

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

ANA PAULA CALDEIRA BRANT CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA APÓS ESTÍMULO
OVARIANO CONTROLADO, INICIADO EM QUALQUER
FASE DO CICLO MENSTRUAL, PARA CONGELAMENTO
DE OÓCITOS EM MULHERES COM CÂNCER**

**Belo Horizonte
2014**

C198a Campos, Ana Paula Caldeira Brant.
Avaliação da resposta ovariana após estímulo ovariano controlado, iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, para congelamento de oócitos em mulheres com câncer [manuscrito]. / Ana Paula Caldeira Brant Campos. - - Belo Horizonte: 2014.
94f.: il.
Orientador: Selmo Geber.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Preservação da Fertilidade. 2. Neoplasias. 3. Indução da Ovulação. 4. Recuperação de Oócitos. 5. Criopreservação. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Geber, Selmo. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. II. Título.

NLM: WQ 208

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

ANA PAULA CALDEIRA BRANT CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA APÓS ESTÍMULO
OVARIANO CONTROLADO, INICIADO EM QUALQUER
FASE DO CICLO MENSTRUAL, PARA CONGELAMENTO
DE OÓCITOS EM MULHERES COM CÂNCER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Reprodução Humana

Orientador: Prof. Dr. Selmo Geber

**Belo Horizonte
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Professor Jaime Arturo Ramírez

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Professor Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Professor Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Professora Sandhi Maria Barreto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

Coordenador

Professor Antônio Carlos Vieira Cabral

Vice-Coordenador

Professor Selmo Geber

ANA PAULA CALDEIRA BRANT CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA APÓS ESTÍMULO
OVARIANO CONTROLADO, INICIADO EM QUALQUER
FASE DO CICLO MENSTRUAL, PARA CONGELAMENTO
DE OÓCITOS EM MULHERES COM CÂNCER**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Banca Examinadora

Prof. Dr. Selmo Geber – Presidente da banca - UFMG

Prof. Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares - UFMG

Prof. Dr. José Helvécio Kalil de Souza - UFOP

Membro suplente:

Profa. Dra. Andrea Moura Rodrigues Maciel da Fonseca - UFMG

"Medicina é a arte da incerteza e a ciência da probabilidade."

Sir William Osler

Aos meus amados pais, especialmente minha mãe Lígia, que me ensinaram a doar e oferecer o amor, que sempre me apoiaram na luta pelos sonhos e nunca mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso para alcançá-los.

Ao Rodrigo, pelo amor, compreensão e paciência nos meus anos de estudo, nunca deixando de estar ao meu lado, me incentivando, comemorando comigo cada vitória e me ajudando a renovar os sonhos.

Ao Edson, pelo carinho, determinação e disposição em sempre me ajudar no que for preciso.

À minha madrinha Helena pelos ensinamentos ao longo de toda a minha vida e apoio incondicional.

Ao meu padrinho Caio pelo incentivo e exemplo de profissionalismo.

Resumo

Introdução: Com o aumento das taxas de sobrevivência de mulheres com câncer, aumentou também o seu desejo de constituir família. O principal fator limitador é o efeito deletério dos tratamentos oncológicos no sistema reprodutor feminino, podendo causar esgotamento folicular e infertilidade. Preservar a capacidade reprodutiva destas mulheres tornou-se fundamental e os recentes avanços nas técnicas de reprodução assistida permitiram a preservação da fertilidade, tendo no congelamento de oócitos uma das suas possibilidades. O principal desafio é estimular o ovário das pacientes com câncer em qualquer fase do ciclo menstrual (indução de urgência) com posterior captação de oócitos maduros, uma vez que o início do tratamento oncológico não pode ser postergado.

Objetivo: Avaliar os resultados da indução ovariana controlada com posterior captação de oócitos, em ciclos de estimulação ovariana iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, em mulheres com câncer, que não podem adiar o início do tratamento oncológico.

Metodologia: Um total de 11 pacientes com diagnóstico de câncer foi submetida à estimulação ovariana independente da fase do ciclo menstrual. As pacientes foram avaliadas de acordo com a fase do ciclo menstrual que se encontravam no início da indução ovariana controlada (Grupo I : Fase Lútea e Grupo II : Fase Folicular). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, para avaliação das variáveis de interesse entre os dois grupos estudados.

Resultados: As pacientes que iniciaram o tratamento na fase lútea (idade $30,3 \pm 2,6$) foram submetidas a estimulação por um período médio de $10,0 \pm 0,4$ dias, e as que iniciaram na fase folicular (idade $32,8 \pm 1,4$) por $10,6 \pm 2,1$ dias. A média da dose total de FSHr foi de $2.587 \text{ UI} \pm 152$ (grupo I) e 2.610 ± 160 (grupo II). A média de folículos aspirados, oócitos captados e oócitos metáfase II foi, respectivamente, no grupo I, de $19,2 \pm 4,0$; $18,5 \pm 4,5$ e $13,7 \pm 3,2$ e no grupo II foi respectivamente de $26,6 \pm 3,9$; $20,4 \pm 5,7$ e $10,0 \pm 3,4$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas nos dois grupos ($p > 0,05$).

Conclusão: A estimulação ovariana controlada, iniciada em qualquer fase do ciclo (indução de urgência), é uma alternativa viável, sem comprometer o número de oócitos capturados e sua maturidade.

Palavras-chave e termos: preservação da fertilidade feminina; câncer; indução da ovulação; técnicas de criopreservação e reprodução assistida

Agradecimentos

Às queridas amigas da Medicina, flores do meu jardim, pela amizade e por fazerem com que a minha vida seja sempre mais feliz.

Às queridas amigas de infância, pelos momentos vividos e pela companhia de sempre nas etapas mais importantes da minha vida.

Ao Dr. Selmo Geber, pela confiança, paciência em transmitir seu conhecimento, carinho, disposição e amizade. A condução da orientação fez com que eu o admirasse, ainda mais, tanto profissional como pessoalmente.

Ao Dr. Marco Aurélio Coelho Sampaio, pelos ensinamentos e acolhida.

À Renata Bossi, pelo incentivo, ajuda e amizade.

Aos colegas, amigos e funcionários da Clínica Origen, pela tolerância e cooperação.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo incentivo para a realização deste estudo.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiam no meu crescimento e compartilham comigo as vitórias alcançadas ao longo da minha caminhada.

A Deus, por me proporcionar uma vida tão maravilhosa e me dar força e saúde para continuar buscando sempre o melhor.

