular (INCA, 2014).

Por essa razão, as classificações utilizadas nos tumores pediátricos diferem das utilizadas nos adultos, sendo a morfologia o principal aspecto considerado. A IARC propôs

uma classificação descrita por Birch e Marsden (1987), modificada por Kramarova e Stiller (1996) e utilizada atualmente pelos registros populacionais (INCA, 2008).

O principal componente na vigilância epidemiológica do câncer é representado pelo acompanhamento contínuo da incidência da doença regionalmente. Tal atividade é tipicamente realizada por RCBP. No Brasil existem, atualmente, 28 RCBP implantados ou em fase de implantação. Destes, 20 possuem informações consolidadas, isto é, pelo menos um ano de informação sobre casos novos (incidência) (INCA, 2008). Hoje, apenas quatro estados de nossa unidade federativa não têm RCBP, conforme consta no site oficial do INCA.

A primeira grande compilação de informações sobre a incidência de câncer na infância no mundo foi publicada por Parkin (1988). Estas informações foram baseadas em registros de câncer codificados de acordo com o tipo de neoplasia e não simplesmente por sítio anatômico. Para o Brasil foram apresentadas informações dos RCBP de São Paulo (1969-1978), Recife (1967-1979) e Fortaleza (1978-1980). As informações foram apresentadas estratificadas por faixa etária (menores de 1 ano, 1 a 4 anos, 5 a 9 anos, 10 a 14 anos) e sexo. Nestas localidades, as leucemias foram o tipo de câncer mais incidente em praticamente todas as faixas etárias, tanto no sexo masculino como no feminino (INCA, 2014).

Nos Estados Unidos, na área coberta pelo programa *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) entre os anos de 1990 e 1995, a taxa média de incidência anual, ajustada pela população padrão americana de 1970, foi de 149 casos por 1.000.000 de crianças e adolescentes menores de 20 anos (RIES, 1999). Na faixa etária compreendida entre 0 e 14 anos a Leucemia Linfática Aguda (LLA) foi o tumor mais comum, correspondendo a 23% dos cânceres. A leucemia não-linfoide ou mielóide aguda foi o segundo tipo mais comum, ocorrendo numa taxa de 1/5 da LLA. Os tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) corresponderam a 22,1% e em conjunto com ambas as leucemias corresponderam à metade de todos os cânceres que ocorreram nessa faixa etária. Os outros tipos de tumor sólidos mais comuns foram o neuroblastoma (7,7%), seguido do tumor de Wilms (5,9%) e linfoma não-Hodgkin (5,9%) (INCA, 2008).

Na Europa, informações do projeto *Automated Childhood Cancer Information* (ACCIS) relatam uma taxa média de incidência ajustada por idade, pela população padrão mundial de 1966, de 140 casos novos por 1.000.000 de crianças entre 0 e 14 anos e de 157

casos novos por 1.000.000 de crianças e adolescentes entre 0 e 19 anos (Steliarova-Foucher, 2004).

No Reino Unido, a incidência anual em crianças abaixo de 15 anos, entre 1991 a 2000, foi de 139 por milhão (STILLER, 2007).

Um estudo americano posterior, abrangendo mais de 90% da população daquele país, apontou que para o período compreendido entre 2001 e 2003 a taxa média de incidência ajustada por idade foi de 165,92 por milhão de crianças e adolescentes (0 a 19 anos). Para o sexo masculino, a incidência média foi de 174,28 por milhão e no sexo feminino 157,14 por milhão (LI, 2008).

Os RCBP de São Paulo e Fortaleza apresentaram altas taxas de incidência em todos os tipos de câncer. Nestes registros, para o sexo masculino, os linfomas foram os mais incidentes na faixa etária entre 5 e 9 anos, com taxas de 45,9 e 53,1 por milhão de habitantes, respectivamente. As taxas de LLA, ao contrário do observado em outros registros no mundo, foram baixas, principalmente na faixa etária de 1 a 4 anos considerada pico de incidência. As taxas de retinoblastoma, tumores ósseos e carcinoma adrenal também foram altas em São Paulo. Em Fortaleza observou-se que no sexo feminino, na faixa etária de 1 a 4 anos, os tumores renais foram o tipo mais incidente (41,4 por milhão de habitantes), fato considerado uma exceção. Outra exceção aconteceu em Recife, também no sexo feminino, na faixa etária de 5 a 9 anos, onde os tumores de SNC foram os mais incidentes (18,6 por milhão de habitantes) (INCA, 2014).

A segunda publicação da IARC mostrou os resultados dos RCBP de Goiânia (1989-1994) e Belém (1987-1991) (PARKIN, 1998). As leucemias foram o tipo mais incidente nestas localidades. O segundo tumor mais incidente para o sexo masculino foram os linfomas, seguido pelos tumores de SNC. Já para o sexo feminino esta ordem se inverte. Em Goiânia, as taxas de incidência de tumores renais, tumores ósseos e sarcomas foram expressivamente maiores no sexo feminino (13,6; 1,7; 13,6 por milhão, respectivamente). (INCA, 2008).

Em 2004, o RCBP de São Paulo publicou uma monografia com informações de incidência do ano de 1969 e no período 1997-1998. A taxa ajustada de incidência de câncer

em menores de 15 anos no município de São Paulo foi de 128,5 por milhão para o sexo masculino e 120,98 por milhão para o sexo feminino em 1969; enquanto no período 1997-1998 esse número foi de 222,47 por milhão no sexo masculino e 195,03 por milhão no sexo feminino. A faixa etária de maior incidência foi a de 0 a 4 anos, seguida pela faixa etária entre 5 a 9 anos (INCA, 2008).

Na cidade de São Paulo existe um registro de base hospitalar situado na Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP) cuja finalidade é reorganizar o Registro Hospitalar de Câncer do estado, mantendo um banco de dados de pacientes com câncer de abrangência estadual. Atualmente 63 hospitais alimentam a base estadual, sendo 52 deles cadastrados como Centro de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), (INCA, 2014).

Na mesma capital, na faixa etária pediátrica (0 a 18 anos), desde o ano de 2000 até junho de 2008, foram registrados 8.768 casos, correspondendo a 3,2% do total. Os tipos mais frequentes foram leucemias (25,7%), linfomas (16,3%) e tumores do SNC (12,8%), (INCA, 2008).

O RHC do Hospital do Câncer Antônio Carlos Camargo, em São Paulo, publicou resultados dos anos de 1988 e 1994, nos quais foram registradas 322 crianças em 1988 e 256 em 1994. Estes valores corresponderam a 9% dos cânceres registrados no hospital. Leucemias e linfomas corresponderam a 31,5% e tumores sólidos a 68,5% (INCA, 2008).

As informações publicadas pelo RHC do Hospital Erasto Gaertner, em Curitiba, para o período de 2000 a 2004, mostram que foram registrados 436 pacientes com idade entre 0 e 19 anos. Os pacientes pediátricos (menores de 15 anos) representaram 2,4% do total de casos admitidos no RHC e os pacientes adolescentes (entre 15 e 19 anos) representaram 1,5% do total. As neoplasias mais frequentes para os casos pediátricos foram leucemias (23,1%), linfomas (16,0%) e os tumores do SNC (13,1%). Nos adolescentes, os carcinomas e outras neoplasias epiteliais malignas (22,0%), os linfomas (20,8%) e as leucemias (14,9%) foram os tipos mais frequentes (INCA, 2008).

No INCA, por meio das informações do RHC do Hospital do Câncer I (HC I), no Rio de Janeiro, para o período de 1983 a 2005, observou-se o registro de 112.583 pacientes, dos quais 61.101 eram homens (54,3%) e 51.482 mulheres (45,7%). Na faixa etária de 0 a 19

anos foram cadastrados 3.199 pacientes, 2,8% do total. Estes corresponderam a 2,9% do total dos casos no sexo masculino e 2,8% dos casos no sexo feminino. Do total de casos de câncer em crianças e adolescentes, 1.745 foram no sexo masculino (54,5%) e 1.454 no feminino (45,5%). Os tumores mais frequentes, para os casos pediátricos, foram os classificados no Grupo XI – Carcinomas e outras neoplasias malignas epiteliais (28,1%), Grupo I – Leucemias (15,0%), Grupo VIII – Tumores ósseos malignos (13,8%), Grupo II – Linfomas e outras neoplasias reticuloendoteliais (10,1%) e Grupo IX – Sarcomas de partes moles (7,3%), representando uma ocorrência de 74,3% dos casos. Os tumores classificados como Grupo VI – Tumores renais representaram 6,2% e os do Grupo III – SNC e miscelânea de neoplasias intracranianas e intraespinhais corresponderam a 5,8% (INCA, 2008).

A causa específica do óbito, frequentemente, não é bem caracterizada e muitas vezes faltam informações médicas, gerando discordâncias sobre a validade das taxas de mortalidade específica ao câncer. A mortalidade por câncer deve incluir não somente os óbitos relacionados ao próprio câncer, mas também os óbitos relacionados ao tratamento. Existem algumas evidências de que estes nem sempre são atribuídos ao câncer. Atribui-se ao óbito precoce durante o primeiro mês mais a toxicidade da QT do que a progressão da doença (INCA, 2008).

Os óbitos relacionados à sepse em pacientes com neutropenia, durante o tratamento, consistem na causa mais frequente de mortalidade. Outras causas como toxicidade neurológica, cardíaca e renal também não são raras. Na especialidade cirúrgica, o óbito que ocorre até 30 dias após o procedimento cirúrgico é considerado óbito operatório, porém em pacientes oncológicos questiona-se se esta definição é correta. A proporção de óbitos não atribuídos ao câncer foi mais elevada durante o período imediato após a cirurgia. Os autores sugerem que a taxa de mortalidade relacionada ao câncer foi subestimada de 1% a 2% (INCA, 2014).

A determinação da causa do óbito é um processo complexo, porém se a proposta é determinar o progresso contra o câncer deve se incluir os óbitos relacionados ao tratamento e ao diagnóstico, o que não interfere na importância de distinguir os óbitos causados pela doença e os causados pelo tratamento. Embora exista uma padronização para classificar as causas de óbitos utilizando a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID), ainda existe uma discordância na atribuição correta da causa de

óbito entre os médicos (INCA, 2014).

A mortalidade das crianças acometidas pelo câncer, em especial as portadoras de leucemias, linfomas e tumores sólidos, apresentou um declínio importante a partir de 1960 em áreas desenvolvidas, tais como América do Norte, Europa Central, Japão e Oceania. Declínios menos importantes e mais lentos foram observados na região Leste da Europa, América do Sul e outras áreas menos desenvolvidas. Desde 1980 as taxas continuaram caindo, porém com padrão menos acentuado (INCA, 2008).

As taxas de mortalidade do Reino Unido, provenientes do registro nacional de tumores infantis, foram recentemente descritas para o período compreendido de 1965 a 2004. Considerando todas as idades, a taxa de mortalidade entre 2000 e 2004 foi menos que a metade quando comparada com o período de 1965 a 1969. As taxas de mortalidade das crianças portadoras de leucemias apresentaram um importante decréscimo, especialmente se comparadas aos primeiros anos do período. Este declínio foi maior para as crianças de 1 a 4 anos e menos acentuado para o grupo entre 10 e 14 anos. As taxas de mortalidade por tumores do SNC passaram de 15,51 por milhão de crianças por ano, no período entre 1965-1969, para 9,93 por milhão de crianças por ano entre 2000-2004. Observou-se que as taxas de mortalidade para as crianças portadoras de neuroblastoma apresentaram um decréscimo importante nos primeiros 20 anos, estabilizando no restante do período (INCA, 2008).

Este decréscimo diminuiu consideravelmente entre as crianças de 1 a 4 anos enquanto que nas outras idades não foi observado o mesmo declínio. Em crianças portadoras de tumores renais as taxas de mortalidade passaram de 4,91 por milhão de crianças por ano entre 1965-1969 para 1,35 por milhão de crianças por ano entre 1985-1989, tornando-se estável para o restante do período. Houve uma redução das taxas de mortalidade nas crianças portadoras de retinoblastoma, tumores hepáticos, sarcomas de partes moles e tumores de células germinativas (INCA, 2008).

As taxas em crianças portadoras de tumores ósseos passaram de 2,62 por milhão de crianças por ano, em 1965-1969, para 1,60 por milhão de crianças por ano em 2000-2004. Durante o período 1965-1969, a mortalidade por câncer representou 15% de todos os óbitos em crianças, passando para 21% no período 2000-2004. A queda da mortalidade infantil foi mais acentuada do que a da mortalidade em crianças portadoras de câncer (STILLER, 2007).

Diversos fatores podem interferir na probabilidade de sobrevida no câncer pediátrico. Um dos principais é o atraso do diagnóstico. A demora na procura de cuidados médicos pode ser consequência da precariedade dos serviços de saúde, falta de percepção da possibilidade de cura tanto do leigo como da classe médica e até mesmo barreiras religiosas. O diagnóstico do câncer depende do esforço do paciente e de sua família em procurar o serviço médico no início dos sintomas e da perspicácia e sabedoria do médico em considerar a possibilidade de câncer, estabelecendo o pronto diagnóstico e adequado encaminhamento. Os sinais e sintomas são muito inespecíficos, confundindo-se com moléstias frequentes da infância. Diferentemente de alguns tumores no adulto, o rastreamento para o câncer pediátrico é extremamente discutível. Programas de rastreamento para detecção precoce do neuroblastoma (tumor produtor de catecolaminas) foram conduzidos no Japão, nos EUA e na Europa. Os resultados mostraram que não foi possível detectar os tumores mais agressivos em estádios mais precoces, tampouco diminuir a mortalidade. O diagnóstico precoce continua sendo um desafio ao pediatra. Existem diversos outros fatores que podem influenciar o prognóstico: hospedeiro (sexo, idade, etnia, co-morbidade, fatores sócio-econômicos); tumor (extensão, local primário, morfologia e biologia); sistema de saúde (rastreamento, facilidades de diagnóstico e tratamento, qualidade do tratamento e acompanhamento), (INCA, 2008).

A taxa de sobrevida é um dos indicadores mais importantes para o conhecimento do cuidado adequado à criança com câncer. Na população adulta, a prevenção primária e o diagnóstico precoce são as ferramentas mais importantes contra o câncer, ficando a terapêutica em segundo plano. Na população infantil, tanto a prevenção como o diagnóstico precoce são extremamente difíceis (INCA, 2008).

A terapêutica progrediu imensamente, tornando-se a principal estratégia contra o câncer em crianças e adolescentes. A sobrevida das crianças com doenças malignas melhoraram sensivelmente nos últimos 30 anos e isto se deve, sobretudo, à melhora e à centralização do tratamento em instituições especializadas (STILLER, 2007).

A análise da sobrevida com informações populacionais tiveram início nos EUA com o programa SEER, em 1973. As taxas de mortalidade declinaram significativamente entre 1975 e 1995, chegando a 40% com decréscimo estatisticamente significativo de 2,6% ao ano. Mais tarde iniciou-se o projeto denominado *European Cancer Registry-Based Study of Survival and Care of Cancer Patients* (EUROCARE), baseado em informações populacionais

de toda a Europa e, atualmente, é o maior estudo de sobrevida do câncer pediátrico (BERRINO, 2001; COEBERGH, 2001).

Este projeto englobou 30 registros de câncer em 17 países da Europa, analisando a incidência e sobrevida de 34.814 crianças entre 1978 a 1989, correspondendo a 45% do continente (MAGNANI, 2001b). Demonstrou-se uma tendência no decréscimo da mortalidade em todos os países e em todos os tipos histológicos. As maiores taxas de sobrevida ocorreram nos países cujo processo de diagnóstico é centralizado, nos quais os pacientes tiveram acesso ao tratamento correto de acordo com um protocolo (COEBERGH, 2001). A taxa de mortalidade mais alta ocorreu na Romênia e na maioria dos países do leste europeu e as mais baixas foram registradas na Irlanda e em países do norte da Europa (LEVI, 2001).

O projeto ACCIS foi fundado pela União Europeia com o objetivo de coletar, apresentar e interpretar as informações sobre incidência e sobrevida em crianças (0-14 anos) e adolescentes (15-19 anos) na Europa. As bases de dados do ACCIS contêm informações sobre 80 RCBP, correspondendo a uma cobertura de cerca de metade da população entre 0 e 14 anos e um quarto da população de 15 a 19 anos que residem nos 35 países participantes. A base populacional é de 1,3 bilhão de pessoas-ano, com cerca de 160 mil casos novos de câncer diagnosticados entre 1970 e 2001 (STELIAROVA-FOUCHER, 2004).

Este estudo demonstrou que a sobrevida nos anos 90 na Europa neste grupo de referência, era de 73%. A sobrevida nos países do leste europeu (63%) foi menor que nos países do oeste (75%). Nas crianças (0-14 anos), a sobrevida no oeste do continente foi maior que no leste para todos tipos de tumor, à exceção dos carcinomas (86% no oeste e 94% no leste). Entre os adolescentes (15-19 anos) a sobrevida foi de 73%, sendo de 63% no oeste e 75% no leste. O estudo observou-se, ainda, uma melhora substancial na sobrevida em crianças. Nos anos 70, a sobrevida em 5 anos era de 44%, nos anos 80 a mesma passou para 64%, atingindo 74% nos anos 90. Nos adolescentes, nos anos 70, a sobrevida era de 50%, passou para 63% nos anos 80 e para 74% nos anos 90.

No Reino Unido, a sobrevida melhorou significativamente nos três períodos analisados (1954-1963 1964-1973 e 1974-1983). Em cinco anos, a sobrevida passou de 21% no período inicial (1954-1963) para 49% no último período (1974-1983), (INCA, 2008).

Recentemente, estudos populacionais do SEER e EUROCARE foram comparados com a finalidade de verificar diferenças da sobrevida da criança com câncer na Europa e nos EUA. Diferentemente do que ocorre em adultos, a sobrevida da criança com câncer na Europa (excluindo o leste) é semelhante à dos EUA, mostrando que em ambos os continentes existe igualdade de oportunidade de tratamento adequado para as crianças com câncer (INCA, 2008).

As taxas de sobrevida observadas em países em desenvolvimento são menores que as de países desenvolvidos. Em Cuba não houve melhora durante o ano de 1982 e entre 1988-1989, sendo de 51,3% e 47,9%, respectivamente. Em Namíbia, na África do Sul, no período entre 1983-1988 a sobrevida estava em torno de 37%, sendo a maior para os portadores de tumores de Wilms (76%). A taxa de mortalidade no Uruguai, de 1992 a 1994, foi de 45,3% (INCA, 2008).

No Brasil, um estudo realizado no RCBP de Goiânia referente ao período entre 1989 e 1996, mostrou que as taxas de mortalidade mantiveram-se estáveis e a taxa de sobrevida acumulada após cinco anos do diagnóstico foi de 34%, passando de 24% em 1989-1990 para 50% em 1993-1994. Verificou-se que a mortalidade encontrava-se estável para ambos os sexos e entre aqueles com idade entre 0 e 4 anos. Entretanto, decréscimos com significância estatística puderam ser observados para as faixas etárias de 5 a 9 anos e 10 a 14 anos, assim como para o grupo das leucemias (INCA, 2008).

A probabilidade de sobrevida global acumulada após cinco anos passou de 23,6% (1989/1990) para 50,0% (1993/1994). O RCBP de São Paulo também realizou um estudo no qual avaliou a sobrevida em crianças (0-14 anos) para o ano de 1993 e o período de 1997-1998. A sobrevida acumulada até 60 meses foi de 41% para o total de casos. Não houve diferenças significativas na sobrevida acumulada segundo sexo (masculino=42%, feminino=41%; $p=0,152$), faixa etária (0-4 anos=46%, 5-9 anos=38%, 10-14 anos=38%; $p=0,861$) e período (1993=44%, 1997-1998=42%; $p=0,870$), (INCA, 2008).

Ainda que em muitos estudos estejam disponíveis informações para crianças menores de 15 anos, sabe-se que a população adolescente na maioria dos países é assistida pelos pediatras. Tal idade marcava o fim da infância em muitas abordagens epidemiológicas, portanto a maioria dos trabalhos considera como adolescência a faixa etária de 15 a 19 anos.

Esta faixa é foco de atenção na oncologia pediátrica, pois estes pacientes, por muito tempo, foram abandonados sem saber quem deveria cuidá-los (INCA, 2008).

A definição aceita pela OMS para adolescência engloba as faixas etárias entre 10 e 19 anos. Os tipos histológicos do câncer que ocorrem no adolescente são mais semelhantes aos tipos que ocorrem na criança do que os que ocorrem no adulto, porém com algumas particularidades que merecem atenção especial (BLEYER, 2002). A taxa de sobrevivência observada nos adolescentes com câncer não apresentou progresso tão acentuado quanto em crianças. Uma das possíveis razões é que os adolescentes não foram tratados por meio de ensaios clínicos de estudos cooperativos em instituições especializadas (INCA, 2014).

Nos EUA e no Canadá, somente 5% dos pacientes entre 15 e 25 anos são registrados em ensaios clínicos, enquanto 60-65% dos pacientes mais jovens são incluídos (BLEYER, 2002). Em dois registros de câncer de Ontário, no Canadá, 96% das crianças entre 0 e 14 anos foram tratadas em centros de pediatria oncológica, enquanto o percentual de adolescentes de 15 a 17 anos ficou em 46%, o que pode comprometer a sobrevivência destes últimos (GREENBERG, 2006). Informações do SEER mostram que a sobrevivência global em cinco anos aumentou de 19% nos adolescentes (15 a 19 anos) durante os períodos 1974-1976 e 1989-1995, enquanto que nas outras faixas etárias (0-4; 5-9; 10-14) o aumento foi de 31%, 34%, e 38%, respectivamente (RIES, 2002).