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-----------------------|---|
| AVC | Acidente Vascular Cerebral |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| CO₂ | Gás carbônico |
| COEP | Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| D | Direito |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DUM | Data da última menstruação |
| E | Esquerdo |
| E₂ | Estradiol |
| EBSS | <i>Earle's balanced salt solution</i> |
| FIV | Fertilização in vitro |
| FOP | Falência Ovariana Prematura |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| GnRH | Hormônio Liberador de Gonadotrofina |
| Gy | Gray |
| HAS | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| hCG | Hormônio da gonadotrofina coriônica humana |
| HF | História Familiar |
| HGO | História Ginecológica e Obstétrica |
| hMG | gonadotrofina menopausal humana |
| HP | História Progressa |
| IARC | Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>) |
| ICSI | Injeção intracitoplasmática de espermatozóides |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| Kg | Quilograma |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| MI | Metáfase I |
| MII | Metáfase II |
| Min | Minutos |

| | |
|-------------|--|
| mmHg | Milímetros de mercúrio |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PA | Pressão Arterial |
| QT | Quimioterapia |
| rFSH | Hormônio Folículo Estimulante recombinante |
| rhCG | Hormônio da gonadotrofina coriônica recombinante |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT | Radioterapia |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UI | Unidade Internacional |
| VG | Vesícula germinal |

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumo | xi |
| Agradecimentos..... | xiii |
| Lista de Abreviaturas e Siglas | xv |
| Índice | xvii |
| Índice de Figuras | xix |
| Índice de Tabelas | xx |
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. Revisão da Literatura | 25 |
| 2.1 Incidência de Câncer no mundo e no Brasil | 25 |
| 2.2 Incidência dos tumores mais frequentes na mulher | 26 |
| 2.3 Incidência do câncer infanto-juvenil | 28 |
| 2.4 Efeitos dos tratamentos de câncer sobre a função ovariana | 30 |
| 2.5 Opções para a preservação da fertilidade feminina | 35 |
| 2.6 “Indução de Urgência” | 38 |
| 3. OBJETIVO | 47 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 4.1 Desenho do estudo | 49 |
| 4.2 Grupo de Estudo | 49 |
| 4.2.1 Critérios de Inclusão | 50 |
| 4.2.2 Critérios de Exclusão..... | 50 |
| 4.2.3 Características da amostra | 50 |
| 4.3 Protocolo de Estimulação, aspiração folicular e Vitriificação | 51 |
| 4.4 Análise estatística | 55 |
| 5. RESULTADOS | 57 |
| 6. DISCUSSÃO | 61 |
| 7. CONCLUSÃO | 73 |
| REFERÊNCIAS | 75 |
| ANEXOS..... | 79 |
| Anexo 1: Parecer de aprovação do CONEP..... | 81 |
| Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 91 |
| Anexo 3: Folha de Aprovação..... | 94 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Placa de cultivo dos oócitos imaturos. | 53 |
| Figura 2: Oócito antes da denudação. | 53 |
| Figura 3: Vesícula Germinal. | 54 |
| Figura 4: Oócito em metáfase I. | 54 |
| Figura 5: Oócito em metáfase II. | 54 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Características das pacientes com câncer submetidas à estimulação ovariana controlada iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual..... | 51 |
| Tabela 2: Características das pacientes com câncer submetidas ao estímulo ovariano controlado iniciado nas diferentes fases do ciclo menstrual..... | 57 |
| Tabela 3: Resultados da estimulação ovariana controlada iniciada na fase lútea em pacientes com câncer | 58 |
| Tabela 4: Resultados da estimulação ovariana controlada iniciada na fase folicular em pacientes com câncer | 58 |
| Tabela 5: Análise descritiva e comparativa entre os grupos I e II em relação às variáveis de interesse | 59 |

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços obtidos no tratamento dos diversos tipos de câncer, a taxa de sobrevivência de mulheres jovens, em idade reprodutiva, e com desejo de gravidez aumentou significativamente nos últimos anos (FORMAN, ANDERS E BEHERA, 2010; QUINTERO *ET AL.*, 2010; MAMAN *ET AL.*, 2011; NAYAK E WAKIM, 2011; DOMINGO *ET AL.*, 2012; FRIEDLER *ET AL.*, 2012; ÇAKMAK E ROSEN, 2013; COURBIERE *ET AL.*, 2013; GUNASHEELA E GUNASHEELA, 2014). Dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos demonstraram que no período de 2002 a 2012, 83% das mulheres com menos de 45 anos diagnosticadas com câncer sobreviveram (ÇAKMAK E ROSEN, 2013). De 2004 a 2008, as taxas de mortalidade por câncer nas mulheres vêm caindo mais de 1,6% ao ano (BEDOSCHI E OKTAY, 2013). A partir desse aumento de sobreviventes, as mulheres, que não tem filhos e que não tem parceiro definitivo, começaram a buscar alternativas para a preservação de sua capacidade reprodutiva e, com isso, planejar uma futura gestação. De fato, existe um grande desejo, entre as sobreviventes do câncer, de terem seus próprios filhos biológicos (CHUNG *ET AL.*, 2013) e cerca de 70% das pacientes, em idade reprodutiva, desejam ter filhos após o fim da terapia oncológica (VON WOLFF *ET AL.*, 2009).

O principal problema do tratamento oncológico em mulheres jovens, consiste em envolver a cirurgia e/ou tratamentos citotóxicos (quimioterapia e radioterapia), que podem, parcial ou definitivamente afetar a função reprodutiva (MEIROW E NUGENT, 2001; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; FORMAN, ANDERS E BEHERA, 2010; QUINTERO *ET AL.*, 2010; MAMAN *ET AL.*, 2011; NAYAK E WAKIM, 2011; DOMINGO *ET AL.*, 2012; FRIEDLER *ET AL.*, 2012; WUNDER *ET AL.*, 2012; BEDOSCHI E OKTAY, 2013; ÇAKMAK E ROSEN, 2013; GUNASHEELA E GUNASHEELA, 2014; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014). A toxicidade dos agentes quimioterápicos é conhecida há mais de 30 anos (BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008) e diversos estudos têm demonstrado os efeitos adversos da quimioterapia

sobre as gônadas femininas (BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; ÇAKMAK E ROSEN, 2013; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014).

O grau de dano nas gônadas é muito variável entre os estudos, já que a probabilidade de falência ovariana prematura (FOP) depende de vários fatores como o tipo de agentes quimioterápicos, quantidade de irradiação, a dose acumulada, a duração do tratamento e a idade da paciente, que parece ser o fator mais importante (FALCONE *ET AL.*, 2004; MARHHOM E COHEN, 2007; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; DIEDRICH *ET AL.*, 2011; ÇAKMAK E ROSEN, 2013; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014).

A FOP coloca as pacientes não somente expostas às complicações de uma privação hormonal precoce como também a perda da fertilidade (KIM, 2006; SKLAR *ET AL.*, 2006; MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; ANDERSON E WALLACE, 2011; DIEDRICH *ET AL.*, 2011).

Em 2006, Sklar et al. estudaram 2.819 mulheres sobreviventes de tumores infantis e as compararam com 1.065 de suas irmãs, em relação à ocorrência de menopausa prematura. Os autores concluíram que a incidência cumulativa de menopausa prematura não-cirúrgica foi de 8% em sobreviventes de câncer e de 0,8% nas mulheres do grupo-controle, o que representa risco relativo da ordem de 13,21 de um grupo em relação ao outro (SKLAR *ET AL.*, 2006). Mesmo aquelas pacientes que não se tornarão inférteis após altas doses de quimioterapia/radioterapia, estarão sujeitas a complicações durante a gestação, tais como abortos de repetição, prematuridade e baixo peso ao nascer (MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008).

As opções existentes para preservação da fertilidade feminina variam desde técnicas clinicamente estabelecidas até técnicas experimentais. Dentre as opções hoje disponíveis podemos citar a criopreservação de embriões, ou de oócitos, para futura fertilização in vitro;

o congelamento de tecido ovariano ou de todo o ovário para futura reimplantação; a transposição ovariana antes da radioterapia e a proteção farmacológica.

As técnicas que apresentam resultados clinicamente aceitáveis para as mulheres são a criopreservação de embriões e de oócitos. Para ambas, é necessária a hiperestimulação ovariana com gonadotrofinas, através de protocolos estabelecidos. O protocolo de estimulação mais utilizado é o protocolo longo, iniciado com a aplicação de análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) na fase folicular precoce ou fase lútea tardia. Somente após 10 dias da sua aplicação é possível confirmar o bloqueio da função hipofisária e então iniciar a indução da superovulação com gonadotrofinas por aproximadamente 12 dias. A outra alternativa utilizada, é o protocolo curto com antagonistas do GnRH. Nesse, inicia-se a indução da superovulação com as gonadotrofinas no 2º dia do ciclo menstrual e associa-se o uso dos antagonistas quando os folículos atingem o diâmetro médio de 14mm.

Assim, podem ser necessárias de 2 a 5 semanas para a estimulação e captação dos oócitos, dependendo da fase do ciclo menstrual que a mulher se encontra. No entanto, o tempo para o início do tratamento com cirurgia, quimioterapia e / ou radioterapia é limitado, e o prazo para a estimulação ovariana convencional é inaceitável para muitas pacientes com câncer (KIM, 2006; SKLAR *ET AL.*, 2006; DEMIRTAS *ET AL.*, 2008; VON WOLFF *ET AL.*, 2009; MAMAN *ET AL.*, 2011; ÇAKMAK *ET AL.*, 2013).

Surge, neste cenário, a promissora possibilidade da indução da ovulação iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual, isto é, indução de urgência, para captação de oócitos em pacientes que não podem retardar o início de seu tratamento para o câncer, mantendo assim reais chances de preservação da fertilidade.

Os avanços recentes no campo da preservação da fertilidade feminina, através do surgimento de novas técnicas e aprimoramento daquelas já existentes, tornam possível, cada vez mais, a realização do desejo de mulheres sobreviventes do câncer, de constituírem família e ter filhos. Somado a isso, segundo dados do Centro de Prevenção e Controle das Doenças, a

média de idade para gerar o primeiro filho aumentou de 21,4 anos em 1970 para 25 anos em 2001 (CAKMAK E ROSEN, 2013; CDC, 2014). As mulheres, nos Estados Unidos, estão cada dia mais postergando a maternidade, por motivos sociais e/ou financeiros. Muitas mulheres, na terceira e quarta década de vida, estão engravidando pela primeira vez, ou seja, com idade mais avançada do que antigamente. Como a incidência da maioria dos cânceres aumenta com a idade e a maioria das mulheres desejam engravidar com seus próprios óvulos, o atraso na maternidade resulta em um aumento do número de mulheres sobreviventes do câncer, interessadas na preservação de sua fertilidade (FORMAN, ANDERS E BEHERA, 2010; CAKMAK E ROSEN, 2013).

2. Revisão da Literatura

2.1 Incidência de Câncer no mundo e no Brasil

O câncer afeta milhões de pessoas a cada ano, gerando um grande impacto global, conforme relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*). O contínuo crescimento e envelhecimento populacional, somados aos avanços no tratamento dos diversos tipos de cânceres, afetarão de forma significativa a saúde mundial. Segundo estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer e 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 incidência do câncer continuará crescendo nos países desenvolvidos e em desenvolvimento caso não sejam tomadas atitudes no campo da prevenção (INCA, 2014).

Em 2030, projeções mundiais reportam que serão, aproximadamente, 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, devido ao crescimento e aumento de expectativa de vida da população (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014/2015 relata a ocorrência de aproximadamente 576.000 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 (182.000 casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69.000), mama feminina (57.000), cólon e reto (33.000), pulmão (27.000), estômago (20.000) e colo do útero (15.000) (INCA, 2014).

Excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se para 2014 no Brasil, 395.000 casos novos de câncer, 204.000 para o sexo masculino e 190.000 para sexo feminino. É inegável que devemos considerar que o câncer, no Brasil, é uma importante questão a ser abordada na saúde pública, com incentivos prioritários a programas de controle e prevenção (INCA, 2014).

2.2 Incidência dos tumores mais frequentes na mulher

Nos países desenvolvidos, os cânceres mais frequentes nas mulheres são o câncer de mama, o câncer de cólon e reto e o câncer de pulmão. Já nos países em desenvolvimento, os cânceres mais comuns são os de mama, colo de útero e pulmão, respectivamente. No Brasil, dos 190.000 cânceres previstos para as mulheres em 2014, os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide serão os mais comuns, excluindo-se o de pele não melanoma (INCA, 2014).

O câncer de mama sempre foi muito temido pelas mulheres e autoridades da saúde, já que é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Anualmente, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Para o Brasil, em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100.000 mulheres. Nos últimos 40 anos, a sobrevivência 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 (INCA, 2014).

Nos Estados Unidos, o câncer atinge 113 mulheres a cada 100.000 mulheres por ano, abaixo de 50 anos, sendo que o câncer de mama é o mais comum na idade reprodutiva (15% dos casos ocorrem em mulheres com menos de 40 anos) (GEORGESCU *ET AL.*, 2008; KIM, KLEMP E FABIAN, 2011).

Em relação ao câncer de colo uterino no Brasil, são esperados 15.590 casos novos com um risco estimado de 15,33 casos a cada 100.000 mulheres para o ano de 2014. Segundo as últimas estimativas mundiais para o ano de 2012, o câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com 527.000 casos novos. Sua incidência é maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos países mais desenvolvidos. Em geral, ele começa a partir de 30 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário entre 50 e 60 anos. Tais dados nos informam a importância de sua consequência sobre a fertilidade feminina. Ao mesmo tempo, com exceção do câncer de pele, é o câncer que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (INCA, 2014). Em relação ao câncer de cólon e reto, estimam-se, para 2014, no Brasil, 17.530 casos novos de câncer de cólon e reto em mulheres. Conforme a última estimativa mundial, o câncer de cólon e reto aparece como o segundo nas mulheres, com 614.000 casos novos para o ano de 2012. Mais de 50% dos casos ocorrem em países mais desenvolvidos. Essa doença maligna é considerada de bom prognóstico se for diagnosticada precocemente. Em cinco anos, a sobrevida média encontra-se em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% nos países em desenvolvimento (INCA, 2014).

O câncer de pulmão afetará cerca 10.930 novas mulheres no ano de 2014 no Brasil. O câncer de pulmão aumentou, rapidamente, a partir de meados do século XX, e essa neoplasia tornou-se a mais frequente na população mundial e a causa mais importante de morte por câncer no mundo, atualmente. A última estimativa mundial relatou uma incidência de 1,82 milhão de casos novos de câncer de pulmão para o ano de 2012, sendo 583.000 em mulheres. É geralmente detectado em estágios avançados, uma vez que pode ser assintomático por vários anos nos estágios iniciais. Sendo assim, o câncer de pulmão permanece como uma doença com altos índices de mortalidade (INCA, 2014).