Na França, uma publicação recente demonstrou que os adolescentes portadores de leucemia linfóide aguda apresentavam sobrevivência mais elevada quando tratados pelos protocolos pediátricos (FRALLE-93) se comparados aos tratados nos protocolos de adulto (LALA-94) (BOISSEL, 2003).

Neste contexto de aumento global da sobrevivência de pacientes pediátricos com câncer, o aperfeiçoamento de técnicas e protocolos que proponham a manutenção da fertilidade em crianças faz-se extremamente necessário (INCA, 2014).

Dentre as técnicas de manutenção da fertilidade, para esse público alvo específico, o infantil, destaca-se como padrão ouro a criopreservação do tecido ovariano. No Programa Valenciano de Infertilidade, a criopreservação de córtex ovariano ou do ovário completo é o tratamento de primeira eleição para os casos de meninas, quando a estimulação folicular é

contraindicada ou quando não se dispõe de tempo suficiente para a estimulação até o início da QT (SÁNCHEZ-SERRANO, 2010).

2.5 Técnicas de criopreservação

O objetivo geral da criopreservação é a integridade do enxerto por meio da manutenção da viabilidade anatômica e funcional das estruturas celulares. O sucesso da criopreservação depende de uma série de fatores técnicos: o tempo de congelação e armazenamento e temperatura, tipo e quantidade de crioprotetores utilizados, a concentração osmolar do meio, mudanças no volume da célula, estrutura e função, especialmente relacionadas com a permeabilidade da membrana plasmática e fluidez e suas implicações para o metabolismo celular (KASAI, 2002).

A principal complicação é criolesão que envolve um ou mais eventos sucessivos e independentes: formação de cristais de gelo intracelular e extracelular, a toxicidade química dos crioprotetores, choque osmótico e dano celular (KASAI, 2002).

A congelação lenta é considerada o método clássico de criopreservação. Após um período de exposição a baixas concentrações de crioprotetores, que pode variar de 5 a 60 minutos, o material a ser congelado é colocado em um aparelho de resfriamento programado entre 0 °C e 20°C (DONNEZ, 2004; RODRIGUES, 2004).

A temperatura é gradualmente reduzida aos níveis entre -5°C e -9°C, a uma velocidade de aproximadamente 2°C/min. A esta temperatura induz-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, poupando as células do tão danoso processo. Esse procedimento traz ainda o benefício de evitar uma congelação desordenada ou super-resfriada. A explicação do processo deve ao fato de se desidratar o material biológico antes de sua congelação, evitando a formação de cristais de gelo dentro da célula (ZHANG, 2011).

Existe ainda outro importante método de criopreservação denominado de vitrificação. É caracterizado por uma taxa de resfriamento extremamente rápida e que utiliza altas concentrações de crioprotetores com o intuito de aumentar a viscosidade da solução diluente. Esse método promove uma passagem do meio líquido para um estado amorfo, que também evita a formação de cristais de gelo (LUNARDI, 2012).

2.6 Criopreservação de tecido ovariano e restauração da fertilidade

A criopreservação é uma técnica de preservação da fertilidade experimental que envolve a remoção cirúrgica e criopreservação de ovários de mulheres, na maioria de jovens, realizada antes da QT, a fim de evitar a exposição a compostos gonadotóxicos sistêmicos. Após o tratamento, desde que se acredite que o órgão esteja livre de tumor ou metástase, os ovários podem ser reimplantados. Embora ainda em fase experimental, a criopreservação é considerada uma alternativa promissora para a recuperação de fertilidade (LEE, 2006; OKTAY, 2000).

A recuperação da função ovariana por meio de reimplante de tecido criopreservado tem sido realizada com sucesso tanto em animais como em seres humanos. No entanto, devido ao pequeno número de pacientes submetidos a este procedimento até o momento, a técnica não foi totalmente padronizada (LUNARDI, 2012; OKTAY, 2004).

Vários modelos animais foram projetados para avaliar os compostos capazes de melhorar as técnicas e resultados de criopreservação. Ao longo do tempo, um número de compostos diferentes tem sido utilizado na criopreservação de células reprodutivas (LUNARDI, 2012).

Assim, foram realizados vários estudos na década de 1990 que avaliam a eficácia do crioprotector de Dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propilenoglicol e glicerol mesmo (utilizado desde 1949) (LUNARDI, 2012).

Inicialmente, a maioria das pesquisas foi focada na criopreservação de espermatozoides. As primeiras pesquisas em animais despontaram na década de 30. Já em 1951, o primeiro bezerro nasceu usando congelado esperma de touro. Em 1953, Lovelock percebeu que quando se congelava células sanguíneas (eritrócitos) sem crioprotetores havia grande dano celular, o que se reduzia significativamente caso se utilizasse glicerol. Baseado neste achado, o autor levantou a hipótese de essa proteção estar relacionada às propriedades coligativas do glicerol. Nos anos seguintes o mesmo autor descobriu uma série de outras soluções com ação similar de proteção. As características em comum eram neutralidade de Potencial Hidrognênico (PH) e baixo peso molecular (LUNARDI, 2012).

Não satisfeito com suas descobertas, testou outras células animais, e percebeu que outros tipos celulares apresentavam pequena penetração ao glicerol. Procurou soluções com moléculas ainda menores e sugeriu que o DMSO poderia ser um excelente crioprotetor. Em poucos anos sua sugestão confirmou-se como excelente produto, utilizado em muitos protocolos atualmente (LUNARDI, 2012).

As novas técnicas facilitaram a seleção e reprodução de animais domésticos. Eventualmente, técnicas de criopreservação foram adaptadas para o uso de órgãos humanos, em primeiro lugar para oócitos e folículos, em seguida, para os ovários e embriões (POLGE, 1952; STEWART, 1951).

Em 1954, pela primeira vez, uma criança nasceu como resultado de inseminação com sêmen armazenado por seis semanas em gelo seco. Dez anos depois, em 1964, nasceu uma criança que tinha sido concebida com sêmen armazenado em nitrogênio líquido por cinco meses. Mais recentemente, com o advento, em 2004, de técnicas de criopreservação adequada, a criança foi gerada utilizando sêmen congelado por 21 anos, fazendo com que a duração da fase seminal da vida humana pudesse ser prolongada de forma praticamente indefinida (BUNGE, 1954; HORNE, 2004).

A evolução das técnicas de criopreservação de células germinativas femininas tem sido notável. Os primeiros estudos sobre a criopreservação de tecido ovariano foram realizados em roedores há mais de meio século atrás, e os resultados têm sido muito encorajadores desde então. Realizações atuais incluem a manutenção da morfologia e a viabilidade da estrutura do folículo do ovário e a restauração da função endócrina após criopreservação e transplante de tecido ovariano (LUNARDI, 2012).

Após o transplante ortotópico de todo o ovário previamente congelado e então descongelado, Parrot (PARROT, 1960) descreveu o nascimento do primeiro filhote, apenas um, em camundongos. Usando um protocolo semelhante, outros pesquisadores obtiveram taxas de gravidez do rato entre 33% e 73% e 3-4 nascimentos por ninhada. No entanto, outros relataram resultados promissores (23 nascimentos) após o transplante ortotópico de ovários congelados / descongelados, demonstrando que o tecido ovariano retirado post-mortem era viável mesmo após um período de armazenamento, sendo realizado a baixas temperaturas (MUKAIDA, 2001).

Em 2004, Donnez e colegas publicaram um estudo importante na medicina humana reprodutiva particularmente relevante para jovens mulheres que enfrentam a perspectiva de tratamento gonadotóxico. Uma de suas pacientes experimentou a restauração de sua função endócrina e de gametogênese e concebeu 11 meses após autotransplante ortotópico de fragmentos ovarianos (OKTAY, 2004). O estudo mostrou que as mulheres tratadas e curadas de câncer podem ter filhos saudáveis, sem o uso de técnicas de reprodução assistida, como FIV (LEE, 2006; LUNARDI, 2012). Mais recentemente, outros investigadores demonstraram que é possível manter a atividade endócrina e gametogênica no enxerto por um período prolongado. Uma de suas pacientes foi submetida a transplante de tecido ovariano após o tratamento para câncer (ERNST, 2010).

O treinamento adequado em técnicas de criopreservação e autotransplante em animais é indispensável para os cirurgiões que desejam oferecer esta opção de tratamento para pacientes nos quais a função ovariana pode ser comprometida por rádio e QT.

2.7 Reimplante do tecido ovariano

Após um período indeterminado de congelação, o tecido ovariano pode ser removido do nitrogênio líquido e reimplantado com o objetivo de recuperar sua atividade. De acordo com o tecido e com o organismo que o recebe, o transplante pode ser classificado em xenotransplante (quando realizado em espécies diferentes), alotransplante (quando ocorre em animais de mesma espécie) e autotransplante (quando o doador é o mesmo receptor).

O transplante também pode ser classificado de acordo com o local anatômico do implante. Diz-se ortotópico quando se implanta o tecido no mesmo sítio de origem. Outra possibilidade é o heterotópico, quando se implanta o tecido em uma região distinta á original do doador.

O transplante de tecido ovariano criopreservados já é uma realidade em clínicas de reprodução humana (OKTAY, 2011). Muitos estudos evidenciam mulheres, que mesmo antes da idade reprodutiva, foram acometidas pelo câncer, poderiam ter seus ovários removidos e congelados antes do início da QT. Esse material, o córtex ovariano, pode ser removido e criopreservado indefinidamente, e após o fim da terapia antineoplásica, ser usado

como enxerto para o restabelecimento da função endócrina e reprodutiva (ANDERSEN, 2008; OKTAY, 2011).

A associação entre a criopreservação e o reimplante tem sido realizada com sucesso em várias espécies. Muitos estudos evidenciam que as funções dos ovários podem ser restabelecidas, incluindo crescimento e desenvolvimento folicular (DEMEESTERE, 2006), produção hormonal esteroidal. (ANDERSEN, 2008), bem como gestações a termo (SALLE, 2003) e nascimento de filhos vivos tanto em animais (GOSDEN, 1994) como em humanos (DONNEZ, 2004).

No entanto, o processo de reimplante não está isento de riscos. Além do risco cirúrgico inerente à técnica para acesso ao abdome, que pode ser por meio de laparotomia ou laparoscopia, existe a possibilidade de reintrodução de células cancerosas quando da ocorrência de doença metastática no ovário. Ou seja, mesmo em pacientes considerados livres de doença após a QT, o reimplante ovariano pode trazer de volta células malignas que possam estar alojadas no parênquima ovariano (AUBARD, 2001).

Quanto ao sítio de reimplante em ratas, os locais mais pesquisados são o omento maior, cápsula renal e o próprio pedículo ovariano ou Bursa ovariana. No entanto na literatura destaca-se o omento maior. Sua identificação relativamente fácil, pois às vezes pode ser confundido com o pâncreas, e suas excelentes características de vascularização tornam-no o local mais recomendável para reimplante ovariano durante experimentos em ratas. Aconselha-se que seja confeccionada uma bolsa no omento maior, com pontos separados e sem pontos de tensão, de forma a não comprometer sua irrigação (DENG, 2009; LI, 2013; WANG, 2009).

Outro ponto que se discute é se o parênquima ovariano deve ser reimplantado íntegro ou fatiado. Na literatura também se observa uma preferência de técnica, optando-se, via de regra, pelo reimplante de ovário fatiado, em amostras com espessura inferior a 3mm (DONNEZ, 2004).

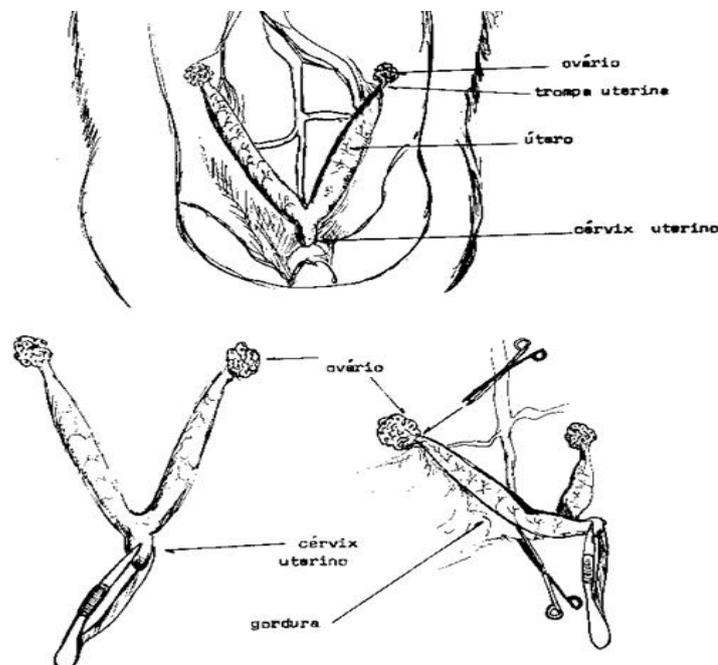
Em mulheres, os principais sítios de reimplante são o pedículo ovariano, a parede abdominal anterior no peritônio ou o músculo reto abdominal. De forma resumida as principais indicações são voltadas para o pedículo ovariano quando se deseja que a paciente readquira sua capacidade de gestação espontânea. Prefere-se o peritônio quando se tem o

pedículo ovariano comprometido por cirurgias prévias, radiação pélvica, hidrossalpinges ou salpingites com acometimento da lesão para-ovariana, sinéquias ou outras complicações pélvicas e quando se ainda deseje a gestação espontânea. E por fim escolhe-se o músculo reto abdominal, quando não se deseja mais a prenhez ou quando há suspeita ou possibilidade de doença ovariana. Nesse caso o acesso ao tecido ovariano seria fácil e simples, de forma a acessá-los de forma percutânea. Seu controle ultrassonográfico inclusive se dá com transdutor para tireoide (DONNEZ, 2004).

2.8 Rato: modelo animal comparado na criopreservação ovariana

O rato constitui um importante modelo experimental para estudos referentes ao controle do ciclo ovariano de mamíferos. Por tratar-se de animal que apresenta ovulação espontânea e por evoluir com perfil de variações de gonadotrofinas e esteróides gonadais semelhantes ao da mulher, apresenta ainda um ciclo estral de curta duração e anatomia que facilita os procedimentos experimentais, conforme figura 1 (FREEMAN, 1994).

Figura 1 – Desenho esquemático da anatomia do útero e ovários da rata (*Rattus norvegicus*)



Fonte: Norberto (2002).

Os períodos reprodutivos podem ser classificados como ciclos estrais contínuos ou estacionais. O ciclo estral é o período decorrente entre sucessivas fases de receptividade sexual, geralmente chamadas de cio ou estro. Os ciclos podem ser monoestrais (uma vez por

ano) ou poliestrals (duas ou mais vezes por ano). A duração dos ciclos estrais contínuos é específica da espécie; na rata, por exemplo, é de 4 a 5 dias; na cobaia e ovelha é de 16 dias no máximo; e na vaca e na porca é no máximo 21 dias (WANG, 2009).

Outra diferenciação no mecanismo cíclico é a separação das espécies de ciclo contínuo em ovuladores espontâneos (por exemplo, a porca, a vaca, a ovelha, a cobaia) e induzidos (como a coelha, a gata, a marta e o furão-fêmea). No ovulador espontâneo o estro coincide com o início da ovulação; já o ovulador induzido é receptivo ao macho em qualquer momento, e a ovulação ocorre a intervalos variáveis após o coito: 10h para a coelha, 24h para gata, 30h para o furão-fêmea. A ovulação se deve ao bloqueio de estímulos atuantes sobre o hipotálamo, gerando liberação de FRH e LRH, que produzem secreção de gonadotrofinas hipofisárias (RAAFAT, 1999; WANG, 2009).

Embora mais difícil de ser explicada, a atividade sexual rítmica espontânea da fêmea foi cuidadosamente estudada na rata. Gorski e Wagner, sumariando seu próprio trabalho e o de outros pesquisadores, formularam uma hipótese baseada na regulação hipotalâmica da secreção de hormônio liberador de gonadotrofina. Basearam-se na suposição de que o hipotálamo anterior e as áreas pré-ópticas regulam a secreção de Hormônio Luteinizante (LH) de forma indiferenciada, mas inatamente cíclica enquanto que os núcleos ventromedial e arqueado são reguladores inatamente tônicos da secreção de gonadotrofina. Do 1º ao 5º dia após o nascimento, o hipotálamo anterior e as áreas pré-ópticas respondem a propionato de testosterona ou benzoato de estradiol, endógeno ou exógeno (KERI, 1994).

O tratamento da fêmea recém-nascida com uma dessas substâncias ou o transplante de testículos gera o padrão de estro contínuo na puberdade e o aumento de tamanho de muitos folículos ovarianos. Em machos castrados após o nascimento, aparecem corpos amarelos em ovários subsequentemente implantados. Essas duas situações experimentais são demonstrativas da reversão do padrão neural e de sua labilidade. Indicam também que o sistema nervoso da fêmea recém-nascida é neutro, e que a testosterona exerce um efeito positivo causando uma sutil diferenciação no sistema nervoso, apenas visível depois da puberdade (WANG, 2009).

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases gerais: 1) fase folicular correspondente ao período de crescimento e maturação dos folículos caracterizada por

secreção estrogênica gradualmente acelerada e alteração da mucosa uterina e vaginal; 2) fase lútea, iniciada pela ovulação do folículo e sua subsequente transformação em corpo amarelo. A duração da fase lútea depende de o corpo amarelo se tornar funcional ou não, no primeiro caso secretando progesterona, com seu consequente efeito sobre a mucosa uterina e vaginal. As fases da função ovariana foram divididas em estágios, inicialmente descritos por Stockard e Papanicolau; tais estágios são correlacionados com a citologia da vagina (STOCKARD, 1917; VILELA, 2007).

Na rata o esfregaço da parede vaginal revela um padrão mutável de células e muco. No começo do estro, o esfregaço é composto quase exclusivamente de células epiteliais cornificadas. No fim do estro, aparece muito muco enquanto que as células cornificadas ainda são bastante conspícuas. Doze horas mais tarde no metaestro, o esfregaço apresenta células cornificadas, muitos leucócitos e quase nenhum muco. Na rata, o ciclo se sucede rapidamente: os corpos amarelos não são secretores e o metaestro é curto, a não ser que se instale um processo de gravidez ou pseudogravidez. Em animais cujos corpos amarelos são secretores, o metaestro é prolongado. O diestro é associado a um esfregaço vaginal que contém quase apenas leucócitos e ocasionalmente células ovais com grandes núcleos, células epiteliais nucleadas. Um dia depois o esfregaço se caracteriza por células epiteliais nucleadas apenas; o animal está então no proestro. Diestro, proestro e estro ocorrem na fase folicular da função ovariana, enquanto que o metaestro ocorre na fase lútea. O conhecimento da relação entre a citologia vaginal e a função ovariana propiciou a fisiologistas e bioquímicos um poderoso instrumento experimental (VILELA, 2007).

Em primatas, o ciclo reprodutivo é o ciclo menstrual, que vai do primeiro dia de sangramento até a véspera do início do próximo período de sangramento. Em macacas Rhesus e mulheres a duração dos ciclos apresenta moda de 28 dias e média de 33. A ovulação é espontânea, ocorrendo por volta da metade do ciclo (entre o 11º e 14º dias). Os primatas são sexualmente receptivos ao longo de todo o ciclo; portanto, não apresentam o estágio de estro durante o ciclo menstrual. O ciclo menstrual pode ser também dividido em fase folicular e lútea. Durante a fase folicular o endométrio uterino torna-se mais espesso pelo endométrio. Na fase lútea, caracteristicamente, as artérias em espiral se apresentam mais tortuosas e as glândulas do endométrio exibem maior atividade secretora. A menstruação ocorre quando o corpo amarelo cessa a secreção de progesterona. O sangramento das artérias espirais e a queda

do endométrio persistem durante 3 a 5 dias, seguindo-se novo crescimento do endométrio (VILELA, 2007).

Várias mudanças comportamentais, morfológicas e funcionais estão ligadas ao estro em não primatas e à ovulação em primatas conforme segue. Ratas, coelhas e quase todas as fêmeas não primatas mostram-se passivas diante do macho: logo depois de montada, a fêmea abaixa o abdômen junto ao solo e gira a pelve para cima em posição de lordose. Aumenta a atividade física dos animais do sexo feminino: ratas correm mais em gaiolas experimentais de atividade, e mulheres andam mais. O muco vaginal fica mais fluído, forma padrões em “folha de samambaia” quando seco, e é mais ácido. A temperatura basal do corpo da mulher diminui cerca de 0,6 °C na manhã da ovulação, elevando-se depois, lentamente, mais ou menos 0,7 °C até a menstruação, quando o ciclo recomeça. Aumenta a sensibilidade ao frio com a queda aguda da temperatura basal do corpo (VILELA, 2007).

2.9 Desenvolvimento folicular

O ovário é um órgão que apresenta duas funções fundamentais: a formação de um oócito capaz de ser fertilizado, com total capacidade de desenvolvimento; e a secreção de hormônios esteroides necessários para a preparação do trato reprodutivo para a fertilização e subsequente estabelecimento da prenhez (OKTAY, 2008).

Para que ocorra de forma sincronizada e eficaz, as funções estereoidogênicas e ovulatórias do ovário devem ser realizadas de forma coordenada e atrelada a uma complexa série de eventos, resumindo-se no termo desenvolvimento folicular (OKTEM; OKTAY, 2008).

Os folículos são unidades funcionais do ovário, formados por um oócito envolvido por uma ou mais camadas de células somáticas, chamadas de células da granulosa. O desenvolvimento folicular consiste de uma série de eventos complexos, sendo os principais: recrutamento folicular, proliferação e atresia das células da granulosa e da teca, estereoidogênese, expressão de receptores de gonadotrofinas, maturação de oócito, ovulação, luteinização e formação de Corpo Lúteo (CL), (SKINNER, 2005).

Os mecanismos envolvidos na sinalização para o recrutamento do Folículo Primordial (FP), determinando seu desenvolvimento, permanecem ainda não esclarecidos, no

entanto tem sido sugerida uma sinalização bidirecional entre o oócito e as células da granulosa e entre as células da granulosa e as células intersticiais da teca, interagindo com a matriz extracelular e fatores de crescimento, que são essenciais para o início do crescimento folicular e subsequente desenvolvimento (OKTAY, 2001; SKINNER, 2005).

A progressão de FP passando por folículo secundário, até tornar-se folículo pré-antral é contínua até a menopausa, envolvendo o alargamento do oócito, a proliferação das células da granulosa formando uma estrutura multilaminar, a formação da lâmina basal e da camada interna das células da teca (KNIGHT; GLISTER, 2006).

A progressão do desenvolvimento do folículo pré-antral para o estágio antral ou pré-ovulatório é caracterizado por uma contínua proliferação das células da granulosa e da teca, aumento da vasculatura, crescimento do oócito e o desenvolvimento da cavidade antral; com este folículo alcançando suas características pré-ovulatórias por meio de uma delicada e extensa rede de interações autócrinas e parácrinas entre as células da granulosa, células da teca e o oócito, com gonadotrofinas e fatores locais (OKTEM; OKTAY, 2008).

Na literatura ainda são encontradas muitas controvérsias em relação aos mecanismos envolvidos na foliculogênese, e o conhecimento atual que se tem sobre o assunto são baseados em estudos realizados com fêmeas de roedores, principalmente em ratas. Uma das mais impactantes recentes diferenças encontradas no processo de desenvolvimento folicular entre a maioria das fêmeas de mamíferos e as fêmeas de roedores, mais especificamente de camundongos, é a presença de células germinativas no ovário destas, as quais têm a capacidade de proliferação e diferenciação, e desta forma, podem sustentar a produção de folículos e oócitos após o nascimento destas fêmeas. Estes resultados contrariam o que era determinado pelo Dogma central da biologia reprodutiva, o qual afirma que fêmeas de mamíferos nascem com um número determinado de células reprodutivas, as quais regridem sem reposição ao longo da vida pós-natal (JONSON, 2004).

Outra importante diferença entre as fêmeas de roedores e especificamente as mulheres, é em relação à formação dos folículos primordiais. No ovário humano estes folículos estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal, enquanto que nas fêmeas de roedores, formam-se durante os três primeiros dias após o nascimento. Em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são semelhantes entre as fêmeas de

roedores e primatas, entretanto, em roedores múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo (HIRSHFIELD, 1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade de pega de enxerto de tecido ovariano em ratas após criopreservação ovariana por meio de vitrificação ou congelação lenta em diferentes tempos de reimplante, de forma precoce ou tardia.

3.2 Objetivo específicos

1. Avaliar a qualidade histológica do tecido ovariano de ratas após criopreservação com uso de congelação lenta;
2. Avaliar a qualidade histológica do tecido ovariano de ratas após criopreservação com uso de vitrificação;
3. Estudar o reimplante de tecido ovariano após criopreservação no omento maior de ratas por meio de avaliação histológica;
4. Estudar os resultados da pega do enxerto após o tempo determinado de castração das ratas;
5. Comparar a pega de enxerto após intervalo precoce e tardio pós-castração em ratas.

4 MÉTODOS

Os protocolos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará e registrado conforme número de protocolo: 79/2012.

O estudo utilizou trinta e três ratas de aproximadamente 3 meses de idade, sendo todos Wistar (*Rattus Novergicus*), e pesando aproximadamente 200g. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em ambiente controlado (ciclo circadiano, 22 ± 2 ° C, umidade constante, comida e água *ad libitum*).

Os animais foram pesados antes dos procedimentos cirúrgicos, sedados levemente com algodões embebidos em éter, anestesiados via intraperitoneal com Quetamina (peso/100 em ml) associado à Xilazina (peso/1000 em ml), conforme demonstrado nas figuras 02 e 03. Após efeito anestésico pleno, era injetada na região subcutânea do dorso do animal a quantidade de 10 ml de SF 0,9% para efeito de hidratação.

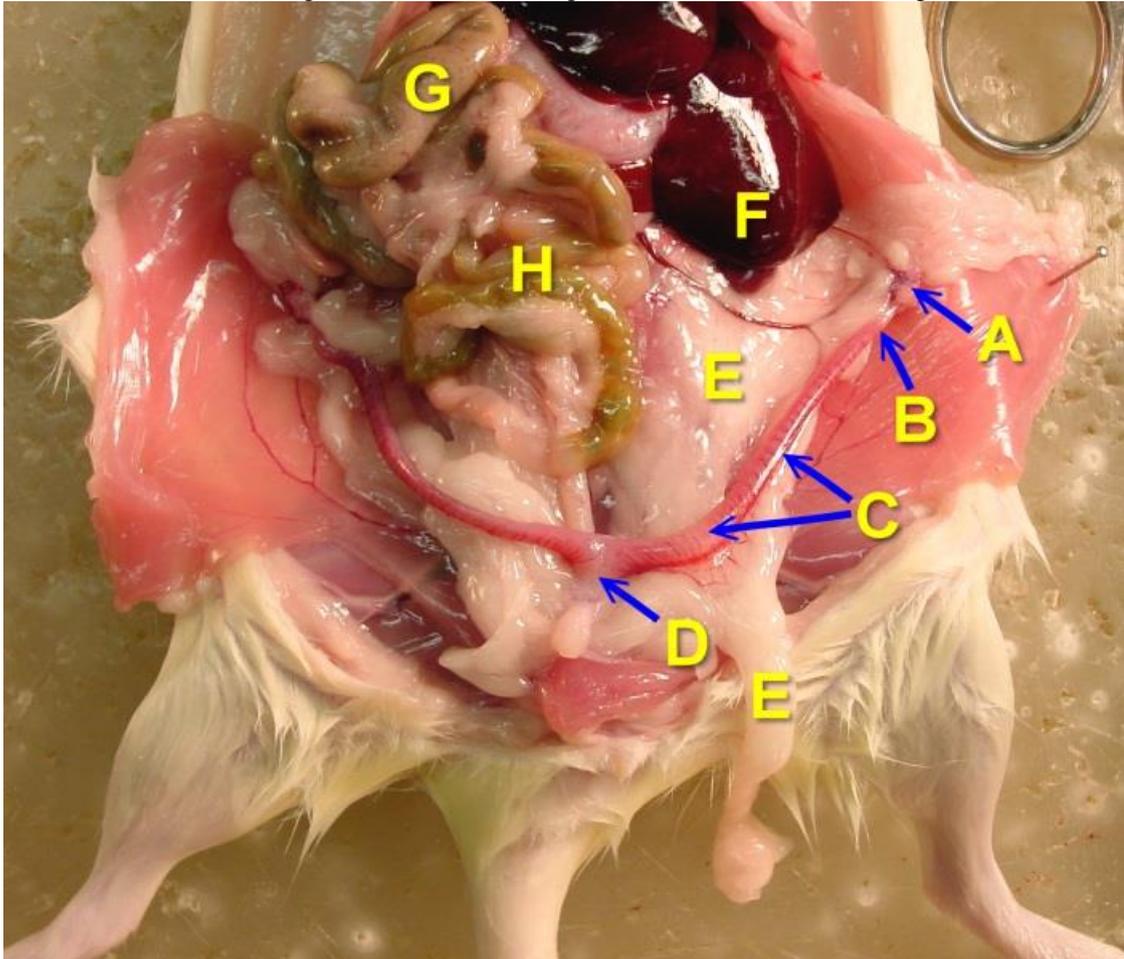
No procedimento foram usados: lupa cirúrgica, microclampes vasculares, material de sutura mononáilon 6-0, pinças de relojoeiro N° 3 e 5, tesouras curva e reta de microcirurgia e porta-agulhas Barraquier curvo.

Então foram submetidos à laparotomia exploradora, com exposição dos órgãos pélvicos. Realizada a ooforectomia bilateral, conforme demonstrado na figura 04, coletada a amostra do tecido ovariano e então após revisão e hemostasia rigorosa, era feita a síntese por planos.

Tecido ovariano

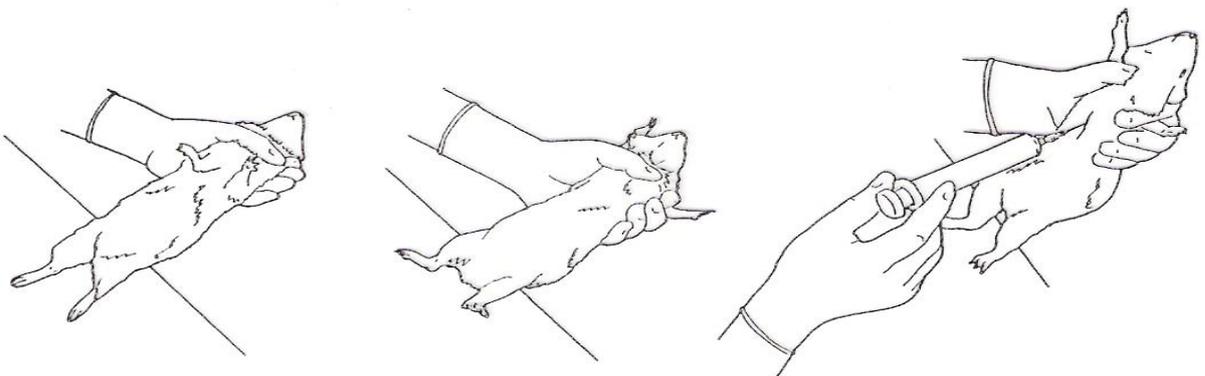
Após a excisão, os ovários foram dissecados livres de gordura e mesentério e fatiados em tamanho aproximado de 2 mm³. Um dos ovários foi submetido à análise histológica e o outro foi criopreservado, conforme demonstrado nas figuras 5 e 6.

Figura 2 – Anatomia das estruturas do abdome e pelve de rata. A: útero; B: trompa uterina; C: útero (corno esquerdo); D: cérvix uterino; E: gordura abdominal; F: fígado; G: cecum; H: intestino delgado



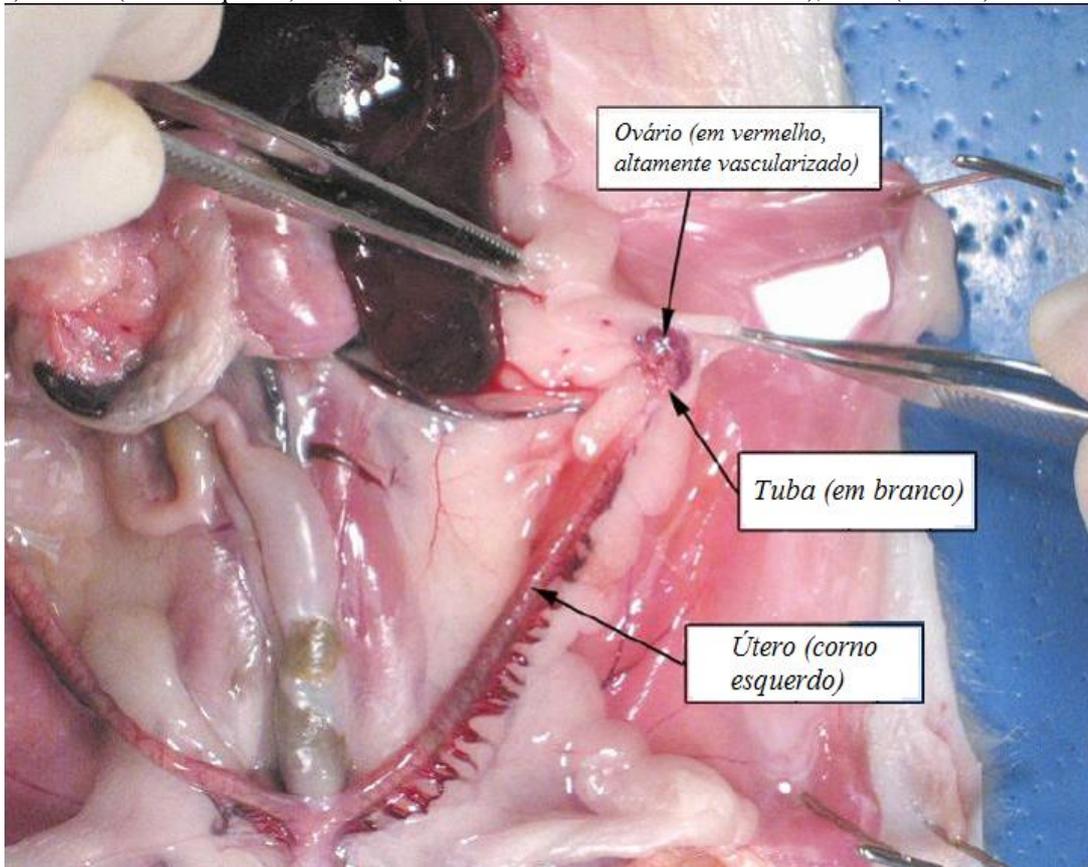
Fonte: Pinto (2008).

Figura 3 – Injeção intraperitoneal em rata



Fonte: Pinto (2008).

Figura 4 – Estruturas reprodutivas de uma rata fêmea: Ovário (em vermelho, altamente vascularizado); Tuba (em branco) e Útero (corno esquerdo). Ovário (altamente vascularizado em vermelho), tubas (brancas) e útero

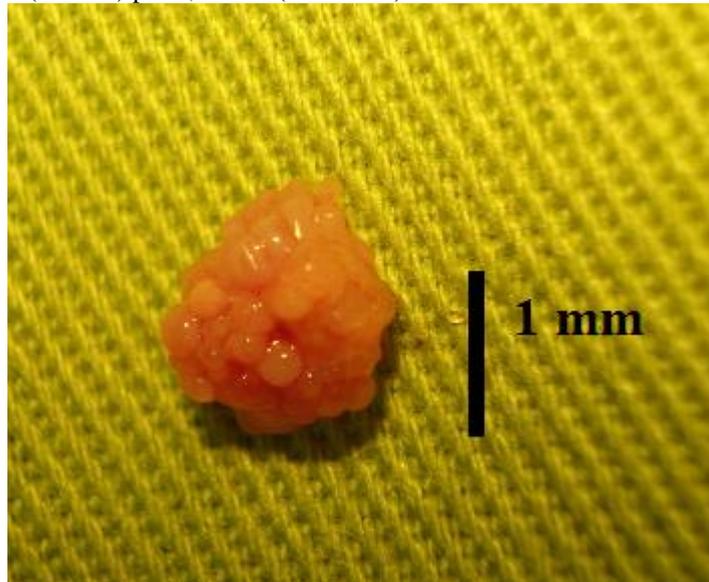


Fonte: Pinto (2008).

Desenho do experimento

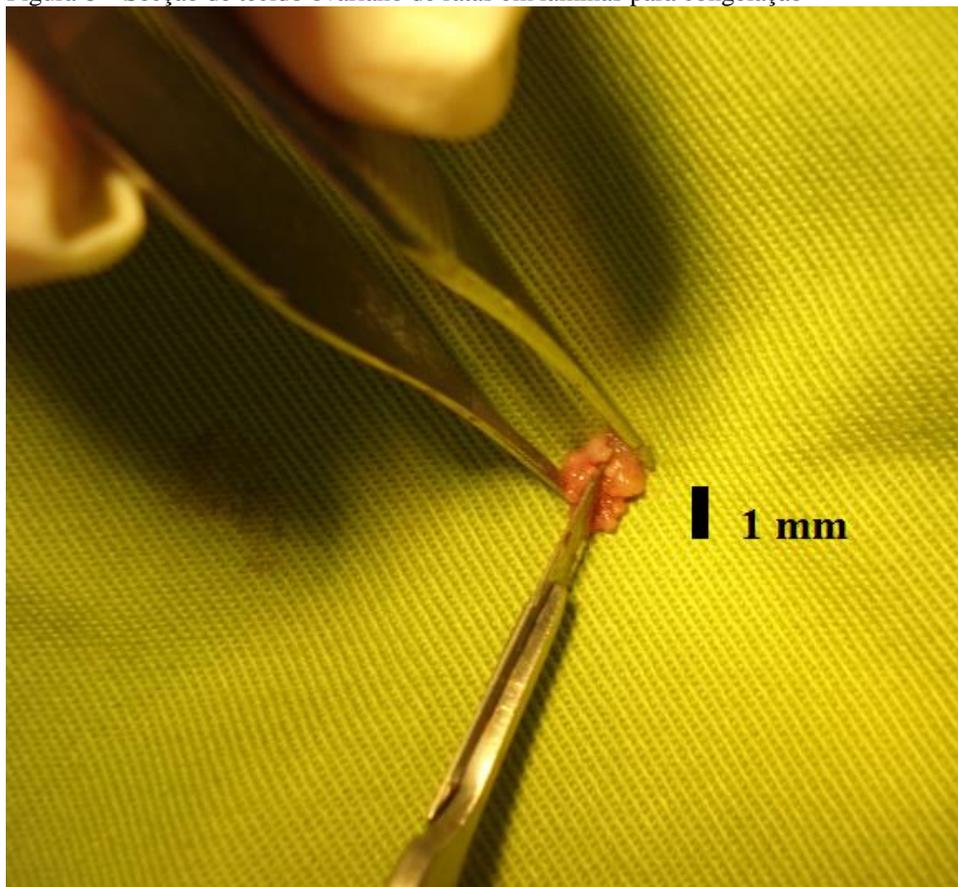
Estágio I: Todas as ratas (33) foram submetidas à ooforectomia bilateral. Um ovário foi imediatamente submetido à análise histológica, enquanto o outro foi criopreservado por congelamento lento ($n = 10$) ou vitrificação ($n = 23$). Foi priorizada a técnica de vitrificação, com dois terços dos animais, uma vez que é a técnica padrão-ouro conforme literatura, através de resultados experimentais em laboratório e em animais. No entanto os resultados da vitrificação, na prática clínica em humanos, apontam para apenas 01 nascido vivo após a técnica, enquanto a resfriamento lento enumera 20 nascidos vivos até a presente data. Somando a esse fato, como foi testado ainda um parâmetro novo, o tempo pós-castração, optou-se por realizar um braço do experimento com a técnica de congelamento lento, conforme detalhado na figura 7 (LUNARDI, 2012; WANG, 2009).

Figura 5 – Tecido ovariano de ratas após excisão cirúrgica e pré-congelação. Os diâmetros desta peça correspondem a 1,45mm (vertical) por 1,35 mm (horizontal)



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 6 – Secção de tecido ovariano de ratas em lâminas para congelação

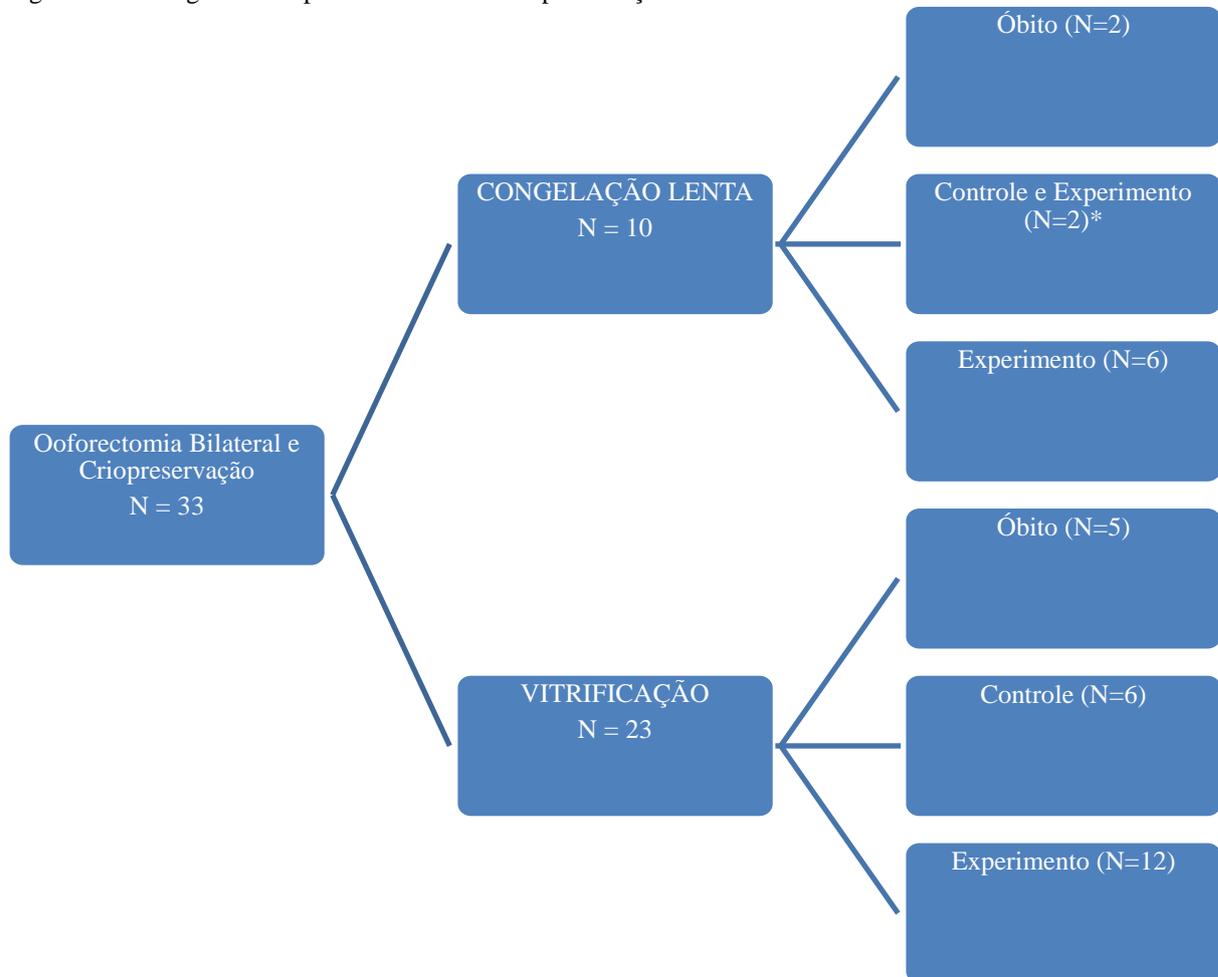


Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Dois (2) animais do grupo congelação lenta e cinco (5) animais do grupo vitrificação morreram. Os controles incluíram seis (6) animais do grupo de vitrificação e dois

(2) do grupo de congelação lenta. Os dois (2)* últimos animais proporcionaram material de tecido ovariano suficiente para os procedimentos do grupo controle e do grupo experimental.