O câncer de tireóide estará presente em cerca de 8.050 mulheres no Brasil em 2014. É patologia considerada rara na maioria das populações mundiais, correspondendo a 2% e 5% do total de câncer em mulheres. No mundo, estima-se a ocorrência de cerca de 300.000 casos novos dessa neoplasia, sendo 230.000 no sexo feminino (INCA, 2014).

O câncer do corpo do útero, com cerca de 319.000 casos novos por ano no mundo, é o sexto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. Sua incidência cresce com o aumento da expectativa de vida populacional (INCA, 2014).

O câncer de ovário é responsável por cerca de 5.680 casos novos de câncer no Brasil, no ano de 2014. Já mundialmente, estima-se que ocorreram 238.000 casos novos de câncer de ovário no ano de 2012 (INCA, 2014).

Em 2001, mais de 650.000 mulheres nos Estados Unidos foram diagnosticadas com algum tipo de câncer. Cerca de 8 % dessas mulheres tinham menos de 40 anos de idade (MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; PCASRM, 2008; DOMINGO *ET AL.*, 2012). Nas mulheres, o número de mortes para todos os cânceres combinados decresceu 0,6% de 1992 a 1999, embora tenha ocorrido um aumento na incidência de 0,3% entre 1987 e 1999 (MARHHOM E COHEN, 2007). Nos Estados Unidos, segundo a Sociedade Americana do Câncer, os casos estimados para as mulheres em 2014 serão 810.320 novos casos. Destes, os mais comuns serão câncer de mama (29%), pulmão (13%), cólon e reto (8%) e de corpo do útero (6%) (ACS, 2014). Além disso, com os atuais regimes de tratamentos contra o câncer, as taxas de cura de alguns tumores podem chegar a 90% (PCASRM, 2008; GUNASHEELA E GUNASHEELA, 2014). Segundo relatório apresentado pela Sociedade Americana do Câncer, a sobrevida em 5 anos (no período de 2003 a 2009) para câncer de Mama foi de 90% (ACS, 2014).

2.3 Incidência do câncer infantojuvenil

O câncer infantojuvenil (abaixo de 19 anos) corresponde entre 1% a 3% de todos os tumores malignos. Para o ano de 2014, devem surgir 394.450 casos novos de todos os cânceres, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, no Brasil. Sendo assim, ocorrerão cerca de 11.840 casos novos de câncer em crianças e adolescentes de 0 a 19 anos. Trata-se de um

número bastante expressivo, uma vez que o Brasil possui uma população jovem (aproximadamente 38% da população brasileira encontra-se abaixo dos 19 anos) (INCA, 2008; 2014). No ano de 2014, estima-se nos Estados Unidos, 15.780 novos casos de câncer entre crianças e jovens de 0 a 19 anos (ACS, 2014). Dentre os tipos de câncer infantojuvenil existentes, o mais comum na maioria das populações é a leucemia (cerca de 25% a 35%), seguido pelos linfomas e tumores do sistema nervoso central. Nos países em desenvolvimento, os linfomas são o segundo tipo mais comum, atrás apenas da leucemia, enquanto que nos países desenvolvidos são o terceiro tipo (INCA, 2014). Nos Estados Unidos, a leucemia é a mais prevalente dos casos de 0 a 14 anos, correspondendo a 26% e o linfoma Hodgkin é o mais prevalente na faixa etária de 15-19 anos, correspondendo a 15% dos casos (ACS, 2014).

Com o incrível progresso da terapêutica nas últimas décadas, a sobrevivência das crianças com doenças malignas melhorou sensivelmente nos últimos 30 anos. As taxas de sobrevivência relativa em cinco anos, para todos os tipos de câncer, passaram de 56% no período 1974-1976 para 77% em 1992-1998 ($p < 0,05$) (INCA, 2008). Em 1997, o Instituto Nacional do Câncer norte-americano estimou que seriam 270.000 as crianças sobreviventes de cânceres (uma a cada 1000 mulheres). Para 2010, temeu-se que uma a cada 250 pessoas adultas seria sobrevivente de tumores malignos infantis. Dentre os sobreviventes, muitas seriam mulheres que, possivelmente, experimentarão os problemas de infertilidade e aqueles decorrentes da privação hormonal ovariana (MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008).

As projeções de 2014 realizadas pela Sociedade Americana do Câncer, apontam que aproximadamente 1 em 285 crianças será diagnosticada com câncer abaixo de 20 anos e 1 em 530 jovens adultos entre 20-39 anos será um sobrevivente de câncer (ACS, 2014).

2.4 Efeitos dos tratamentos de câncer sobre a função ovariana

Atualmente, a cura do câncer deixou de ser o único objetivo a ser alcançado. Mais do que isso, as pacientes sobreviventes de neoplasias malignas buscam qualidade de vida e preservação da capacidade reprodutiva (LETOURNEAU *ET AL.*, 2012; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014). O potencial risco da perda da fertilidade é uma questão delicada e impactante para as mulheres jovens, podendo ser até mais problemático do que o próprio diagnóstico do câncer (LETOURNEAU *ET AL.*, 2012). Com a redução dos índices de mortalidade e crescimento das taxas de sobrevida, as consequências dos tratamentos em relação à capacidade reprodutiva tornaram-se fatores importantes que devem ser considerados (KIM, 2006).

Até o momento, não existem evidências claras que o câncer, excluindo-se os cânceres de ovário, colo uterino e corpo uterino, possa causar um efeito danoso direto ao sistema reprodutivo feminino. Entretanto, é sabido que os tratamentos utilizados para tentar combatê-lo podem causar diversos efeitos adversos (DIEDRICH *ET AL.*, 2011). O efeito do câncer sobre o sistema reprodutor feminino ainda é uma questão controversa, pois meta-análise, recentemente publicada, demonstrou que tanto a doença maligna como a condição multissistêmica da paciente podem ter influência na resposta ovariana após estimulação. O eixo hipotálamo-hipófise-ovário pode ser afetado pelo aumento do estado catabólico, má nutrição e aumento de hormônios pelo stress da presença do câncer e assim diminuir a fertilidade da paciente (FRIEDLER *ET AL.*, 2012).

Os tratamentos disponíveis para a maioria das neoplasias incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia isolados ou em combinação. Tais procedimentos podem afetar qualquer parte do sistema reprodutivo, sendo que a principal região afetada são os ovários e, conseqüentemente, suas funções, podendo causar falência ovariana prematura e infertilidade (MARHHOM E COHEN, 2007).

Nos cânceres de ovário, colo e corpo uterino ou endométrio, os tratamentos mais utilizados incluem a retirada cirúrgica do útero e ovários, eliminando a possibilidade de engravidar, dependendo do estadiamento ao diagnóstico, associados ou não a tratamentos quimio-radioterápicos (MARHHOM E COHEN, 2007).