Figura 7 – Fluxograma dos procedimentos de criopreservação de ovários utilizados nos animais

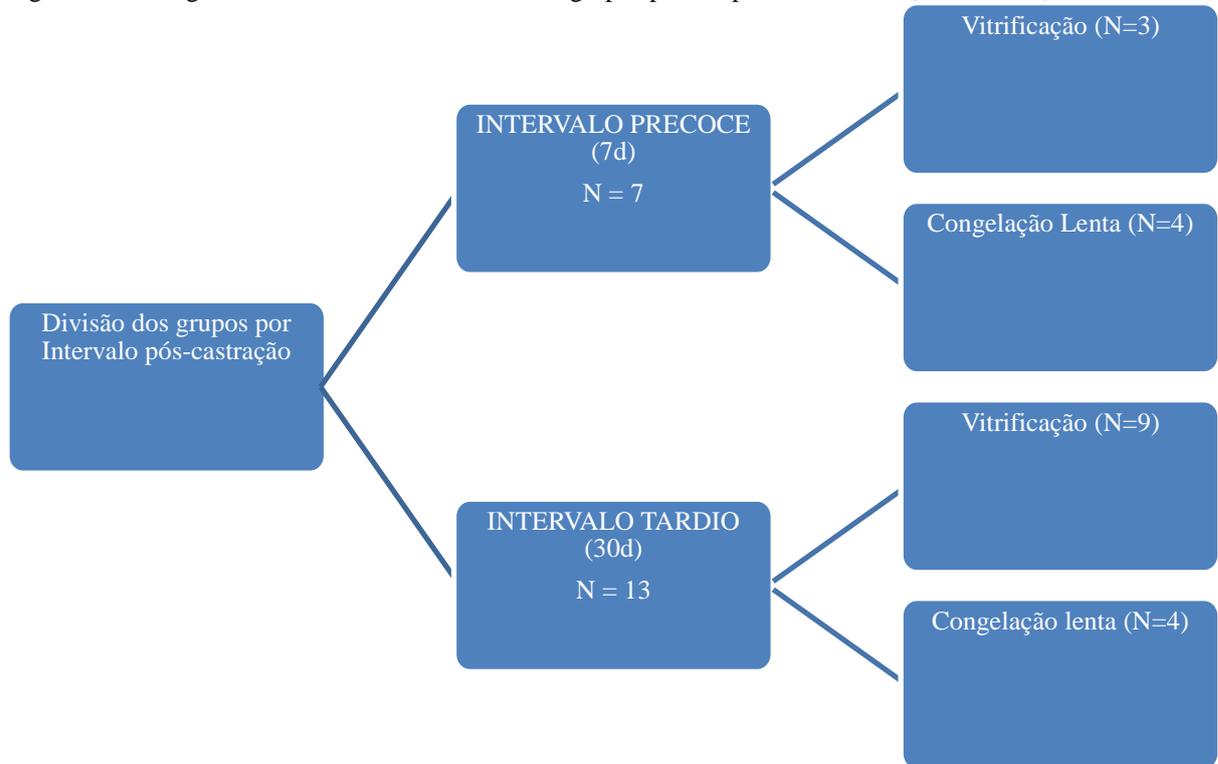


Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Estágio II: O ovário criopreservado foi descongelado e reimplantado no omento maior, uma semana após a ooforectomia (menopausa precoce) (Grupo A, n = 7; 3 vitrificados e 4 congelados lentamente) ou um mês após a ooforectomia (menopausa tardia) (Grupo B, n = 13; 9 vitrificados e 4 congelados lentamente), conforme mostrado na figura 8.

Observou-se um total de 07 mortes, sendo que 05 ocorreram em animais submetidos à intervenção precoce e apenas 02 à intervenção tardia. Tal observação se deve ao fato de o grupo de intervenção precoce ter tido apenas 1 semana de intervalo entre um procedimento cirúrgico e outro, contribuindo para maior estresse cirúrgico e consequente maior mortalidade. O intervalo no outro grupo foi de 30 dias.

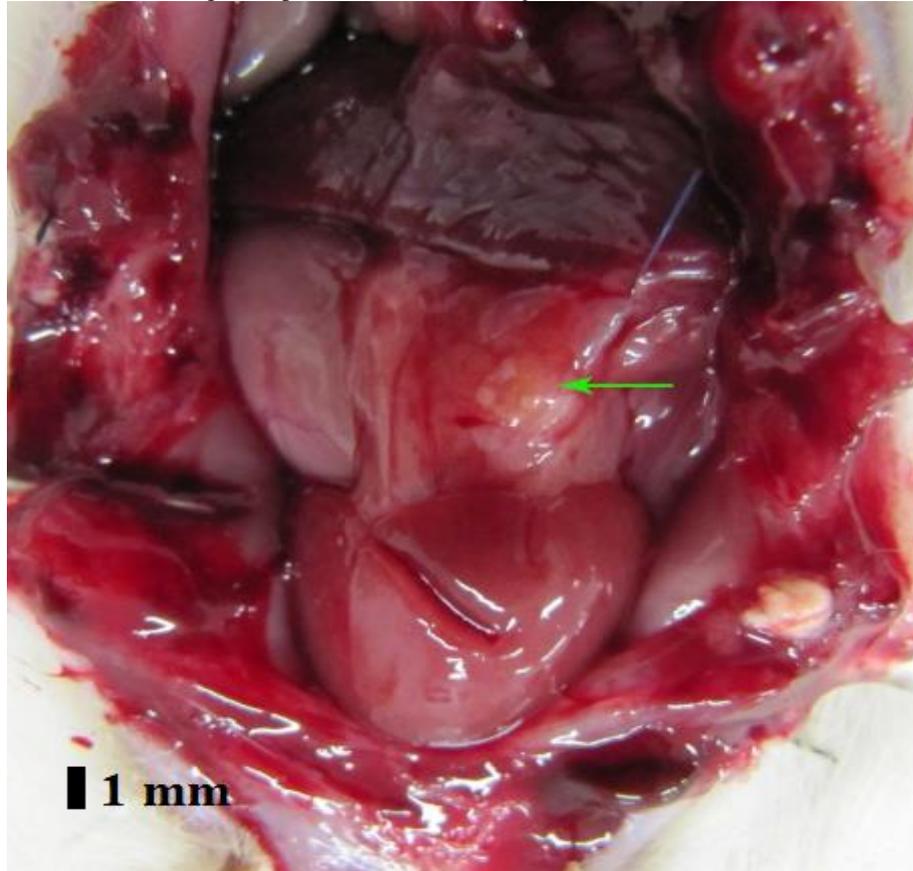
Figura 8 – Fluxograma com divisão dos animais em grupos por tempo de intervalo após a castração



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

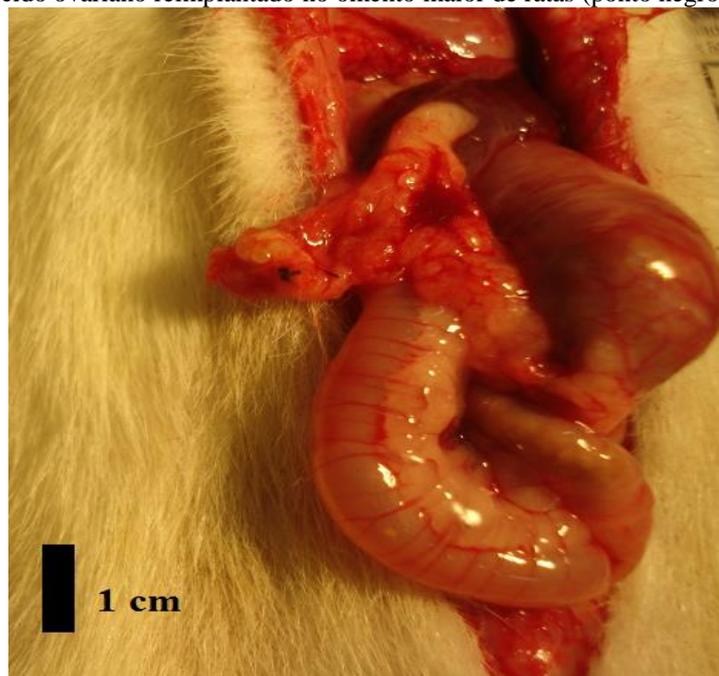
Estágio III: Um mês após reimplante de ovário, as ratas foram sacrificadas, o enxerto foi retirado e a pega avaliada, conforme as figuras de 9 a 11.

Figura 9 – Cavidade abdominal de uma rata após laparotomia evidenciando-se (seta) o reimplante de tecido ovariano no omento maior. A coloração do tecido e a ausência macroscópica de áreas de necrose sugerem boa pega do enxerto. Acima da seta, mais escuro, o fígado. Abaixo do reimplante as alças intestinais, recobertas por tecido fibrótico e aderências, surgidos após a terceira intervenção abdominal.



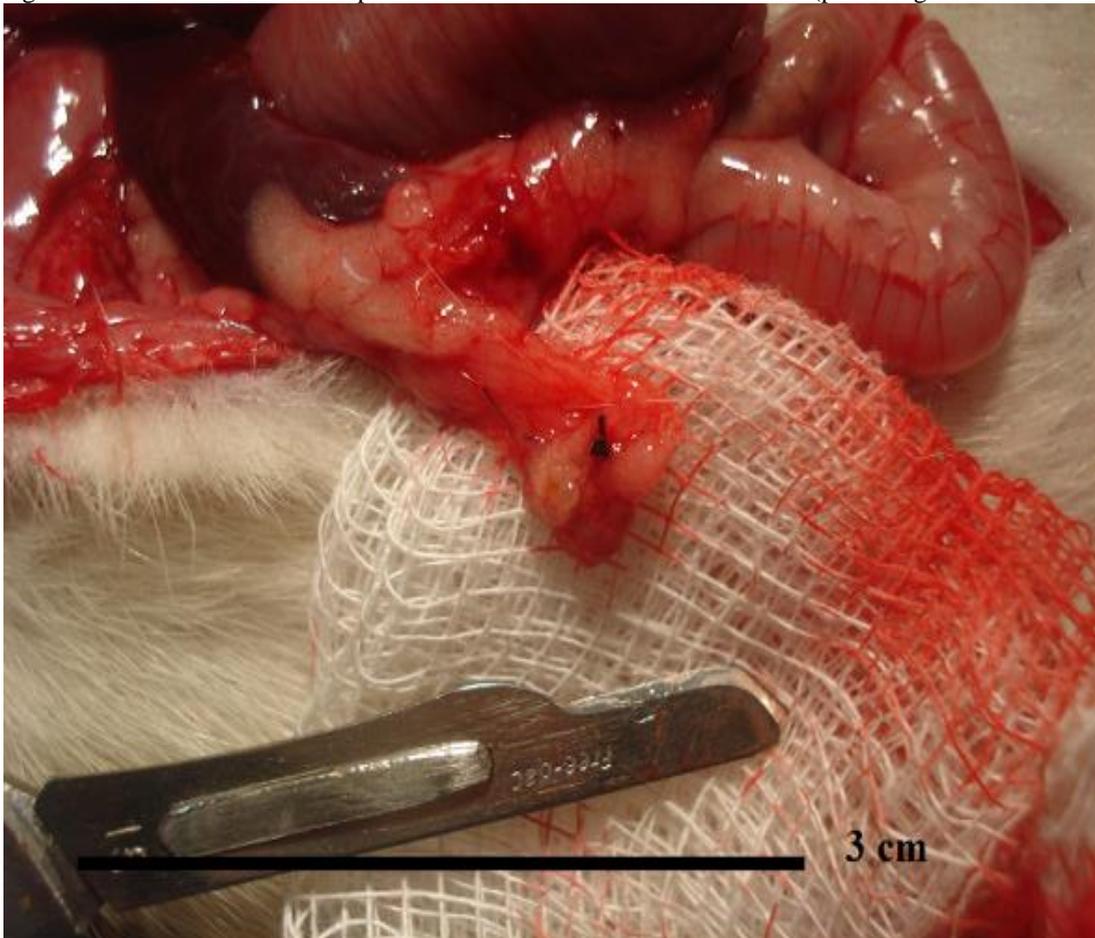
Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 10 – Tecido ovariano reimplantado no omento maior de ratas (ponto negro- fio de sutura)



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 11 – Tecido ovariano reimplantado no omento maior de ratas Wistar (ponto negro- fio de sutura)



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Procedimentos de vitrificação e aquecimento

Todos os ovários submetidos à vitrificação foram inicialmente equilibrados em Ácido Hidroxietilpiperazinetanosulfônico (HEPES) contendo 10 % v / v de etileno glicol e 10 % v / v de DMSO durante 20 min à temperatura ambiente e depois imersos durante três minutos em uma solução de vitrificação contendo 17 % v / v de etileno glicol, 17 % v / v de DMSO e 0,75 M de sacarose em HEPES. Os ovários foram então transferidos individualmente com solução de vitrificação mínima para a superfície de um cubo de metal flutuando em nitrogênio líquido. Os ovários vitrificados foram mantidos em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 30-60 min. Usando fórceps, as amostras foram colocadas em criotubos arrefecidos contendo nitrogênio líquido, de acordo com um protocolo adaptado a partir de Wang et al (WANG, 2009).

Antes do reimplante, os frascos contendo as amostras foram retirados do botijão de nitrogênio líquido e expostos à temperatura ambiente durante um (01) minuto. Em seguida, cada amostra foi submetida a três banhos de 5 minutos em uma solução contendo Meio Essencial Mínimo + 10 % de soro fetal bovino e concentrações decrescentes de sacarose (0,5, 0,25 e 0,0 M), utilizando um protocolo adaptado a partir de Lunardi et al (LUNARDI, 2012).

Congelação lenta e aquecimento

O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Gosden e colaboradores (GOSDEN, 1994). Tiras de ovário foram colocadas em criotubos de 2 mL cheias com uma solução salina contendo crioprotector modificado tamponada com fosfato (Solução Salina Tamponada de Dulbecco - DPBS), 1,5 mmol / LDMSO e 20 % de soro humano albumina (Soro de Albumina Humana - HSA). Usando um congelador programável (Custom BioGenic Systems Model 2100 Controlled Rate Freezing System), os criotubos foram

- a) resfriados entre 0 ° C a -8 ° C a -2 ° C / min;
- b) resfriados a -40 ° C a -0,3 ° C / min;
- c) resfriados a -150 ° C a -30 ° C / min;
- d) imediatamente transferidos para nitrogênio líquido durante a armazenagem a temperatura de -196 °C.

Para descongelar o tecido cortical do ovário, os criotubos foram removidos do vaso Dewar e mantidos à temperatura ambiente durante 2 min, seguido por imersão num banho de água a 37 °C durante 2 minutos. Foi realizada então uma leve e suave agitação. Os conteúdos dos criotubos foram rapidamente esvaziados em placas de cultura com meio Leibovitz L - 15, e lavou-se 3 vezes com meio fresco para remover o crioprotetor residual antes do reimplante.

Histologia

As amostras dos ovários foram fixadas em paraformaldeído a 10% e incluídos em parafina para análise histológica. Foram realizados cortes seriados de 8 µm de espessura em um micrótomos e corados com hematoxilina e eosina. Utilizando-se de microscópio óptico

associado a um sistema de imagens, os cortes foram analisados para a verificação dos parâmetros de acordo com os critérios apresentados por Lara *et al.* (2000).

Para a realização deste protocolo foram utilizados os seguintes parâmetros de morfometria e histometria:

a) contagem de número de folículos por amostra:

- número de folículos primordiais normais: definidos como aqueles que apresentam cavidade bem definida contendo um oócito com um núcleo;
- número de folículos primordiais atrésicos: aqueles que apresentam células da granulosa em processo degenerativo e muitas vezes com aparente degeneração oocitária, de forma a apresentar ooplasma eosinofílico, contração e formação de grumos de cromatina ou membrana nuclear enrugada;

b) presença ou não de CL (HARRISON, 1980).

Foram submetidas à análise histológica em três momentos diferentes: i) previamente à ooforectomia, quando se presume que os ovários apresentem uma produção normal de folículos, ii) após a descongelação, a fim de comparar os resultados das duas técnicas de congelamento (congelamento lento e vitrificação) e iii) após a eutanásia, de modo a avaliar a integridade do enxerto um (01) mês após o reimplante do ovário, tanto na precoce como na tardia.

Análise estatística

As variáveis do estudo foram dicotômicas (presença/ausência). Usando o software GraphPad Prism 5.0, os resultados foram submetidos ao teste exato de Fisher e expressas como frequências absolutas e percentuais. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5 % ($p < 0,05$).

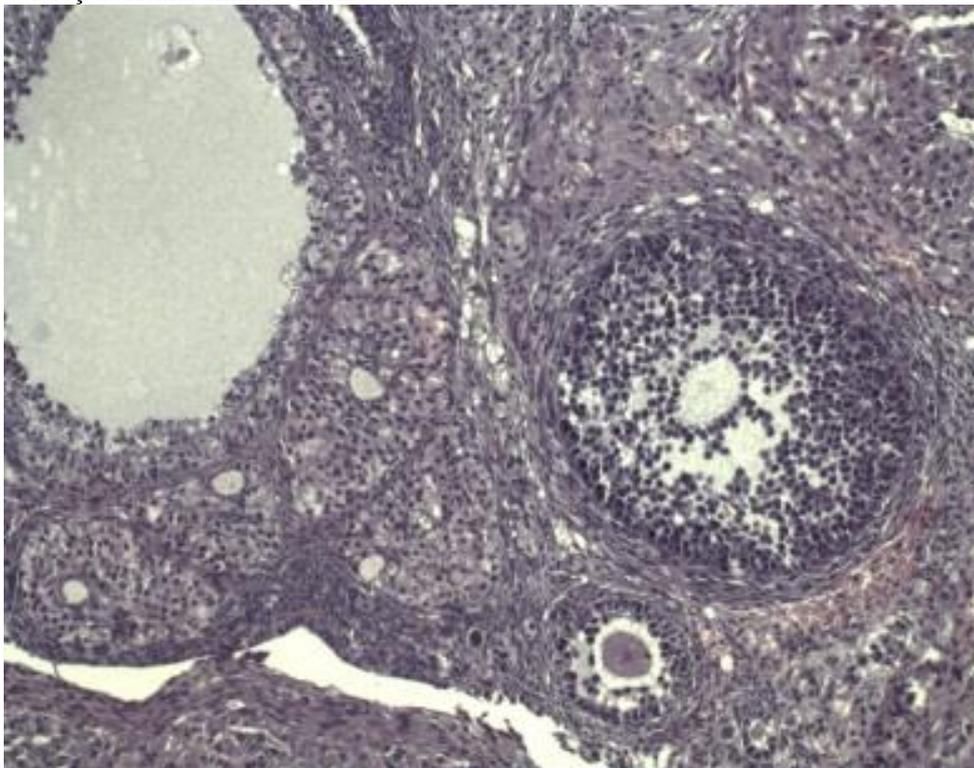
5 RESULTADOS

Congelação lenta

Duas das 10 ratas que receberam um enxerto ovariano criopreservado por congelação lenta morreram (mortalidade: 20%). O enxerto foi avaliado quanto à viabilidade antes de reimplantação em dois (25%) dos oito animais sobreviventes. Numa delas (50%), foram observados os folículos primordiais e do CL, resultados semelhantes aos encontrados na literatura (42 %). Após a eutanásia, ausência de enxerto de ovário foi sinalizado em 5 (62,5%) animais. Nos restantes três animais (38,5 %), houve pega do enxerto. Um deles (12,8 %) encontrou-se folículos atréticos enquanto 2 (25,6 %) havia a presença de folículos primordiais e CL (TABELA 1).