Os efeitos adversos da quimio-radioterapia sobre a função gonadal foram descritos pela primeira vez há mais de 30 anos e, desde então, vários estudos surgiram para tentar avaliar e quantificar tais efeitos (BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008). Sabe-se hoje que o dano causado sobre as gônadas depende de vários fatores, tais como duração do tratamento, da dose, do tipo de tratamento, da droga utilizada e principalmente da idade da paciente (MEIROW E NUGENT, 2001; FALCONE *ET AL.*, 2004; MARHHOM E COHEN, 2007; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014). Alguns autores referem que mulheres mais velhas, por apresentarem uma reserva ovariana menor, estão sob maior risco de desenvolverem falência ovariana precoce após o tratamento (MEIROW E NUGENT, 2001; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; KIM, KLEMP E FABIAN, 2011; GUNASHEELA E GUNASHEELA, 2014). Tanto a quimioterapia, quanto a radioterapia, podem reduzir ou esgotar o número de folículos presentes no ovário e, sendo o número de folículos pré-definido, desde o nascimento, a destruição dos mesmos afetará a função endócrina e reprodutiva. Já foi sugerido que os tratamentos gonadotóxicos induziriam um ciclo vicioso de destruição folicular. A diminuição do número de folículos reduziria a secreção de estradiol e inibina, o que estimularia a secreção de FSH e assim maior recrutamento de outros folículos, que seriam posteriormente destruídos pelos subsequentes ciclos de quimio-radioterapia (DIEDRICH *ET AL.*, 2011).

A radiação ionizante é uma causa bem conhecida de dano ovariano. Segundo Wallace et al. (2003), a dose letal de radiação estimada para matar metade dos folículos primordiais nos ovários é de menos de 2Gy (WALLACE, THOMSON E KELSEY, 2003; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Outros estudos relatam que uma dose superior a 6Gy, diretamente no ovário, é suficiente para causar infertilidade permanente e irradiações na pelve de 5-10Gy já são tóxicas para os oócitos causando FOP em muitas mulheres (GEORGESCU *ET AL.*, 2008; CAKMAK E ROSEN,

2013; RONN E HOLZER, 2013). O dano ovariano é diretamente dependente da idade da paciente, da dose e do campo de irradiação da radioterapia. Mulheres abaixo de 40 anos são menos sensíveis ao dano induzido pela radiação. Uma dose de 20Gy é necessária para causar falência ovariana prematura nessas mulheres, ao passo que uma dose de apenas 6Gy pode causar o mesmo efeito em mulheres mais velhas (MARHHOM E COHEN, 2007). Levine et al. relataram um risco de amenorréia maior que 80% quando ocorre irradiação pélvica de 15Gy ou mais (em pré-púberes), 10Gy ou mais (em pós púberes) e 6Gy ou mais (adultas) (RONN E HOLZER, 2013).

O campo de irradiação também é um importante fator prognóstico, já que a radioterapia usada para tratar doenças malignas da pelve e do abdome atinge os ovários. O útero também é bem vulnerável à radiação, com relato de diminuição de 40% do seu volume (MARHHOM E COHEN, 2007). Alguns estudos demonstram que doses de radiação de 14-20Gy administradas em crianças e adolescentes afetam o crescimento e desenvolvimento uterino (CRITCHLEY E WALLACE, 2005; DIEDRICH *ET AL.*, 2011; RONN E HOLZER, 2013).

A poliquimioterapia constituiu a base do tratamento para diversos cânceres. Sabe-se que os quimioterápicos causam mutações, dano oxidativo nas células somáticas e germinativas e bloqueio na síntese de DNA, RNA e proteínas (FALCONE *ET AL.*, 2004; TAO E DEL VALLE, 2008; GUNASHEELA E GUNASHEELA, 2014). Os ovários possuem um número de folículos pré-determinados e insubstituíveis. As drogas quimioterápicas são citotóxicas e os ovários são extremamente sensíveis a elas, ocasionando um dano irreparável aos mesmos, com marcante perda folicular (FALCONE *ET AL.*, 2004; KIM, 2006; MARHHOM E COHEN, 2007; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; ANDERSON E WALLACE, 2011; DIEDRICH *ET AL.*, 2011; KIM, KLEMP E FABIAN, 2011). Enquanto em alguns tecidos que apresentam rápida divisão celular, como o trato gastrointestinal e a medula óssea, os efeitos de drogas citotóxicas podem ser reversíveis, não podemos dizer o mesmo para os ovários (FALCONE *ET AL.*, 2004). Os mecanismos exatos de injúria ovariana ainda não são completamente compreendidos. Postula-se que a quimioterapia afeta tanto a esteroidogênese das células da teca e da granulosa do ovário, como também os oócitos (FALCONE *ET AL.*,

2004; MARHHOM E COHEN, 2007; RONN E HOLZER, 2013). Além disso, os agentes quimioterápicos causam dano aos vasos sanguíneos ovarianos, prejudicando o crescimento folicular adequado. Outro mecanismo de injúria seria a formação de pontos focais de fibrose no córtex ovariano (BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; ANDERSON E WALLACE, 2011; RONN E HOLZER, 2013; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014).

Outras possibilidades descritas para o dano causado pelas drogas quimioterápicas seriam o aumento nas taxas de apoptose folicular e uma ativação precoce, com aumento do recrutamento e destruição dos folículos (RONN E HOLZER, 2013; RONESS, KALICH-PHILOSOPH E MEIROW, 2014).

É consenso entre os diversos estudos que existem certos agentes quimioterápicos, os chamados agentes alquilantes, que podem ser classificados como de alto risco para a disfunção gonadal. Os principais agentes quimioterápicos podem ser agrupados conforme seu potencial dano gonadal em (MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008):

- **Alto potencial:** ciclofosfamida, clorambucil, melfalano, bussulfano, mostarda nitrogenada e procarbazina.
- **Moderado potencial:** cisplatina e adriamicina
- **Leve ou nenhum efeito gonadotóxico:** bleomicina, dactinomicina, vincristina, metotrexato, 5-fluorouracil.

Sabe-se, entretanto, que na maioria das vezes, é utilizado um esquema com múltiplos agentes quimioterápicos, na tentativa de maiores efeitos contra as células cancerígenas e assim fica mais difícil individualizar o efeito danoso de cada droga (MARHHOM E COHEN, 2007; ANDERSON E WALLACE, 2011; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). A exata incidência de FOP após a quimioterapia é também difícil de ser mensurada, pois muitos fatores como idade, dose, tempo e tipo de droga contribuem para a falência ovariana. A presença de amenorréia persistente é usada como marcador para a FOP. A taxa de amenorréia após a quimioterapia pode variar de 14 a 100% (FALCONE *ET AL.*, 2004; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008; RONN E HOLZER, 2013). Nas mulheres mais jovens a taxa varia de 21% a 71%, enquanto que nas mais velhas de 49% a 100% (FALCONE *ET AL.*, 2004). Segundo estudo de Schilsky et al.,

metade das mulheres acima de 25 anos tratadas com poliquimioterapia (vincristina, procarbazina, mecloretamina e prednisona) para linfoma de Hodgkin evoluíram com amenorréia permanente (SCHILSKY *ET AL.*, 1981; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Segundo estudo de Byrne et al., o tratamento com agentes alquilantes, como a ciclofosfamida, durante a adolescência aumenta o risco de FOP em nove vezes (BYRNE *ET AL.*, 1992; DIEDRICH *ET AL.*, 2011).