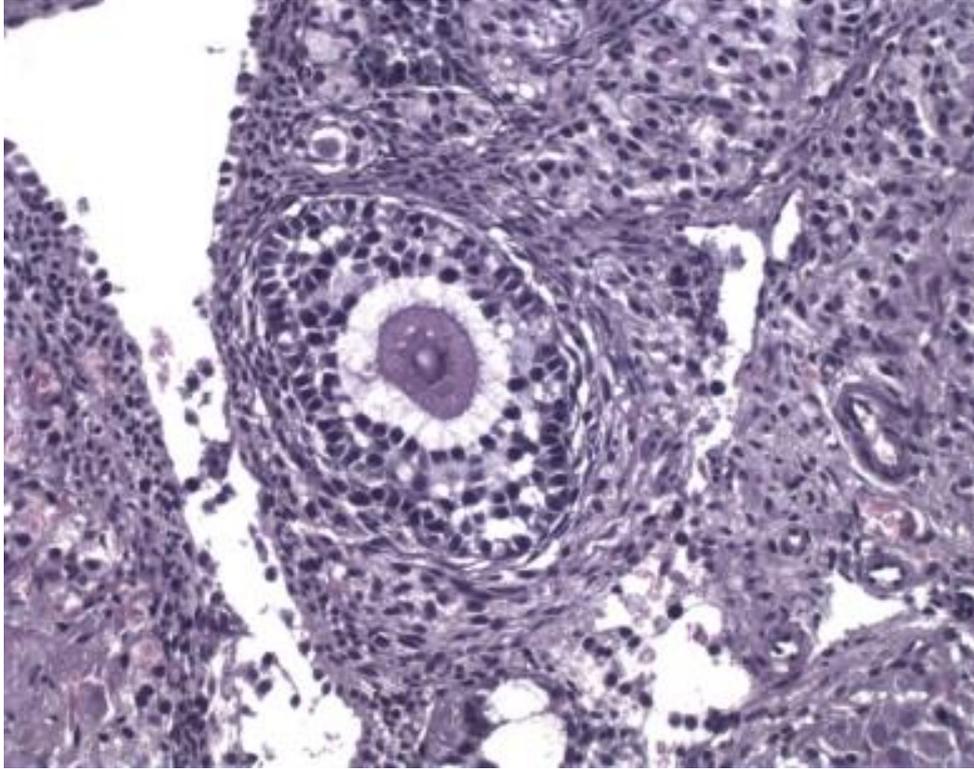
Na figura 15, registro por meio de fluxograma, dos resultados do grupo submetido à congelação lenta. Todos os três animais com enxerto bem sucedido pertenciam ao Grupo B (fase tardia pós-castração). Imagens histológicas dos reimplantes registradas nas figuras 13, 14, 16 e 17.

Figura 12 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 200x. Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.



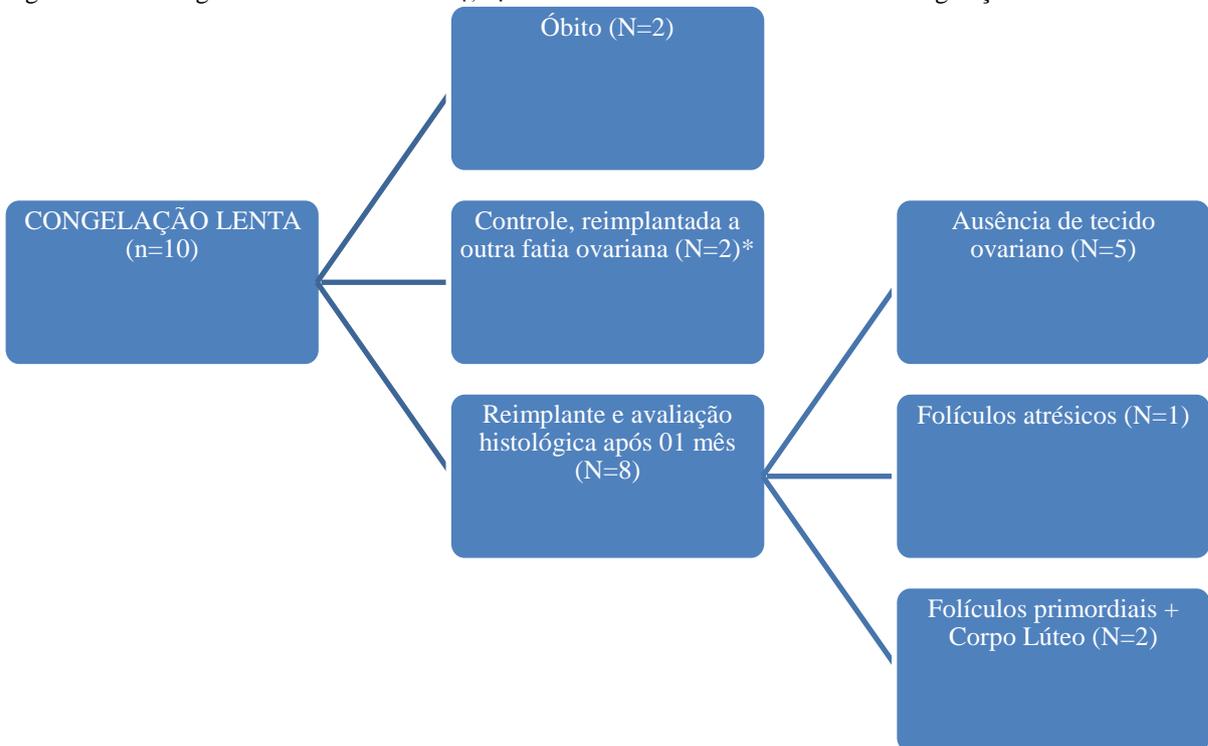
Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 13 – Folículos primordiais e corpo lúteo de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 400x. Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 14 – Fluxograma dos resultados do grupo de ovários das ratas submetidos à congelação lenta



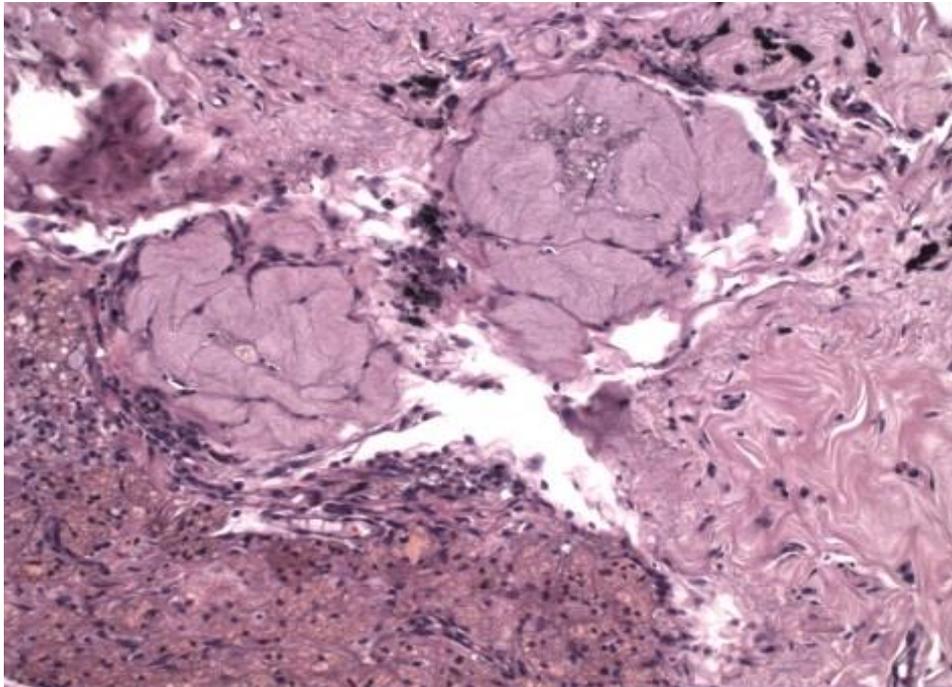
Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Vitrificação

Cinco das 23 ratas que receberam um enxerto ovariano criopreservado por vitrificação morreram (mortalidade: 15,1%). Seis enxertos selecionados aleatoriamente avaliados quanto à viabilidade (mas não implantados) apresentaram folículos primordiais e CL (5/6; 83,3%) e folículos atrécicos e primordiais (1/6; 16,7%). Os 12 restantes enxertos foram implantados.

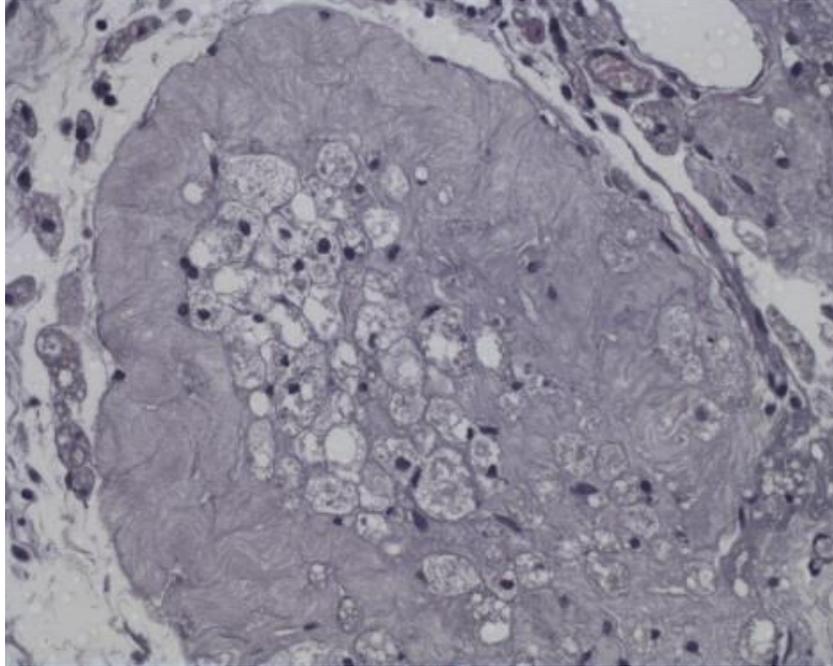
Após a eutanásia, ausência de enxerto de ovário foi o resultado em 6 (50%) animais, encontrando-se apenas reação inflamatória do tecido e / ou fibrose / cicatriz. Nos outros 6 animais (50 %) , houve pega do enxerto (FIGURA 9). Três deles (25 %) apresentaram folículos atrécicos, e destes dois (16,7%) apresentaram folículos tanto atrécicos como primordiais, e um (8,3%) apresentou folículos primordiais e CL. Na figura 18, registro por meio de fluxograma, dos resultados do grupo submetido à vitrificação.

Figura 15 – Folículos atrécicos de ratas após o reimplante. Magnificação de 200x. Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.



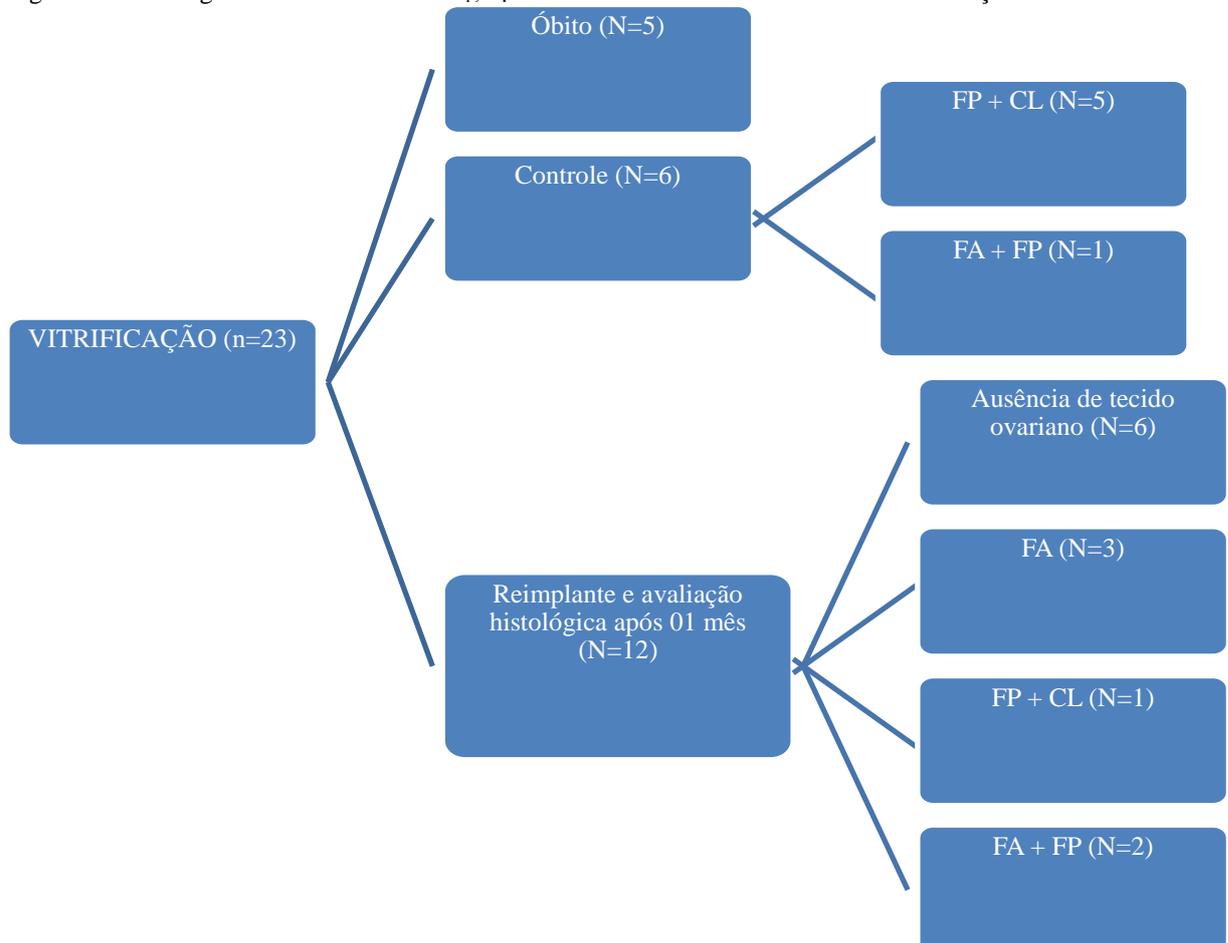
Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 16 – Folículos atrésicos de ovários de ratas após o reimplante. Magnificação de 400x. Método de coloração: Hematoxilina e Eosina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Figura 17 – Fluxograma dos resultados do grupo de ovários de ratas submetidos à Vitriificação



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

A maior parte (5/6) dos animais com enxerto bem sucedido pertenciam ao grupo B (fase tardia pós-castração) (Grupo B = 83,3 % vs Grupo A = 16,7 %), mas a diferença entre os grupos no que diz respeito ao índice de pega não foi estatisticamente significativa ($p = 0,080$).

Congelação lenta versus vitrificação

Após a descongelação, quando realizado o controle antes do reimplante, o tecido ovariano foi preservado em 50% das amostras por congelação lenta contra 100% dos espécimes vitrificados. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,400$).

Quanto ao sucesso da pega um mês após o reimplante, a vitrificação resultou em uma maior pega do que a congelação lenta (50 % versus 37,5%), mas a diferença também não foi estatisticamente significativa ($p = 0,400$).

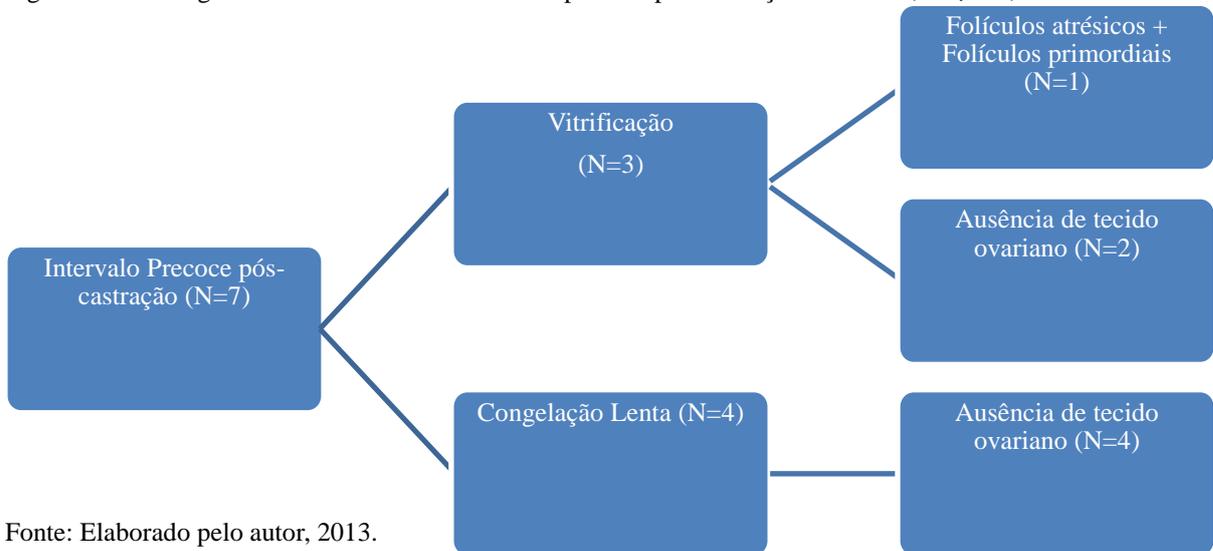
Grupos de intervalo precoce e tardio pós-castração

Seis das sete mortes mencionadas na seção que descreve o desenho do estudo foram em animais envolvidos na fase de intervalo precoce pós-castração (Grupo A). A elevada taxa de mortalidade neste grupo (6/13; 46 %) quando comparada com a do intervalo tardio pós-castração (Grupo B) (1/13, 7 %) deve estar associada ao estresse cirúrgico, considerando o curto período decorrido (uma semana) entre ooforectomia e reimplante. Assim, a mortalidade não está relacionada com a técnica de criopreservação empregada, mas sim com o tempo transcorrido entre as intervenções cirúrgicas.

Dos 20 animais na amostra final do experimento, sete (07) pertenciam ao Grupo A (castração precoce), conforme figura 18 e treze animais (13) pertenciam ao Grupo B (castração tardia), conforme figura 19. No grupo B, nove (09) ovários foram vitrificados, ocorrendo sucesso em cinco (05) (55,5 %) deles, enquanto quatro (04) ovários foram congelados lentamente, ocorrendo um único reimplante bem sucedido (25 %). No entanto, a diferença entre as técnicas não alcançou significância estatística ($p = 0,559$).

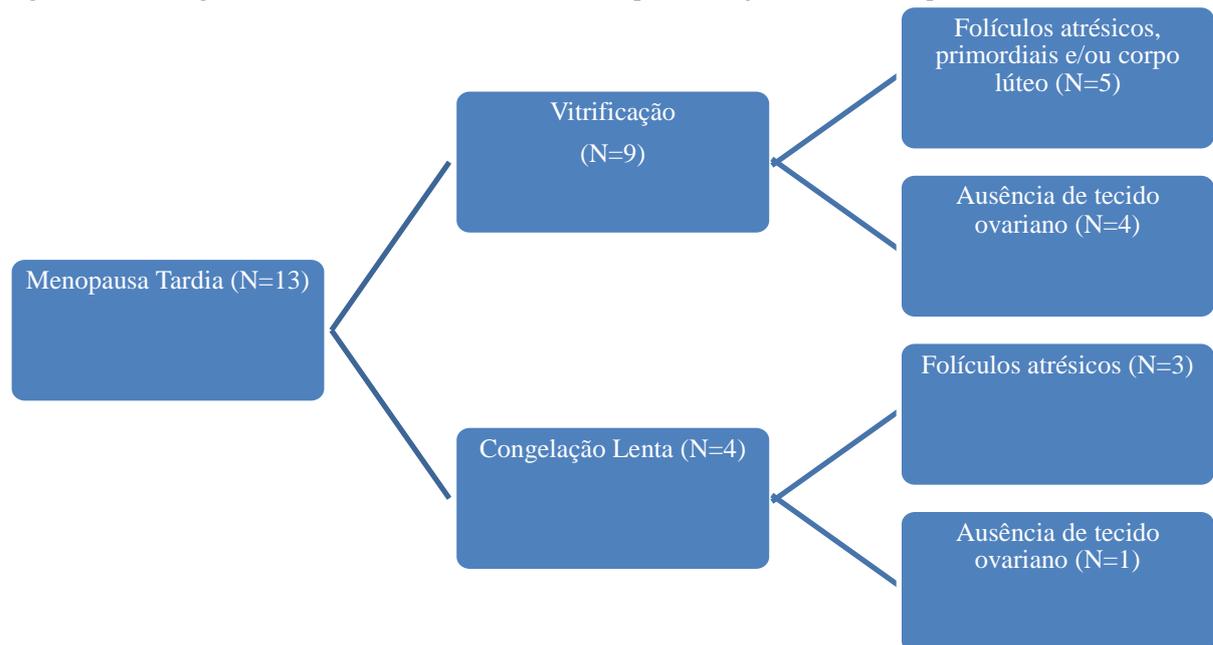
No grupo A, três (03) ovários foram vitrificados, ocorrendo um (01) (33,3 %) reimplante bem sucedido, enquanto que quatro (04) ovários foram congelados lentamente, sem nenhum reimplante bem sucedido (0 %). Mais uma vez, a diferença não foi significativa ($p = 0,429$). No entanto, quando as duas etapas no intervalo pós-castração (precoce versus tardio) foram comparados com relação à pega do enxerto, encontrou-se diferença estatisticamente significativa: a pega do enxerto foi 9,3 vezes maior em ratas no intervalo tardio (61,5 %) do que em ratas no intervalo precoce (14,3 %) ($p = 0,043$).

Figura 18 – Fluxograma dos resultados de intervalo precoce pós-castração das ratas (Grupo A)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2013.