A ciclofosfamida é uma das drogas mais antigas e efetivas utilizada na terapia adjuvante para o câncer de mama, e também uma das mais potentes em reduzir a reserva folicular ovariana. Uma mulher com 30 anos, ao iniciar a quimioterapia, terá uma idade ovariana de aproximadamente 40 anos, após 4-6 ciclos de poliquimioterapia com ciclofosfamida (KIM, KLEMP E FABIAN, 2011). Mulheres com 40 anos ou mais, tratadas para câncer de mama em estágio inicial, têm, aproximadamente três vezes mais risco de amenorréia do que mulheres abaixo de 30 anos (ANDERSON E WALLACE, 2011).

A dose cumulativa de drogas citotóxicas também aumenta a taxa de FOP. Goldhirsch et al. demonstraram um aumento de 10% para 61% na incidência de FOP à medida que a dose cumulativa de ciclofosfamida cresce (FALCONE *ET AL.*, 2004). Algumas mulheres sobreviventes de doenças oncológicas, principalmente as crianças e adolescentes, não se tornarão estéreis no momento imediato ao tratamento; entretanto o verdadeiro efeito, a longo prazo, na fertilidade dessas mulheres ainda não é conhecido. E mesmo recuperando a função ovariana pós tratamento, elas apresentam risco de futuramente sofrer as conseqüências da FOP (MARHHOM E COHEN, 2007; BECK-FRUCHTER, WEISS E SHALEV, 2008).

As altas doses de quimioterapia e radioterapia têm radicalmente elevado o grau de sobrevivência a longos períodos, em jovens pacientes sobreviventes de doenças oncológicas. O conhecimento dos riscos e probabilidades do dano ovariano causado por essas terapias é fator crucial para que pacientes e profissionais assistentes discutam sobre as opções de preservação da fertilidade.

Vale lembrar que existem ainda doenças como as auto-imunes (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, glomerulonefrites e doença de Beçet, por exemplo) que podem requerer uso de quimioterápicos e, conseqüentemente elevarem o risco de FOP, podendo, assim, aumentar a taxa de mulheres que se tornarão inférteis em idade reprodutiva (PCASRM, 2008).

2.5 Opções para a preservação da fertilidade feminina

Os recentes progressos na Medicina Reprodutiva permitiram o desenvolvimento de diversas novas técnicas de preservação da fertilidade. Muitas dessas técnicas ainda são experimentais ou sua eficácia ainda é limitada (VON WOLFF *ET AL.*, 2009). Embora existam várias opções para a preservação da fertilidade feminina, elas não são tão eficazes quanto a criopreservação de sêmen e todas elas requerem procedimentos invasivos e/ou uso de medicamentos (KIM, 2006).

As técnicas de criopreservação de gametas e embriões vêm sendo oferecidas numa frequência cada vez maior, principalmente devido ao número limitado de embriões frescos que podem ser transferidos por ciclo de Reprodução Assistida (número este que varia de acordo com as leis de cada país), associado às melhorias nas técnicas laboratoriais, nos resultados clínicos e atualmente na crescente preocupação de preservação de fertilidade após tratamentos citotóxicos (DIEDRICH *ET AL.*, 2011; CDC, 2014; REDLARA, 2014).

Todos os protocolos de criopreservação envolvem equilíbrio de células em crioprotetor seguido de congelamento, refrigeração e armazenamento em nitrogênio líquido a - 196°C. As técnicas de criopreservação incluem congelamento lento e vitrificação. O primeiro nascido vivo após o congelamento lento de embriões foi relatado em 1984 (ZEILMAKER *ET AL.*, 1984), e o primeiro nascido vivo pós vitrificação em 2001 (MUKAIDA *ET AL.*, 2001; DIEDRICH *ET AL.*, 2011).

A criopreservação de embriões é uma técnica clinicamente bem estabelecida e, por muitas instituições, considerada o único método bem documentado de preservação de fertilidade para mulheres com câncer (KIM, 2006; DUNN E FOX, 2009; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Em 2005, segundo relato da Sociedade de Reprodução Assistida dos Estados Unidos, as taxas de gestação após transferência de embriões congelados foram de 28% contra 34% de embriões “frescos” (GEORGESCU *ET AL.*, 2008). Já em 2008, essas taxas se elevaram para 32.1% (DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Segundo revisão realizada por Diedrich et al., as taxas de gestação com transferência de embriões congelados variam de 19.1% a 35% (DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Já outra revisão mais recente realizada por Roque et al., demonstrou que a transferência de embriões criopreservados apresentou aumento significativo das taxas de gravidez quando comparado com a transferência de embriões “frescos”. Tal fato poderia ser explicado por uma melhor sincronia embrião-endométrio alcançada na transferência de embriões criopreservados (ROQUE *ET AL.*, 2013). A criopreservação de embriões requer estimulação ovariana, captação oocitária e fertilização *in vitro*. Suas grandes limitações são o tempo necessário para a estimulação ovariana ser de 2 a 5 semanas, retardando o início do tratamento contra o câncer; não ser uma opção para crianças pré-púberes e para as mulheres que não têm parceiros, ou não desejam utilizar sêmen doado e para aquelas que apresentam tumores estrogênio dependentes, uma vez que a estimulação ovariana pode gerar níveis suprafisiológicos de estradiol, com risco de progressão tumoral ainda não estabelecido (KIM, 2006; MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; DIEDRICH *ET AL.*, 2011; KIM, KLEMP E FABIAN, 2011).

A criopreservação de oócitos é uma opção para mulheres sem parceiro e que não desejam usar sêmen doado (MARHHOM E COHEN, 2007; PCASRM, 2008; OKTEM E OKTAY, 2009; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). O primeiro nascido vivo originário de oócito criopreservado data de 1986 (CHEN, 1986). Os resultados obtidos desde então até 2004, apresentaram aproximadamente 100 crianças nascidas a partir de oócitos congelados (PCASRM, 2008). As taxas de gestação eram consideradas muito baixas (1 a 5%) após a transferência de embriões derivados de oócitos congelados (PCASRM, 2008). Oktay et al. realizaram uma meta-análise em 2006 para avaliar a eficiência da criopreservação de oócito. Neste estudo, verificou-se

que a taxa de nascidos vivos por oócito congelado foi de 1,9% naqueles oriundos do congelamento lento e 2,0% dos oriundos da vitrificação (OKTAY, CIL E BANG, 2006). As razões que podem justificar taxas de gestações pequenas podem ser muitas. Dentre elas, foram observadas as baixas taxas de sobrevivência dos oócitos (25-40%) e da fertilização após a FIV, alta incidência de poliploidias e baixa capacidade dos embriões se desenvolverem. Além disso, os processos de criopreservação podem causar endurecimento da zona pelúcida, afetando negativamente o processo de fertilização (MARHHOM E COHEN, 2007; PCASRM, 2008). Os oócitos maduros (metáfase II) são extremamente sensíveis e podem ser danificados durante o processo de criopreservação, afetando principalmente o fuso meiótico e o citoesqueleto. Oócitos imaturos criopreservados em estágio de vesícula germinativa são mais resistentes que os oócitos maduros, porém a técnica de maturação in vitro ainda é ineficiente e pouquíssimas gestações foram descritas após criopreservação de oócitos imaturos (MARHHOM E COHEN, 2007; GEORGESCU *ET AL.*, 2008; KIM, KLEMP E FABIAN, 2011).