Figura 19 – Fluxograma dos resultados de intervalo tardio pós-castração de ratas (Grupo B)



Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Tabela 4 – Achados histológicos após o reimplante do tecido ovariano em 20 ratas Wistar

Criopreservação Ovariana e Reimplante					
Animal	Estágio Pós-Menopausa		Achados Histológicos após o Reimplante	Técnica de Criopreservação	
	Precoce	Tardia		Vitrificação	Congelação Lenta
1		X	FP + CL	X	
2		X	FA	X	
3	X		FA + FP	X	
4		X	FA	X	
5		X	∅ TO	X	
6		X	FA	X	
7	X		∅ TO	X	
8	X		∅ TO	X	
9		X	∅ TO	X	
10		X	∅ TO	X	
11		X	FA + FP	X	
12		X	∅ TO	X	
13	X		∅ TO		X
14	X		∅ TO		X
15	X		∅ TO		X
16		X	FA		X
17		X	∅ TO		X
18	X		∅ TO		X
19		X	FP + CL		X
20		X	FP + CL		X

Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

Legenda:

CL = Corpo Lúteo

FA = Folículo Atrésico

FP = Folículo Primordial

∅ TO = Ausência de Tecido Ovariano

Tabela 5 – Comparação dos desfechos – sucesso ou falha por tempo de castração de ratas

Tempo de Reimplante	Técnica de Congelação	Desfecho Histológico	
		Sucesso	Falha
Precoce	Vitrificação	1	2
	Congelação Lenta	-	4
	Total	1	6
Tardia	Vitrificação	5	4
	Congelação Lenta	3	1
	Total	8	5

Fonte: Elaborada pelo autor (2013).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizado um modelo de rato para comparar duas técnicas de criopreservação (congelamento lento versus vitrificação) e avaliar a influência do estado pós-ooforectomia ou pós-castração (intervalo precoce versus tardio) na pega do enxerto. Nossos resultados levantam questões sobre o momento ideal de reimplante de ovário em relação ao metabolismo hormonal. Em outras palavras, o tempo de ausência da função do ovário parece determinar a forma como o organismo reage ao reimplante.

Apesar de ser uma técnica promissora, a criopreservação de tecido ovariano só resultou em cerca de 20 nascimentos humanos vivos até o momento. Muitas pesquisas são necessárias para melhorar as taxas de sucesso para ambas as técnicas de congelamento lento e vitrificação e para garantir a saúde de crianças nascidas de tais tratamentos.

Em um estudo, por exemplo, 27 pacientes receberam tratamentos semelhantes, oito tinham evidência de crescimento de folículos antrais e oócitos foram recuperados, mas em apenas um houve nascimento (KAWAMURA, 2013).

Na literatura observam-se taxas de viabilidade após a vitrificação, sem o reimplante, com valores entre 64,7% (XING, 2010) e 74% (AMORIM, 2004), relativamente semelhantes às obtidas nesta pesquisa (83,3%). Tais diferenças podem se configurar pelas distintas formas de avaliar histologicamente as peças, que mesmo padronizadas, apresentam resultados conforme a leitura do patologista, ou seja, é um método “operador dependente”.

Nota-se ainda o fato de o protocolo de vitrificação utilizado nesta pesquisa ser o mais recente daqueles utilizados em trabalhos com desenhos semelhantes ao nosso. Embora o trabalho de Xing tenha sido publicado em 2010, o protocolo que ele utilizou data de 2008. O protocolo que utilizamos é descrito por Wang e data de 2009.

A taxa geral de sucesso na pega do enxerto foi de 45% após a criopreservação. Em trabalhos semelhantes, porém com o reimplante imediato do tecido ovariano, sem submetê-lo a técnicas de criopreservação, os índices foram próximos a 60% (ALBERTI, 2002). Na vitrificação esse índice foi de 50% e na congelamento lento foi de 37,5%.

A vitrificação resultou em um maior índice de pega do que a congelação lenta (50 % versus 37,5 %) e folículos estavam presentes em todas as amostras. A taxa de sucesso de congelação lenta foi semelhante para as taxas relatadas na literatura: estudos *in vitro* sugerem que a vitrificação de tecido do ovário pode ter melhores resultados em relação à viabilidade do oócito em relação à congelação lenta (LUNARDI, 2012).

Durante o Congresso Mundial de Preservação da Fertilidade de 2009, na Bélgica, uma lista foi dada sobre as vantagens e desvantagens de vitrificação aplicada à criopreservação de ovário humano. As vantagens foram enumeradas: i) excelente sobrevivência do estroma ovariano e os vasos sanguíneos, ii) a técnica é rápida de se executar, iii) nenhum equipamento sofisticado é necessário, iv) a técnica é clinicamente viável, e v) excelente sobrevida em cultura de tecidos (SHEIKHI, 2009).

Por outro lado, as desvantagens incluíram:

- a) não nascidos vivos notificados até 2009;
- b) a técnica requer um nível considerável de formação;
- c) a técnica é muito sensível a variações de concentração, osmolaridade e velocidade do procedimento;
- d) os tecidos ovarianos podem ser danificados por toxicidade se o cirurgião não está devidamente treinado (SHEIKHI, 2009).

No entanto, estudos recentes que descrevem nascimentos humanos posteriores à criopreservação ovariana e reimplante, juntamente com os resultados do presente estudo, indicam que a técnica tem sido dominada apesar de sua complexidade.

O assunto do estado pós-castração da rata tem sido pouco discutida na literatura. Neste experimento, foi observada uma diferença significativa entre as ratas no intervalo precoce e tardio pós-castração (Grupos A e B) em relação à taxa de pega dos enxertos. Este achado pode ser interpretado à luz de dois importantes estudos, um por López- Grueso (LÓPEZ-GRUESO, 2014) e um por Ahmed e colaboradores (RAAFAT, 1999).

O primeiro estudo analisou o estresse oxidativo e Terapia de Reposição Estrogênica (TRE) nas diferentes fases pós-castração (precoce versus tardia). Na precoce, mas

não na tardia, o início da TRE preveniu o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio mitocondriais, o dano oxidativo para lípidos e proteínas, e uma diminuição na atividade de glutathione peroxidase e catalase em ratos. Os autores concluíram que, possivelmente, a razão de Receptor de ER α / β é aumentada pela ooforectomia e reduzida pela reposição imediata de estrogênio. A ooforectomia reduz Transportador de Glicose (GLUT-1) e três transportadores de glicose no cérebro, e a administração precoce de estrogênio impede esse efeito. Os achados de uma melhor resposta fisiológica à TRE durante o intervalo precoce pós-castração, em vez de tardia, contradizem os achados do presente estudo.

O segundo estudo, que avaliou a resposta da glândula mamária para TRE em roedores, encontrou que o tratamento é mais eficaz em animais no intervalo tardio pós-castração. Os autores examinaram os efeitos da TRE sobre a morfologia das glândulas mamárias, a proliferação celular e a regulação do receptor de progesterona no intervalo precoce pós-castração (1 semana pós- ooforectomia) e intervalo tardio pós-castração (cinco semanas pós- ooforectomia). O estudo explorou os efeitos da TRE precoce versus tardia na glândula mamária e demonstrou que o intervalo tardio pós-castração foi associado com uma melhor resposta proliferativa ao estrogênio. Esse resultado foi evidenciado morfológicamente por acentuada hiperplasia no final do ducto. Esta resposta mitogênica aumentada de estrogênio foi localizada na extremidade do epitélio (aumento de 4 vezes) e nas células do estroma adjacente (aumento de 6,5 vezes).

O tratamento com estrogênio em longo prazo produziu uma resposta proliferativa em estado estacionário mais baixo. No entanto, ambas as proliferações celulares epiteliais e estromais eram duas vezes maior quando o tratamento estrogênio em longo prazo foi iniciado em 5 semanas versus uma semana após a ooforectomia . Em outras palavras, uma resposta proliferativa aumentada ao estrogênio foi observada nos animais pós-menopausa tardia. Em contraste, não foi observada nenhuma resposta morfológica e proliferação de células epiteliais e do estroma mínima após qualquer período de tratamento com estrogênio na pós-menopausa precoce (RAAFAT, 1999).

Os resultados desta pesquisa sugerem que, apesar dos efeitos melhorados em relação ao estresse oxidativo durante a fase pós-menopausa precoce, a pega do enxerto de ovário apresenta melhores taxas de sucesso na fase pós-menopausa tardia do que na fase pós-menopausa precoce. Esta opinião é corroborada pela maior resposta glandular mamária à TRE

observada em roedores na pós-menopausa tardia.

A vitrificação mostrou ser superior à congelação como técnica de criopreservação do ovário, e a enxertia foi significativamente mais bem sucedida quando o ovário foi reimplantado na fase de pós-menopausa tardia. Estes resultados podem ser úteis em estudos futuros, especialmente para se avaliar o momento ideal de início de TRE em mulheres.

7 CONCLUSÃO

A técnica de criopreservação de tecido ovariano permite sua viabilidade após a descongelação, preservando a integridade histológica do tecido.

As técnicas da congelação lenta e da vitrificação se mostraram eficientes após a descongelação de ovário de ratas, especialmente aquelas submetidas à vitrificação.

Os tecidos ovarianos de ratas podem ser reimplantados no omento maior e manterão sua integridade morfológica, até aos trinta dias.

O tempo entre a ooforectomia e o reimplante, de acordo com o intervalo pós-castração, precoce ou tardio, influencia no resultado final da pega do enxerto.

Houve melhor pega do enxerto, com melhor qualidade histológica, nas ratas pós-castração tardia.

REFERÊNCIAS

- ABSOLOM, K. et al. Predictors of clinic satisfaction among adult survivors of childhood câncer. **Europ J Cancer**, v. 42, n. 10, p. 1421-1427, 2006.
- ALBERTI, Luiz Ronaldo; VASCONCELLOS, Leonardo de Souza; BARBOSA, Juliano Ferreira; PETROIANU, Andy. Implante Autólogo Ovariano no Omento Maior: Estudo Experimental. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** [online], v. 24, n. 3, p. 187-192, 2002.
- ASRM - AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. **Fertil Steril**, v. 83, n. 6, p. 1622-8, 2005.
- ANDERSEN, C. Y.; ROSENDAHL, M.; BYSKOV, A. G.; LOFT, A.; OTTOSEN, C.; DUEHOLM, M.; SCHMIDT, K. L. T.; ANDERSEN, A. N.; ERNST, E. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Hum. Reprod.**, v. 23, p. 2266-2272, 2008.
- ANDERSON, R. A. et al. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Hum Reprod**, v. 21, n. 10, p. 2583-2592, 2006.
- AUBARD, Y.; PIVER, P.; PECH, J. C.; GALINAT, S.; TEISSIER, M. P. Ovarian tissue cryopreservation and gynecologic oncology: a review. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 97, p. 5-14, 2001.
- BALSARA, S. L.; FAERBER, J. Á.; SPINNER, N. B.; FEUDTNER, C. Pediatric mortality in males versus females in the United States, 1999-2008. **Pediatrics**, v. 132, n. 4, p. 631-638, Oct. 2013.
- BATH, L. E. et al. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. **Hum Reprod**, v. 18, n. 11, p. 2368-2374, 2003.
- BINES, B. J.; OLESKE, D. M.; COBLEIGH, M. A. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 5, p. 1718-1729, 1996.
- BINKLEY, N.; KRUEGER D. Combination therapy for osteoporosis: considerations and controversy. **Curr Osteoporos Rep**, v. 3, p. 150-154, 2005.
- BLEYER, W. A. Cancer in older adolescents and young adults: Epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 50, p. 613-619, 2002.
- BLUMENFELD, Z. et al. Fertility after treatment for Hodgkin's disease. **Ann Onc**, v. 13, p. 138-147, 2002.

BLUMENFELD, Z. Preservation of fertility and ovarian function and minimalization of chemotherapy associated gonadotoxicity and premature ovarian failure: the role inhibin-A and -B as markers. **Mol Cell Endocrinol**, v. 187, p. 93-105, 2002.

_____. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes or ovaries. **Oncologist**, v. 12, p. 1044-1054, 2007.

BLUMENFELD, Z.; HAIM, N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. **Ann Med**, v. 29, n. 2, p. 199-206, 1997.

BOISSEL, N.; AUCLERC, M. F.; LHÉRITIER, V. Should adolescents with acute lymphoblastic leukemia be treated as old children or young adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 trials. **J Clin Oncol.**, v. 21, p. 774-780, 2003.

BOKSER, L.; SZENDE, B.; SCHALLY, A.V. Protective effects of D-Trp-6-luteinizing hormone-releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. **Br J Cancer**, v. 61, p. 861-5, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de informações sobre mortalidade (SIM). Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.

BUNGE, R. G.; KEETTEL, W. C.; SHERMAN, J. K. Clinical use of frozen semen: report of four cases. **Fertil Steril**, v. 5, n. 6, p. 520-529, 1954.

CARTER, J. et al. Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility. **Gynecol Oncol**, v.97, p. 90-95, 2005.

CHAPMAN, R. M.; SUTCLIFFE, S. B. Protection of ovarian function by oral contraceptives in women receiving chemotherapy for Hodgkin's disease. **Blood**, v. 58, n. 4, p. 849-851, 1981.

DAVIS, S. R.; BURGER, H. G. Clinical review 82: androgens and postmenopausal woman. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 2759-63, 1996.

DECHERNEY, A. H. et al. Preservation fertility after cancer: What are our options? **Sexuality Reproduction Menopause**, v. 3, n. 2, p. 78-82, 2005.

DEMEESTERE, I.; SIMON, P.; EMILIANI, S.; DELBAERE, A.; ENGLERT, Y. Options to preserve fertility before oncological treatment: Cryopreservation of ovarian tissue and its clinical application. **Acta Clinica Belgica**, v. 61, p. 259-263, 2006

DENG, X.; ZHENG, H.; YU, X.; YU, H.; ZHANG, C.; CHAO, L.; LI, R.; LIU, W. Cryopreserved ovarian tissues can maintain a long-term function after heterotopic autotransplantation in rat. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 519-525, Sep. 2009.

DOMINGO, J. Planteamiento reproductivo en pacientes oncológicos. Situaciones especiales en reproducción. In: **Curso avanzado de reproducción asistida**. Instituto Valenciano de Infertilidad. 2013. Cap. 4. Mód. 4.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; DEMYLLE, D.; JADOUL, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN, L. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet** **364**, p. 1405-1410, 2004.

ERNST, E.; BERGHOLDT, S.; JORGENSEN, J. S.; ANDERSEN, C. Y. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Hum Reprod**, v. 25, p. 1280-1281, 2010.

FALCONE, T. et al. Ovarian function preservation in the cancer patient. **Fertil Steril**, v. 81, n. 2, p. 243-257, 2004.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. **Physiology of Reprod.**, v. 45, p. 613-665, 1994.

GANZ, P. et al. Breast cancer in young women: Reproductive and late health effects of treatment. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 22, p. 4184-4193, 2003.

GHOSH, S. et al. Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats. **Reprod Toxicol**, v. 15, p. 221-225, 2001.

GLOECKLER RIES, L. A. et al. Cancer Survival and incidence from the surveillance, Epidemiology, and End results (SEER) program. **Oncologist**, v. 8, n. 6, p. 541-552, 2003.

GOSDEN, R. G.; BAIRD, D. T.; WADE, J. C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. **Hum Reprod.**, v. 9, p. 597-603, 1994.

GOSDEN, R. G.; BAIRD, D. T.; WADE, J. C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C . **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 597-603, 1994.

GREENBERG, M.; URBACH, S. Preserving the fertility of children with cancer. **Med J Aust**, v. 185, n. 10, p. 532-533, 2006.

HARRISON, F. A.; CHAMBERS, S. G.; GREEN, E. A. Autotransplantation of the ovary to the neck in the sow: normal cyclic activity and plasma hormone levels. **J Endocrinol**, v. 83, p. 46-50, 1980.

HARRISSON, F. A.; CHAMBERS, S. G.; GREEN, E. A. Autotransplantation of the ovary to the neck in the sow: normal cyclic activity and plasma hormone levels. **J Endocrinol**, v. 83, p. 46-50. 1980

HEATH, J. A.; STERN, C. J. Fertility preservation in children newly diagnosed with cancer: exist in standards of practice in Austrália and New Zealand. **Med J Aust**, v. 185, n. 10, p. 538-541, 2006.

HIRSHFIELD, A. N. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. **Biol Reprod.**, v. 44, n. 6, p. 1157-1162, jun. 1991.

HORNE, G.; ATKINSON, A. D.; PEASE, E. H.; LOGUE, J. P.; BRISON, D. R.; LIEBERMAN, B. A. Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report. **Hum Reprod**, v. 19, p. 1448-1449, 2004.

HSU, W. L.; CHEN, C. Y.; TSAUO, J. Y.; YANG, R. S. Balance control in elderly people with osteoporosis. **J Formos Med Assoc.**, mar. 2014.

IHA, T. et al. Restoration of menstruation after chemotherapy-induced amenorrhoea in a patient with ovarian immature teratoma. **Europ J Obstet Gynecol.**, v. 98, p. 249-250, 2001.

IMAI, A.; FURUI, T.; YAKAMOTO, A. Preservation of female fertility during cancer treatment. **Reprod Med Biol**, v. 7, n. 1, p. 17-27, 2008.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. Rio de Janeiro, 2008. 220 p.

_____. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro, 2014. 124 p.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin.**, v. 56, n. 2, p. 106-130, 2006.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Human Reproduction**, v. 17, n. 7, p. 1863-74, 2002.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, 2013.

KERI, R. A.; WOLFE, M. W.; SAUNDERS, T. L.; ANDERSON, I.; KENDALL, S. K.; WAGNER, T.; YEUNG, J.; GORSKI, J.; NETT, T. M.; CAMPER, S. A. The proximal promoter of the bovine luteinizing hormone beta-subunit gene confers gonadotrope-specific expression and regulation by gonadotropin-releasing hormone, testosterone, and 17 beta-estradiol in transgenic mice. **Mol Endocrinol**, v. 8, n. 12, p. 1807-1816, Dec. 1994.

KIM, S. et al. The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. **Fertil Steril**, v. 75, n. 6, p. 1049-1056, 2001.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191-206, Aug. 2006.

KRAMÁROVÁ, E.; MANN, J. R.; MAGNANI, C.; CORRAZIARI, I.; BERRINO, F. Survival of children with malignant germ cell, trophoblastic and other gonadal tumours in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 750-759, 2001.

LANTINGA, G.M. et al. Imminent ovarian failure in childhood cancer survivors. **Eur J Cancer**, v. 42, p. 1415-1420, 2006.

LARA, H. E. et al. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. **Endocrinology**, n. 141, p. 1073-1082, 2000.

LARSEN, E. C. et al. Reduce ovarian function in long-term survivors of radiation-and chemotherapy-treated childhood cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 11, p. 5307-5314, 2003.

LEE, S. J.; SCHOVER, L. R.; PARTTIDGE, A. H.; PATRIZIO, P.; WALLACE, H.W.; HAGERTY, K.; BECK, L.N.; BRENNAN, V. L.; OKTAY, K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 24, p. 2917-2931, 2005.

LEE, S. J. et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 4, n. 18, p. 2917-2931, 2006.

LETTERIE, G. S. Anovulation in the prevention of cytotoxic-induced follicular attrition and ovarian failure. **Hum Reprod**, v. 19, n. 4, p. 831-837, 2004.

LEVI, F.; LA, V. C.; NEGRI, E.; LUCCHINI, F. Childhood cancer mortality in Europe, 1955–1995. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 785-809, 2001.

LI, J.; THOMPSON, T. D.; MILLER, J. W.; POLLACK, L. A.; STEWART, S. L. Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. **Pediatrics**, v. 121, n. 6, p. 1470-1477, jun. 2008.

LI, Q.; CHEN, Y.; YANG, L.; SUN, Y.; WANG, Y.; ZHU, J. Ovarian function reconstruction by orthotopic transplantation of novel vitrification cryopreserved ovaries in chemotherapy-induced ovary damage rat model. **Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi**, v. 27, n. 9, p. 1116-1121, Sep. 2013.

LINET, M. et al. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. **J Nat Cancer Inst**, v. 91, n. 10, p. 1051-1058, 1999.

LOBO, R. A. Potential options for preservation of fertility in women. **N Engl J Med**, v. 353, p. 64-73, 2005.

LÓPEZ-GRUESO, R.; GAMBINI, J.; MOHAMED, K.; MONLEÓN, D.; DÍAZ, A.; ALAMI, M.; BONET, C. B.; VIÑA, J. Early, but not late-onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 2, p. 236-246, 2014.

LUNARDI, F. O.; ARAÚJO, V. R.; FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BAO, S. N.; OLAZIANAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RIBEIRO RODRIGUES, A. P. I. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Rumin. Res.**, v. 107, p. 121-130, 2012.

- MAGNANI, C.; AARELEID, T.; VISCOMI, S.; PASTORE, G.; BERRINO, F. Variation in survival of children with central nervous system (CNS) malignancies diagnosed in Europe between 1978 and 1992: the EUROCARE study. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 711-721, 2001.
- MAGRATH, I. Limiting therapy for limited childhood non-Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med**, v. 337, n. 18, p. 1304-1306, 1997.
- MALTARIS, T. et al. Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. **Asian J Androl**, v. 8, n. 5, p. 515-533, 2006.
- MALTARIS, T. et al. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 130, n. 2, p. 148-155, 2007.
- MARHHOM, E.; COHEN, I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 62, n. 1, p. 58-72, 2006.
- MAUNSELL, E. et al. Quality of life among long-term adolescent and adult survivors of childhood cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 16, p. 2527-2535, 2006.
- MEIROW, D.; LEVRON, J.; ELDAR-GEVA, T.; HARDAN, I.; FRIDMAN, E.; ZALEL, Y.; SCHIFF, E.; DOR, J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **New Eng. J. Med.**, v. 353, p. 318-321, 2005.
- MUKAIDA, T.; NAKAMURA, S.; TOMIYAMA, T.; WADA, S.; KASAI, M.; TAKAHASHI, K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. **Fertil Steril**, v. 76, n. 3, p. 618-620, 2001.
- NORBERTO, G. C. **Atlas de Anatomia Animal**. São Paulo: Departamento de Fisiologia; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo. 2002.
- OKTAY, K. 1.; BUYUK, E.; OKTEM, O.; OKTAY, M.; GIANCOTTI, F. G. The c-Jun N-terminal kinase JNK functions upstream of Aurora B to promote entry into mitosis. **Cell Cycle**, v. 15-17, n. 4, p. 533-541, Feb. 2008.
- OKTAY, K. et al. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy induced gonadal injury. **Oncologist**, v. 12, p. 1055-1066, 2007.
- OKTAY, K. et al. Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, p. 4044-4046, 2006.
- OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. **N Engl J Med**, v. 342, p. 1919, 2000.
- OKTAY, K.; SÖNMEZER, M. Fertility preservation in gynecologic cancers. **Curr Opin Oncol**, v. 19, p. 506-511, 2007.
- OKTAY, K.; TILLY, J. Live birth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. **Lancet**, v. 364, p. 2091-2, 2004.

OKTAY, K.; TURKCUOGLU, I.; RODRIGUEZ-WALLBERG, K. A. Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: What is the explanation? **Fertil. Steril.**, v. 95, 2011

ORTIN, T. T.; SHOSTAK, C. A.; DONALDSON, S. S. Gonadal status and reproductive function following treatment for Hodgkin's disease in childhood: the Stanford experience. **Int J Radiat Onc Biol Phys**, v. 19, p. 873-880, 1990.

PARKIN, DM. Epidemiology of cancer: global patterns and trends. **Toxicol Lett.**, v. 28, n. 102-103, p. 227-234, Dec.1998.

PARROT, D. M. Y. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. **J Reprod Fert**, v. 1, p. 230-241, 1960.

PARTRIDGE, A. H.; WINER, E.P. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 20, p. 4174-4183, 2004.

PENTHEROUDAKIS, G.; PAVLIDIS, N. Late toxicity in survivors from adolescent cancers. **Cancer Treat Rev**, v. 33, n. 7, p. 656-663, 2007.

PINTO, C. M. H. **Atlas Anatômico de rato**. Santa Catarina: CFS/CCB/Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79° C. **Nature**, v. 169, p. 626-7, 1952.

RAAFAT, A. M.; HOFSETH, L. J.; LI, S.; BENNET, J. M.; HASLAM, S. Z. A mouse model to study the effects of hormone replacement therapy on normal mammary gland during menopause: enhanced proliferative response to estrogen in late postmenopausal mice. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2570-2580; 1999.

RIVKEES, S. A.; CRAWFORD, J. D. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. **JAMA**, v. 259, p. 2123-2125, 1988.

ROCCA, W. A.; GROSSARDT, B. R.; SHUSTER, L. T. Oophorectomy, estrogen, and dementia: A 2014 update. **Mol Cell Endocrinol**, [Epub ahead of print] Review, 2014.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BAO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 84, p. 211-227; 2004.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BAO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 61, p. 1009-1024, 2004

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; BERTHOLLET, C.; LORNAGE, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertil. Steril.**, v. 80, p. 172-177, 2003

SÁNCHEZ-SERRANO, M.; CRESPO, J.; MIRABET, V, et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. **Fertil Steril**, v. 93, p. 268, 2010.

SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; LOWE, M. P. Perspectives on oncofertility: preserving fertility for young cancer patients. **Endocrine News**, v. 33, p. 14-19, 2008.

SHEIKHI, M.; LUNDQVIST, K.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, O. **Clinical Grade Vitrification of Human Ovarian Tissue**. Oral Communications, World Congress on Fertility Preservation, 2009.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Update**, v. 11, n. 5, p. 461-471, Sep./Oct. 2005.

SKLAR, C. A. et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. **J Natl Cancer Inst.**, v. 98, n. 13, p. 890-6, 2006.

SÖNMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. **Oncologist**, v. 11, n. 5, p. 422-434, 2006.

SPEECHLEY, K. N. et al. Health-related quality of life among child and adolescent survivors of childhood cancer. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 16, p. 2536-2543, 2006.

SPEROFF, T.; DAWSON, N. V.; SPEROFF, L.; HABER, R. J. A risk-benefit analysis of elective bilateral oophorectomy: effect of changes in compliance with estrogen therapy on outcome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 164, p. 165-74, 1991.

STELIAROVA-FOUCHER, E.; STILLER, C.; KAATSCH, P.; BERRINO, F.; COEBERGH, J. W.; LACOUR, B.; PARKIN, M. Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe since the 1970s (the ACCIS project): an epidemiological study. **Lancet**, Dec. 2004.

STEWART, D. L. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Veterinary Record**, v. 63, p. 65-6, 1951.

STILLER, C. (Ed.). **Childhood Cancer in Britain: Incidence, Survival, Mortality** Oxford. Oxford: University Press, 2007.

STOCKARD, C. R.; PAPANICOLAOU, G. N. The existence of a typical estrous cycle in guinea pig with a study of its histological and physiological changes. **Am J Anat.**, v. 22, p. 225-265, 1917.

TEINTURIER, C.; HARTMANN, O.; VALTEAU-COUANET, D.; BENHAMOU E.; BOUGNERES, P. F. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: High-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, p. 989-994, 1998.

TERRACINI, B.; COEBERGH, J. W.; GATTA, G.; MAGNANI, C.; STILLER, C.; VERDECCHIA, A.; ZAPPONE, A. Childhood cancer survival in Europe: an overview. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 810-816, 2001.

THOMSON, A.B. CRITCHLEY H O D and WALLACE W H B. Fertility and progeny. **Eur J Cancer**, v. 38, p. 1634-1644, 2002.

TILLY, J. L. Johnson J. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? **Cell Cycle**, v. 15-16, n. 8, p. 879-83, Apr. 2007.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VILELA, M. G. et al. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n. 10, out. 2007.

WALLACE, W. H. et al. Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Med Pediatr Oncol**, v. 21, p. 333-339, 1993.

WALLACE, W. H.; ANDERSON, R.; BAIRD, D. Preservation of fertility in young women treated for cancer. **Lancet Oncol**, v. 5, p. 269-270, 2004.

WANG, X. Q.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. **Reproduction**, v. 138, p. 527-535, 2009.

WOODRUFF, T. K.; SNYDER, K. A. **Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors Series: Cancer Treatment and Research**. New York: Springer, 2008. v. 138.

XING, W.; ZHOU, C.; BIAN, J.; MONTAG, M.; XU, Y.; LI, Y.; LI, T. Solid-surface vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, 8, p. 42, 2010.

ZHANG, J. M.; SHENG, Y.; CAO, Y. Z.; WANG, H. Y.; CHEN, Z. J. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries. **J. Ass. Reprod. Genet.**, v. 28, p. 627-633; 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo – Estudo histológico dos ovários de ratos congelados por vitrificação ou congelação lenta e reimplantados na pós-menopausa precoce ou tardia

Submetido a Revista Acta Cirúrgica Brasileira.

Aceito para publicação na edição de maio de 2014.

Corresponding author: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro

Departamento de Cirurgia, Rua Prof. Costa Mendes 1608, 3º Andar, Bloco Didático da Faculdade de Medicina/UFC, Rodolfo Teófilo, 60.430-140, Fortaleza, Ceará, Brazil
Phone: +55 85 33 66 80 62 / Fax: +55 85 33 66 80 65 / E-mail: cirurgia@ufc.br

Conflito de Interesse: Nenhum.

Financiamento: Nenhum

¹ Research performed at the Experimental Animal Laboratory of the Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil. Part of PhD thesis, Postgraduate Program in Medical and Surgical Sciences, Federal University of Ceará (UFC).
Tutor: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro.

ARTIGO SUBMETIDO E ACEITO**Histological study of rat ovaries cryopreserved by vitrification or slow freezing and reimplanted in the early or late postmenopausal stage**

Estudo histológico dos ovários de ratos congelados por vitrificação ou congelação lenta e reimplantados na pós-menopausa precoce ou tardia

João Marcos de Meneses e Silva^I, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro^{II}, José Alberto Dias Leite,^{III} Lígia Helena Ferreira Melo^{IV}, Franciele Osmarini Lunardi^V, Rômulo Cesar Costa Barbosa Filho^{VI}, Cindy Vitalino Mendonça^{VII}

I- Fellow PhD degree in Medical and Surgical Sciences, Department of Surgery, School of Medicine, UFC, Fortaleza, Ceará, Brazil. Designed the study, performed technical procedures, analyzed and interpreted findings, wrote and reviewed the manuscript.

II - PhD, Full Professor, Department of Surgery, School of Medicine, UFC, Fortaleza, Ceará, Brazil. Made substantial scientific and intellectual contributions to the study and reviewed the manuscript.

III – PhD, Full Professor, Department of Surgery, School of Medicine, UFC, Fortaleza, Ceará, Brazil. Made substantial scientific and intellectual contributions to the study.

IV - MD, Department of Radiology, General Army Hospital of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil. Performed technical procedures, collected data and analyzed and interpreted findings.

V- Master Veterinarian, Veterinary Medicine, Veterinary School, State University of Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil. Performed technical procedures and made substantial scientific and intellectual contributions to the study.

VI - Resident, Department of Surgery, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Fortaleza, Ceará, Brazil. Collected data and performed technical procedures.

VII - Graduate student, School of Medicine, UFC, Fortaleza, Ceará, Brazil. Performed technical procedures. Responsible for the English language version.

Abstract

Purpose: To compare two rat ovary cryopreservation techniques (vitrification vs. slow freezing) and two postmenopausal stages (early vs. late) with regard to graft take.

Methods: Thirty-three Wistar rats were submitted to bilateral oophorectomy. One ovary was submitted to histological analysis while the other was cryopreserved by slow freezing or vitrification. The cryopreserved ovary was thawed and reimplanted in the greater omentum one week (early menopause) or one month (late menopause) after oophorectomy. One month after ovary reimplantation, the graft take was evaluated macroscopically and histologically.

Results: Six of the animals were used as controls and seven died. The histological findings of 20 animals included atretic follicles (n=4), primordial follicles (n=2), and corpus luteum with primordial follicles (n=3). No ovarian tissue was found in 11 animals. Vitrification resulted in a higher graft take rate than slow freezing (50% vs. 38.5%), but the difference was not statistically significant. However, the graft take rate was 9.3 times higher in the early than in the late postmenopausal stage (61.5% vs. 14.3%) ($p=0.043$).

Conclusion: Vitrification was superior to slow freezing as ovarian cryopreservation technique, and grafting was significantly more successful when the ovary was reimplanted in the late postmenopausal stage.

Key words: Cryopreservation. Vitrification. Rats. Ovariectomy.

Resumo

Objetivo: Comparar duas técnicas de criopreservação ovariana em ratos (vitrificação e congelamento lento) em dois estágios da pós-menopausa (precoce e tardia), considerando a pega do enxerto.

Métodos: Trinta e três ratos Wistar foram submetidos à ooforectomia bilateral. Um ovário foi submetido à análise histológica e outro criopreservado (congelamento lento ou vitrificação). O ovário criopreservado foi descongelado e reimplantado uma semana (menopausa precoce) ou um mês (menopausa tardia) após ooforectomia. Um mês após o reimplante de ovário, a pega do enxerto foi avaliada macroscopicamente e histologicamente.

Resultados: Seis dos animais foram considerados controles e sete morreram. Os achados histológicos dos 20 restantes incluíram folículos atrésicos (n = 4), folículos primordiais (n = 2), CL com folículos primordiais (n = 3). Nenhum tecido ovariano foi encontrado em 11 animais.

A vitrificação resultou em maior taxa de pega do enxerto do que o congelamento lento (50% vs 38,5%), mas não estatisticamente significativa. No entanto, a taxa de pega do enxerto foi de 9,3 vezes maior no Grupo B (61,5%) do que no Grupo A (14,3%) ($p = 0,043$).

Conclusões: A vitrificação foi superior ao congelamento lento como técnica de criopreservação ovariana, e a pega do enxerto foi mais bem sucedida quando o ovário foi reimplantado na pós-menopausa tardia.

Descritores: Criopreservação. Vitrificação. Ratos. Ovariectomia.

Introduction

With the advent of new therapies against chronic degenerative diseases, especially neoplasia, the life expectancy of many young patients has been extended. Ovarian function may be lost prematurely as a result of treatment for neoplasia (depending on the age of patient), the chemotherapy regimen and the irradiation levels used. In addition, even though ovulation resumes after oncological treatment, fertility may have been compromised.

For such patients, the maintenance of ovarian function is often a priority, with direct implications on future quality of life.¹ Thus, many women seek medical care in an attempt to postpone the menopause and its complications and maintain ovarian function as long as possible.

The menopause can be a very distressing and debilitating period, with a range of accompanying manifestations, including vasomotor symptoms, insomnia, headache, genitourinary disorders, fluctuations in libido, bone-joint changes and osteoporosis.²

In a recently published review, chances of spontaneous gestation were estimated at 28% and 5% for women under 20 and over 25 years of age, respectively, following treatment for cancer with radiotherapy and chemotherapy.³

Cryopreservation is an experimental fertility preservation technique involving the surgical removal and cryopreservation of the ovaries of mostly young women prior to chemotherapy in order to avoid exposure to systemic gonadotoxic compounds. Following treatment, provided the patient is believed to be disease-free, the ovaries may be reimplanted. Though still in the

experimental stage, cryopreservation is considered a promising alternative for the recovery of fertility.⁴⁻⁵

The recovery of ovarian function by way of reimplantation of cryopreserved tissue has been successfully accomplished in both animals and humans. However, due to the small number of patients submitted to this procedure so far, the technique has not been fully standardized.⁶⁻⁷ Several animal models have been designed to evaluate compounds capable of improving the techniques and outcomes of cryopreservation. Over time, a number of different compounds have been used in the cryopreservation of reproductive cells. Thus, several studies were conducted in the 1990s evaluating the cryoprotective efficiency of DMSO, ethylene glycol, propylene glycol and even glycerol (used since 1949).⁷

Initially, most research was focused on the cryopreservation of spermatozoa. Already in 1951, the first calf was born using frozen bull sperm. The new techniques facilitated selection and reproduction of domestic animals. Eventually, cryopreservation techniques were adapted for use in human organs, at first for oocytes and follicles, then for ovaries and embryos.⁸⁻⁹ In 1954, for the first time, a child was born as the result of insemination with semen stored for six weeks in dry ice. Ten years later, in 1964, a child was born which had been conceived with semen stored in liquid nitrogen for five months. More recently, with the advent in 2004 of proper cryopreservation techniques, a child was engendered using semen frozen for 21 years, making the duration of the seminal phase of human life practically unlimited.¹⁰⁻¹¹

The evolution of techniques of cryopreservation of female germ cells has been remarkable. The first studies on ovarian tissue cryopreservation were performed in rodents more than half a century ago, and results have been very encouraging since. Current achievements include the maintenance of the morphology and viability of the ovarian follicle structure and the restoration of endocrine function after cryopreservation and transplantation of ovarian tissue.

After orthotopic transplantation of previously frozen and thawed whole ovary, Parrott¹² described the first birth: a single offspring in mice. Using a similar protocol, other researchers obtained mouse pregnancy rates between 33% and 73% and 3-4 births per litter. Yet others reported promising results (23 births) after orthotopic transplantation of frozen/thawed half ovaries, demonstrating that ovarian tissue retrieved post-mortem was viable even after a period of storage at low temperatures.¹³

In 2004, Donnez and colleagues published an important study on human reproductive medicine particularly relevant to young women facing the prospect of gonadotoxic treatment. One of their patients experienced restoration of her endocrine and gametogenic functions and conceived 11 months after orthotopic autotransplantation of ovarian fragments.⁶

The study showed that women treated for and cured of cancer can bear healthy children without the use of assisted reproduction techniques such as *in vitro* fertilization.^{4,7} More recently, other researchers demonstrated that it is possible to maintain endocrine and gametogenic activity in the graft for an extended period. One of their patients was submitted to ovarian tissue transplantation after treatment for cancer.¹⁴

The overall purpose of cryopreservation is graft integrity through the maintenance of the anatomical and functional viability of cell structures. The success of cryopreservation depends on a range of technical factors: freeze-storage time and temperature, type and amount of cryoprotectors used, the osmolar concentration of the medium, and changes in cell volume, structure and function, especially related to plasma membrane permeability and fluidity and its implications for cell metabolism. The main complication is cryoinjury which involves one or more successive or independent events: formation of intracellular and extracellular ice crystals, chemical toxicity of cryoprotectors, osmotic shock and fracture damage.¹⁵

Proper training in the techniques of cryopreservation and autotransplantation in animals is indispensable for surgeons who wish to offer this treatment option for patients in whom ovarian function may be compromised by radio and chemotherapy.

Methods

The experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Ceará and filed under entry number 79/2012.

The study used thirty-three 3-month-old female Wistar rats (*Rattus Novergicus*) weighing approximately 200g. The animals were housed in individual cages in a controlled environment (circadian cycle, $22 \pm 2^\circ\text{C}$, constant humidity, food and water *ad libitum*).

Ovarian tissue

Following excision, the ovaries (~2 mm³) were dissected free of fat and mesentery. One of the ovaries was submitted to histological analysis; the other was cryopreserved.

Design of the experiment

Stage I: Thirty-three Wistar rats were submitted to bilateral oophorectomy. One ovary was immediately submitted to histological analysis, while the other was cryopreserved by slow freezing (n=10) or vitrification (n=23).^{7, 16} Two animals from the slow freezing group and five animals from the vitrification group died. The controls included six animals from the vitrification group and two from the slow-freezing group. The latter two animals provided sufficient material for control and experimental procedures.

Stage II: The cryopreserved ovary was thawed and reimplanted in the greater omentum one week after oophorectomy (early menopause) (Group A, n=7; 3 vitrified and 4 slow-frozen) or one month after oophorectomy (late menopause) (Group B, n=13; 9 vitrified and 4 slow-frozen).

Stage III: One month after ovary reimplantation, the animals were euthanized, the graft was excised and graft take was evaluated.

Vitrification and warming procedures

Whole ovaries were initially equilibrated in HEPES containing 10% v/v ethylene glycol and 10% v/v DMSO for 20 min at room temperature and then immersed for 3 min in a vitrification solution containing 17% v/v ethylene glycol, 17% v/v DMSO and 0.75 M sucrose in HEPES. The ovaries were then transferred individually with minimal vitrification solution to the surface of a metal cube floating in liquid nitrogen. The vitrified ovaries were kept in liquid nitrogen (-196°C) for 30-60 min. Using cooled forceps, the samples were placed in cooled cryovials containing liquid nitrogen, according to a protocol adapted from Wang *et al.*¹⁶ Prior to reimplantation, the vials containing the samples were removed from liquid nitrogen storage and exposed to room temperature for one minute. Then each sample was submitted to three 5-min baths in a solution containing minimal essential medium + 10% fetal calf serum and decreasing concentrations of sucrose (0.5, 0.25 and 0.0 M), using a protocol adapted from Lunardi *et al.*⁷

Slow Freezing

The procedure was carried out according to the protocol described by Gosden and colleagues.¹⁷ Ovarian strips were placed in 2-mL cryovials filled with a cryoprotective solution containing modified phosphate-buffered saline (DPBS) medium, 1.5 mmol/L DMSO and 20% human serum albumin (HSA). Using a programmable freezer (Custom BioGenic Systems Model 2100 Controlled Rate Freezing System), the cryovials were i) cooled from 0°C to -8°C at -2°C/min; ii) cooled to -40°C at -0.3°C/min; (iii) cooled to -150°C at -30°C/min, and (iv) immediately transferred to liquid nitrogen for storage at -196°C.

To thaw the ovarian cortical tissue, the cryovials were removed from the dewar and kept at room temperature for 2 min, followed by immersion in a water bath at 37°C for 2 min under gentle shaking. The contents of the cryovials were quickly emptied into culture dishes with Leibovitz L-15 medium and washed 3 times with fresh medium to remove residual cryoprotector before further processing.

Histology

Samples of the ovaries were submitted to histological analysis at three different moments: i) upon oophorectomy, when the ovaries were presumed to have a normal production of follicles, ii) upon thawing, in order to compare the outcome of the two freezing techniques (slow freezing and vitrification), and iii) upon euthanasia, in order to evaluate graft take one month after ovary reimplantation in both early (one week) and late (one month) postmenopausal rats.¹⁸

Statistical analysis

The study variables were dichotomous (presence/absence). Using the software GraphPad Prism 5.0, findings were submitted to Fisher's exact test and expressed as absolute frequencies and percentages. The level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Slow freezing

Two of the 10 rats which received an ovarian graft cryopreserved by slow freezing died (mortality: 20%). The graft was evaluated for viability prior to reimplantation in two (25%) of the eight surviving animals. In one of these (50%), primordial follicles and corpus luteum were observed, matching findings in the literature (42%). Upon euthanasia, no ovarian graft was found in 5 (62.5%) animals. In the remaining 3 animals (38.5%), the graft had taken. One of these (12.8%) presented atretic follicles while 2 (25.6%) presented primordial follicles and corpus luteum (Table 1). All three animals with successful grafting belonged to Group B (late postmenopausal stage).

Table 1: Histological findings following reimplantation of ovarian tissue in 20 female Wistar rats

Criopreservação Ovariana e Reimplante					
Animal	Estágio Pós-Menopausa		Achados Histológicos após o Reimplante	Técnica de Criopreservação	
	Precoce	Tardia		Vitrificação	Congelamento Lento
1		X	FP + CL	X	
2		X	FA	X	
3	X		FA + FP	X	
4		X	FA	X	
5		X	Ø TO	X	
6		X	FA	X	
7	X		Ø TO	X	
8	X		Ø TO	X	
9		X	Ø TO	X	
10		X	Ø TO	X	
11		X	FA + FP	X	
12		X	Ø TO	X	
13	X		Ø TO		X
14	X		Ø TO		X
15	X		Ø TO		X
16		X	FA		X
17		X	Ø TO		X
18	X		Ø TO		X
19		X	FP + CL		X
20		X	FP + CL		X

Legenda:	FP = Folículo Primordial	FA = Folículo Atrésico
	CL = Corpo Lúteo	Ø TO = Ausência de Tecido Ovariano

Vitrification

Five of the 23 rats which received an ovarian graft cryopreserved by vitrification died (mortality: 15.1%). Six randomly selected grafts evaluated for viability (but not implanted) presented primordial follicles and corpus luteum (5/6; 83.3%) and atretic and primordial follicles (1/6; 16.7%). The remaining 12 grafts were implanted. Upon euthanasia, no ovarian graft was found in 6 (50%) animals, just inflammatory/scar tissue and/or fibrosis. In the other 6 animals (50%), the graft had taken (Figure 1).