Mais recentemente, as taxas de sobrevivência de oócitos criopreservados têm aumentado e resultados semelhantes aos observados com embriões criopreservados foram observados (PCASRM, 2008; GRIFO E NOYES, 2010). Melhorias nas técnicas de criopreservação têm elevado tais taxas, principalmente quando o processo de vitrificação é utilizado. A vitrificação consiste no congelamento ultra-rápido (- 1500°C/min) e requer o uso de altas concentrações de crioprotetores, que evitam a formação de cristais de gelo intra e extracelular. (TAO E DEL VALLE, 2008; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Nos últimos anos, a vitrificação é utilizada nos principais centros de Reprodução Humana, uma vez que trata-se de um método simples, rápido e que não utiliza equipamentos caros, se compararmos com o congelamento lento (MARHHOM E COHEN, 2007; TAO E DEL VALLE, 2008; DIEDRICH *ET AL.*, 2011). Taxas maiores que 80% de sobrevivência de oócitos após vitrificação já foram relatadas, comparadas com 50-65% de sobrevivência após congelamento lento convencional (DIEDRICH *ET AL.*, 2011). A vitrificação, ao evitar a formação de cristais de gelo no citoplasma e assim minimizar o dano à célula, possibilitou um aumento substancial nas taxas de nascidos vivos, tornando-as comparáveis em relação às taxas com embriões “frescos”

(GEORGESCU *ET AL.*, 2008). Na última década, mais de 475 nascidos vivos originários de oócitos congelados foram relatados, sendo que a maioria deles ocorreu nos últimos 3 anos até 2009 (GRIFO E NOYES, 2010). Outro estudo também publicado em 2009, relatou que desde o primeiro nascido vivo em 1986, mais de 900 crianças já nasceram de oócitos criopreservados no mundo (KIM, KLEMP E FABIAN, 2011). Apesar dos dados serem conflitantes em termos de números de nascidos vivos, fica claro o aprimoramento da técnica de criopreservação ultimamente com conseqüente incremento na taxa de nascidos a partir de oócitos criopreservados. Estudo prospectivo, realizado por Rienzi et al. em 2009, comparou o desenvolvimento de oócitos “frescos” com oócitos vitrificados após injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Foram avaliados 244 oócitos (120 “frescos” versus 124 vitrificados). Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos em relação a taxa de fertilização e de desenvolvimento embrionário (RIENZI *ET AL.*, 2010). Em outro estudo, realizado por Grifo et al., em 2010, verificou-se que a taxa de gravidez usando oócitos criopreservados não difere estatisticamente daquela que utilizou oócitos “frescos” (GRIFO E NOYES, 2010).

Os parâmetros de desenvolvimento embrionário, assim como os resultados clínicos obtidos têm se mostrado inalterado após a vitrificação de oócitos quando comparados com oócitos frescos em programas de doação de óvulos (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013). O advento da vitrificação como um meio de preservação da fertilidade, abriu uma janela de oportunidade, para muitas pacientes com câncer, de serem mães com seus próprios gametas, depois de terem superado a doença (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013).

2.6 “Indução de Urgência”

Os protocolos de indução da ovulação utilizados rotineiramente são iniciados em fase fixa do ciclo menstrual. Assim, muitas vezes a paciente não pode se submeter ao estímulo para posterior captação e preservação dos oócitos, devido à urgência do início do tratamento para o câncer.

A proposta do protocolo de indução de urgência surge para resolver as situações em que a paciente se encontra na fase ovulatória ou lútea e precisa iniciar o tratamento para o câncer em duas semanas. Dentro dos protocolos atuais, isso é impossível e impede à paciente de manter seu sonho de preservar sua capacidade reprodutiva, algumas vezes por questão de 10 dias. O objetivo do protocolo de urgência é iniciar a indução da superovulação com as gonadotrofinas independentemente da fase do ciclo menstrual que a paciente está no momento. Dessa forma, a paciente não compromete o início do tratamento para o câncer e consegue criopreservar seus oócitos e manter sua capacidade reprodutiva.

A introdução dos agonistas do hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH), no final da década de 80, revolucionou a estimulação ovariana nos tratamentos de Reprodução Assistida, uma vez que ao suprimir a secreção pituitária de gonadotrofinas, consegue prevenir o pico prematuro de hormônio luteinizante (LH). Anteriormente à sua introdução, cerca de 20% dos ciclos estimulados tinham que ser cancelados devido a ovulação prematura antes da captação oocitária(36). Nas últimas duas décadas, o protocolo com agonista de GnRH tem sido o tratamento padrão para estimulação ovariana em Reprodução Assistida (AL-INANY E ABOULGHAR, 2001).

O agonista de GnRH bloqueia a função hipofisária no eixo hipotalálamo-hipófise-ovário, antes da administração da gonadotrofina. A administração do agonista do GnRH é iniciada no 2º ou no 21º dia do ciclo menstrual e continua durante a administração subsequente de gonadotrofinas até o dia da administração do hormônio da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (ANDERSON, KINNIBURGH E BAIRD, 1999). As gonadotrofinas são iniciadas assim que se confirma o bloqueio da função hipofisária. Sendo assim, podem ser necessárias de 2 a 5 semanas para a estimulação completa e captação dos oócitos, dependendo da fase do ciclo menstrual que a mulher se encontra. O prazo para a estimulação ovariana convencional é inaceitável para muitas pacientes com câncer (KIM, 2006; SKLAR *ET AL.*, 2006; DEMIRTAS *ET AL.*, 2008; VON WOLFF *ET AL.*, 2009; MAMAN *ET AL.*, 2011).

A introdução dos antagonistas de GnRH na prática clínica promoveu uma nova opção de protocolo de estimulação. Nos protocolos com antagonista de GnRH, não há necessidade de bloqueio hipofisário anterior ao início da indução e a duração da indução ovariana pode ser reduzida (ANDERSON, KINNIBURGH E BAIRD, 1999). O antagonista de GnRH previne a liberação prematura do LH, permitindo o contínuo desenvolvimento folicular, sem os efeitos colaterais de hipoestrogenismo ou necessidade de aguardar um longo período para reverter o bloqueio hipofisário associado com o uso de agonistas (AL-INANY E ABOULGHAR, 2001). O antagonista inibe rapidamente a liberação de gonadotrofinas endógenas ao competir com o GnRH natural pela ligação a receptores na hipófise (AL-INANY E ABOULGHAR, 2001). Isso permite que seu uso ocorra a qualquer momento do crescimento folicular. A estimulação com gonadotrofina exógena começa na fase folicular precoce do ciclo menstrual.