Figure 1: Abdominal cavity of female Wistar rat after laparotomy showing ovary (arrow) reimplanted in the omentum. The color of the tissue and the absence of macroscopic evidence of necrosis are suggestive of good graft take.

Three of these (25%) presented atretic follicles, 2 (16.7%) presented both atretic and primordial follicles, and 1 (8.3%) presented primordial follicles and corpus luteum (Figure2) (Figure 3).

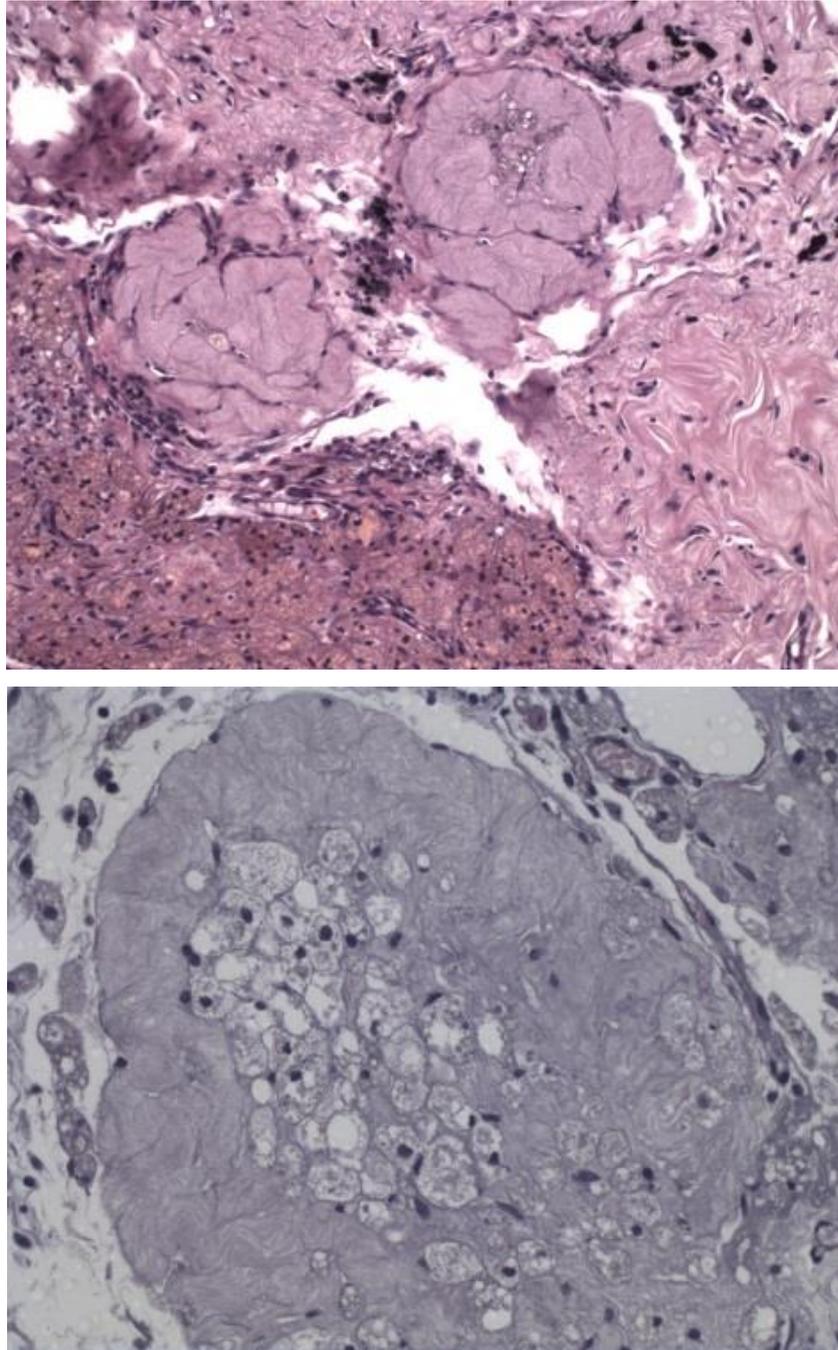


Figure 2: Atretic follicles after reimplantation.

Magnification: 200x and 400x. Hematoxylin and Eosin.

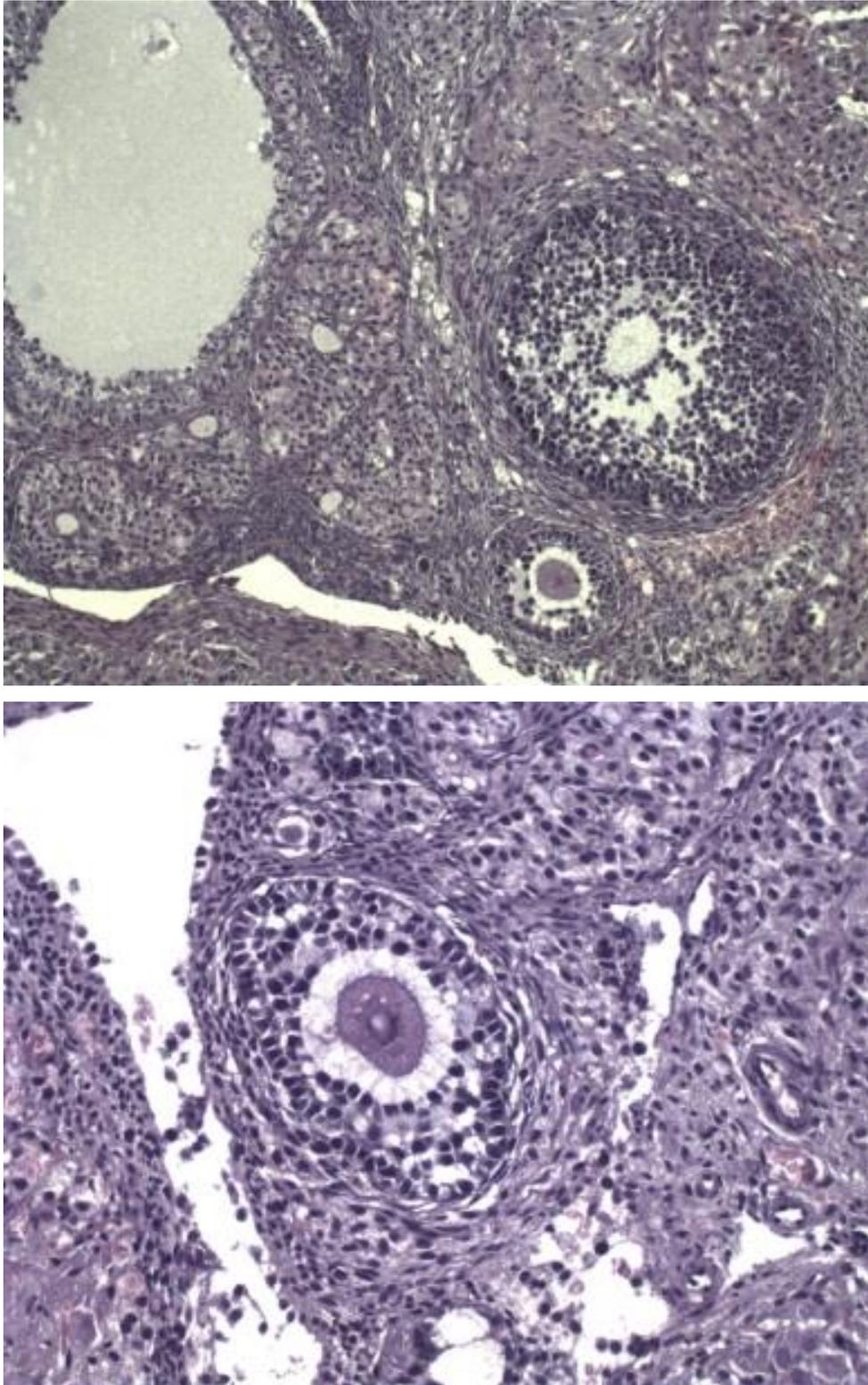


Figure 3: Primordial follicles and corpus luteum after reimplantation.

Magnification: 200x and 400x. Hematoxylin and Eosin.

Most (5/6) of the animals with successful grafting belonged to Group B (late postmenopausal stage) (Group B=83.3% vs. Group A=16.7%), but the difference between the groups with regard to take rate was not statistically significant ($p=0.080$).

Slow freezing vs. vitrification

Upon thawing, the ovarian tissue was preserved in 50% of slow-frozen specimens versus 100% of vitrified specimens; however, the difference was not statistically significant ($p=0.400$). Vitrification resulted in a higher graft take rate than slow freezing (50% vs. 37.5%), but the difference was not statistically significant ($p=0.400$).

Postmenopausal stage

Six of the seven deaths mentioned in the section describing the design of the study involved animals in the early postmenopausal stage (Group A). The high mortality in this group (6/13; 46%) when compared to that of Group B (1/13; 7%) may be explained by surgical stress, considering the short period elapsed (1 week) between oophorectomy and reimplantation. Thus, mortality was not related to the cryopreservation technique employed but to the timing of the two surgical interventions.

Of the 20 animals in the final sample, 7 belonged to Group A (early postmenopause) and 13 belonged to Group B (late menopause). In the latter group, 9 ovaries were vitrified, followed by 5 (55.5%) successful reimplantations, while 4 ovaries were slow-frozen, followed by only one successful reimplantation (25%). Nevertheless, the difference between the techniques did not reach statistical significance ($p=0.559$). In Group A, 3 ovaries were vitrified, followed by 1 (33.3%) successful reimplantation, while 4 ovaries were slow-frozen, with no successful reimplantation (0%). Again, the difference was not significant ($p=0.429$). However, when the two postmenopausal stages (early vs. late) were compared with regard to graft take, a statistically significant difference emerged: the graft take rate was 9.3 times higher in late postmenopausal rats (61.5%) than in early postmenopausal rats (14.3%) ($p=0.043$).

Discussion

Despite being a promising technique, ovarian tissue cryopreservation has only resulted in about 20 human live births so far. Much research is needed to improve success rates for both slow-frozen and vitrified tissue and to ensure the health of children born from such treatments. In one study, for example, 27 patients received similar treatments, eight had evidence of antral follicle growth and oocytes were retrieved, but only one gave birth.¹⁹

In the current study, we used a rat model to compare two cryopreservation techniques (slow freezing vs. vitrification) and to evaluate the influence of postmenopausal status (early vs. late) on graft take. Our findings raise questions about the ideal moment of ovary reimplantation in relation to hormonal metabolism. In other words, the time of absence of ovarian function appears to determine how the organism reacts to reimplantation.

Vitrification resulted in a higher graft take rate than slow freezing (50% vs. 38.5%) and follicles were present in all specimens. The success rate of slow freezing was similar to the rates reported in the literature: *in vitro* studies suggest that vitrification of ovarian tissue may be an improvement over the 70% oocyte viability loss from slow freezing.⁷

During the 2009 World Congress on Fertility Preservation in Belgium, a list was given of the advantages and disadvantages of vitrification as applied to human ovary cryopreservation. The advantages included i) excellent survival of ovarian stroma and blood vessels, ii) the technique is quick to perform, iii) no sophisticated equipment is needed, iv) the technique is clinically feasible, and v) excellent survival in tissue culture. On the other hand, the disadvantages included i) no live births reported until 2009, ii) the technique requires a considerable level of training, iii) the technique is very sensitive to concentrations, osmolarities and swiftness of procedure, and iv) ovarian tissues may be damaged by toxicity if the surgeon is not properly trained. However, recent studies describing human births following ovarian cryopreservation and reimplantation, along with the findings of the current study, indicate that the technique has been mastered despite its complexity.

The subject of rat postmenopausal status has been little discussed in the literature. In our experiment, a significant difference was observed between early and late postmenopausal rats (Groups A and B) with regard to graft take rates. This finding may be interpreted in light of two important studies, one by López-Grueso and coworkers²⁰ and one by Ahmed and colleagues.¹⁸

The first study looked at oxidative stress and estrogen replacement therapy (ERT) at different stages of the menopause (early vs. late). Early, but not late, onset of ERT was found to prevent an ovariectomy-associated increase in mitochondrial hydrogen peroxide levels, oxidative damage to lipids and proteins, and a decrease in glutathione peroxidase and catalase activity in rats. The authors concluded that, possibly, the ER α/β ratio is increased by ovariectomy and

reduced by immediate estrogen replacement. On positron emission tomography, the former decreased brain glucose uptake *in vivo* while the latter was beneficial when administered immediately after deprivation. Ovariectomy decreases GLUT-1 and 3 glucose transporters in the brain, and only early onset estrogen administration prevents it. Plasma from rats treated with estrogen immediately after ovariectomy show similar metabolomics profiles as controls. The authors provided a molecular basis for the recommendation of early onset ERT and explained its lack of effectiveness if a significant time period elapses after ovariectomy and probably after the onset of menopause.²⁰ The finding of a better physiological response to ERT during early, rather than late, menopause contradicts the findings of the present study.

The second study, which evaluated mammary gland response to ERT in rodents, found the treatment to be more effective in late postmenopausal animals. The authors examined the effects of ERT on mammary gland morphology, cell proliferation and progesterone receptor regulation in early postmenopause (1 week post-ovariectomy) and late postmenopause (5 weeks post-ovariectomy). The study explored the effects of ERT on the early vs. late postmenopausal mammary gland and demonstrated that late ovariectomy-induced menopause was associated with improved proliferative response to estrogen, as shown morphologically by pronounced duct end hyperplasia.

This enhanced mitogenic response to estrogen was localized to the duct end epithelium (4-fold increase) and adjacent stromal cells (6.5-fold increase). Long-term estrogen treatment produced a lower steady-state proliferative response. However, both epithelial and stromal cell proliferations were 2-fold higher when long-term estrogen treatment was started at 5 weeks post-ovariectomy vs. 1 week post-ovariectomy. In other words, an apparent permanent enhanced proliferative response to estrogen was observed in late postmenopausal animals. In contrast, no morphological response and minimal epithelial and stromal cell proliferation were observed after any length of estrogen treatment in early postmenopausal animals.¹⁸

Our results suggest that, despite claims of improved effects in relation to oxidative stress during early postmenopausal stages, ovarian graft take rates are higher in the late postmenopausal stage than in the early postmenopausal stage. This is supported by the enhanced mammary gland response to ERT observed in late postmenopausal rodents.

Vitrification was shown to be superior to slow freezing as ovarian cryopreservation technique,

and grafting was significantly more successful when the ovary was reimplanted in the late postmenopausal stage. These results may be helpful in future studies, especially when determining the ideal time of onset of ERT in women.

Conclusion

Both vitrification and slow freezing were feasible though the former yielded better results when the time of reimplantation was taken into account. Regardless of the time of cryopreservation, rat ovary reimplantation is more likely to be successful in the late postmenopausal stage.

References

1. Teinturier C, Hartmann O, Valteau-Couanet D, Benhamou E, Bougneres PF. Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: High-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:989-94.
2. Binkley N, Krueger D. Combination therapy for osteoporosis: considerations and controversy. *CurrOsteoporos Rep* 2005; 3:150-4.
3. Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med.* 2005; 353:64-73.
4. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace HW, Hagerty K, Beck LN, Brennan VL, Oktay K. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J ClinOncol* 2006; 24:2917-31.
5. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 342:1919.
6. Oktay K, Tilly J. Live birth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet* 2004; 364:2091-2.
7. Lunardi FO, Araújo VR, Faustino LR, Carvalho AA, Gonçalves RFB, Bass CS, BAO SN, OlaziaName KP, Campello CC, De Figueiredo JR, Ribeiro Rodrigues API. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep pré-antral follicles enclosed in ovarian tissue. *Small Rumin. Res.* 2012; 107:121-30
8. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79° C. 1952. *Nature* 169, 626-7.

9. Stewart DL. Storage of bull spermatozoa at low temperatures *Veterinary Record*.1951; 63: 65–6.
 10. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertil Steril*. 1954;5(6):520-9.
 11. Horne G, Atkinson AD, Pease EH, Logue JP, Brison DR, Lieberman BA. Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report. *Hum Reprod* 2004; 19:1448-9.
 12. Parrot DMY. The fertility of mice with orthopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fert* 1960; 1: 230-41.
 13. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop container less technique. *Fertil Steril*. 2001;76(3):618-20.
 14. Ernst E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CY. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. 2010. *Hum Reprod*, 25, 1280-1.
 15. Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Human Reproduction*.2002;17(7):1863-74.
 16. Wang XQ, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction*.2009;138:527-35.
 17. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at –196 degrees C. *Hum Reprod*. 1994; 9:597–603
 18. Raafat AM, Hofseth LJ, Li S, Bennett JM, Haslam SZ. A mouse model to study the effects of hormone replacement therapy on normal mammary gland during menopause: enhanced proliferative response to estrogen in late postmenopausal mice. *Endocrinology*.1999;140(6):2570-80.
 19. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110 (43):17474-9
 20. López-Grueso R, Gambini J, Mohamed K, Monleón D, Díaz A, Alami M, Bonet CB, Viña J. Early, but not late-onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(2):236-46.
-

Corresponding author: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro

Departamento de Cirurgia, Rua Prof. Costa Mendes 1608, 3º Andar, Bloco Didático da Faculdade de Medicina/UFC, Rodolfo Teófilo, 60.430-140, Fortaleza, Ceará, Brazil

Phone: +55 85 33 66 80 62 / Fax: +55 85 33 66 80 65 / E-mail: cirurgia@ufc.br

Conflicts of interest: None.

Financial support: No financial support

¹Research performed at the Experimental Animal Laboratory of the Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil. Part of PhD thesis, Postgraduate Program in Medical and Surgical Sciences, Federal University of Ceará (UFC). Tutor: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro.

APÊNCICE B – Pôster apresentado



The 1st International Congress on
**Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells,
 Tissue and Organs (CRYO)**
 Palacio de Congresos, Valencia, Spain, April 22-25, 2010

Study of Ovarian Function and Bone Density in Rats After Autotransplantation of Cryopreserved Ovarian

Authors: João Marcos de Meneses e Silva, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, Jose Alberto Dias Leite, Ligia Helena Ferreira Melo, Antonio Ribeiro da Silva Filho, Dalgimar Bezerra de Menezes, Sebastião Evangelista Torquato Filho, João Eduardo Pinheiro Neto, Rômulo Cesar Filho, Ana Caroline Pereira de Freitas, Sarah Musy Leitão, Roberta Vieira da Nóbrega.

University Federal of Ceara - UFC, Faculty Christus, Bios - Reproduction Clinic
 Fortaleza – Ceará – Brazil

Introduction: Menopause is a phenomenon that has major implications for women's health. One of its main is a decrease in BMD. This event is caused by the absence of female sex hormones, which have fallen sharply after menopause. We use the technique of cryopreservation for postponing ovarian function of women through the freezing of ovarian fragments when the woman is still at the stage of reproductive age and subsequent reimplantation of the tissue after menopause. We developed an animal model to study this proposal.

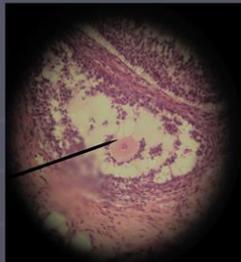
Objectives:

- To evaluate the influence of postmenopausal bone activity in rats by bilateral oophorectomy after autotransplant of cryopreserved ovaries.
- To compare the bone density in menopausal status and after self-implantation of ovaries.

Methods: We selected 25 female rats, weighing between 200 and 300 grams, without sexual contact and healthy. All underwent bilateral oophorectomy and had their ovaries frozen by slow freezing method. In one group the ovarian tissue was implanted after 1 week (early menopause in rat) and another was implantation after 1 month (late menopause). Study was conducted of ovarian function and serum estradiol and bone biopsies of the distal femur in three stages: the first before ovariectomy, to study the hormonal status and bone density before the procedure, the second before implantation to study the menopausal status in the animal and the third two weeks after implantation, to study the feasibility of hormonal production of ovarian tissue after freezing and implantation and its effect on bone situation. After the period of two weeks, euthanasia was performed and it was done the histological study of the pieces of ovarian tissue.



Picture I – Aspect of the implant after 15 days



Picture II – Histological analysis



Picture III – Bone biopsies (stages I, II and III)

Results: When considering all animals, the serum estradiol showed a 18% drop after oophorectomy and an increase of 18.6% after implantation. In analyzing the group of early menopause, the fall of serum estradiol was 23.1%, increasing 33.1% after implantation. When was analyzed the group of late menopause, the decrease of serum estradiol was 14.9%, increasing 17.1% after implantation. At the histological analysis, it was confirmed the presence of follicular as showed at the picture II. When analyzing the bone structure, it was noticed an increase in the number and activity of osteoblasts in all groups, comparing the biopsy slides after oophorectomy and after implantation. The difference, however, was more pronounced in the group of late menopause.

Conclusion: The cryopreservation by slow freezing method was able to preserve the ovarian tissue sufficient for stimulation of bone tissue after implantation



APÊNDICE C – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 79/2012, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA EM RATAS MENOPAUSADAS INDUZIDAS POR OOFORRECTOMIA APÓS AUTO IMPLANTE OVARIANO CRIOPRESERVADO”**, de responsabilidade de Luiz Gonzaga Porto Pinheiro e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBÉA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 07 de março de 2013

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC
MAT. SIAPE 2166389