Ao analisarmos todo o processo do desenvolvimento folicular, podemos perceber que o estímulo com gonadotrofina exógena nos protocolos de estimulação poderia teoricamente recrutar um pool de folículos a qualquer momento do ciclo menstrual e promover seu desenvolvimento. Esse estímulo duraria aproximadamente 10-15 dias, intervalo de tempo viável para as pacientes que urgem iniciar o tratamento oncológico.

O processo de maturação folicular ovariano é bem complexo. Os mecanismos fisiológicos da foliculogênese referente ao recrutamento e seleção dos folículos antrais nas mulheres ainda não foi completamente elucidado (XU E LI, 2013). Os pequenos folículos antrais observados durante a fase lútea não estão necessariamente em atresia, mas podem estar no estágio inicial do desenvolvimento folicular. Tal observação sugere a possibilidade de os folículos estarem continuamente disponíveis para estimulação com gonadotrofinas durante o ciclo menstrual (BAERWALD, ADAMS E PIERSON, 2012; KUANG *ET AL.*, 2014). O conceito de iniciar o estímulo ovariano em qualquer fase do ciclo não é novo. Entretanto, a convicção, sustentada por anos, de que havia uma única onda do recrutamento folicular e somente estimulações ovarianas nas fases iniciais da fase folicular poderiam resultar num desenvolvimento folicular sincronizado, somado à crença do efeito inibitório local do corpo lúteo e da progesterona na fase lútea, limitavam o desenvolvimento de novos protocolos de estimulação

(CAKMAK E ROSEN, 2013). Recentes evidências indicam que existem múltiplas ondas de recrutamento folicular durante todo o ciclo menstrual (BAERWALD, ADAMS E PIERSON, 2012; CAKMAK *ET AL.*, 2013; XU E LI, 2013). Baerwald et al. em 2003 mostraram que 68% das mulheres exibiam duas ondas de recrutamento folicular durante o intervalo interovulatório e 32% de 50 mulheres saudáveis exibiam 3 ondas. Somente a última onda de cada ciclo era ovulatória (BAERWALD, ADAMS E PIERSON, 2003; 2012; XU E LI, 2013). Em 2012, Baerwald et al. publicaram uma revisão sobre a foliculogênese ovariana e como resultado relatam que existem três diferentes teorias sobre o recrutamento folicular. A primeira teoria postula que existe um recrutamento contínuo durante o ciclo menstrual. A segunda teoria diz que o recrutamento dos folículos antrais ocorre uma vez na fase lútea tardia ou na fase folicular precoce de cada ciclo menstrual e a terceira e última teoria postula que existem duas ou três ondas de recrutamento por ciclo menstrual. Esse novo conceito da fisiologia ovariana é a base para o estímulo folicular flexível e “alternativo” realizado na fase lútea (XU E LI, 2013) e mesmo na folicular tardia.

Poucos estudos a respeito da indução da superovulação de urgência, iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual, foram publicados até o momento. O estudo piloto realizado por von Wolff et al. em 2009 foi um estudo prospectivo multicêntrico que avaliou a obtenção de oócitos após estimulação ovariana, tanto na fase folicular, quanto na fase lútea de 40 pacientes com câncer, antes da quimioterapia. As pacientes foram divididas em 2 grupos: pacientes estimuladas na fase folicular (grupo I) e pacientes estimuladas na fase lútea (grupo II). O tempo médio de estimulação foi de 10,6 dias para o grupo I e 11,4 dias para o grupo II. A média de oócitos maduros aspirados foi de 11,5 e 8,5 para grupo I e II, respectivamente. Por fim, a taxa de fertilização foi de 61% para o grupo I e 75,6% para o grupo II. Os autores concluíram que os oócitos podem ser obtidos de forma eficiente, independentemente da fase do ciclo menstrual (VON WOLFF *ET AL.*, 2009). Nesse mesmo estudo, os autores perceberam que as altas concentrações de progesterona no início da estimulação das pacientes que se encontravam na fase lútea, não afetou a qualidade oocitária (VON WOLFF *ET AL.*, 2009).

Outro estudo realizado por Michaan et al., compararam 22 pacientes (21 com diagnóstico de câncer e 1 paciente com glomeruloesclerose focal proliferativa) que foram submetidas a FIV

de urgência antes da quimioterapia(grupo A) com 22 pacientes saudáveis inférteis submetidas a FIV por fator tubário(grupo B). Foram analisados: dose de gonadotrofinas, nível de estradiol e progesterona, duração da estimulação, números de oócitos captados, número de zigotos com dois pró-núcleos, taxa de fertilização e taxa de gravidez. Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados entre os grupos (MICHAAN *ET AL.*, 2010).

Bedoschi et al. descreveram 2 relatos de caso de pacientes oncológicas (Cancer de Mama e Linfoma Hodgkin) que foram estimuladas (indução de urgência) na fase lútea. Ambas as pacientes obtiveram 12 oócitos maduros, sendo que na primeira paciente foram formados 7 embriões de boa qualidade e a segunda paciente optou por criopreservar todos os oócitos obtidos (BEDOSCHI *ET AL.*, 2010).

Em 2011, Sonmezer et al. publicaram o relato de 3 casos de pacientes com câncer de mama e FIV de urgência. Nos 3 casos, 7 a 10 embriões foram congelados com boas taxas de fertilização (SÖNMEZER *ET AL.*, 2011).

Nayak et al. apresentaram em 2011, o relato de 4 casos de pacientes oncológicas que foram estimuladas na fase folicular tardia ou lútea. A duração do estímulo variou de 8-13 dias, foram obtidos 14-40 oócitos e 5-20 embriões foram criopreservados (NAYAK E WAKIM, 2011).

Também em 2011, Maman e et al. avaliaram a captação oocitária para posterior maturação in vitro de 18 pacientes com câncer (5 pacientes encontravam-se na fase lútea e 13 pacientes na fase folicular). Não houve diferença significativa nos números de oócitos captados, nas taxas de maturação in vitro, nas taxas de fertilização ou no total de oócitos e embriões que foram criopreservados (MAMAN *ET AL.*, 2011).

Um estudo coorte retrospectivo realizado por Cakmak et al. e publicado em 2013 avaliou 128 pacientes com câncer. Destas pacientes, 93 foram submetidas ao estímulo ovariano

convencional iniciado na fase folicular precoce e 35 na fase folicular tardia ou na fase lútea. A média de dias de estimulação na fase folicular precoce foi de 9,3 (9,0-9,5) e na fase folicular tardia ou lútea foi de 10,9 (10,4-11,5). A dose média total de gonadotrofinas foi de 3404 UI (3.180-3.628) no grupo da fase folicular precoce versus 4.158 (3.774-4.542) no grupo da fase folicular tardia ou lútea. O número médio de oócitos capturados foi de 14,4 (12,8-16,2) no grupo da fase folicular precoce versus 14,5 (11,8-17,8) no grupo da fase folicular tardia ou lútea. O número médio de oócitos em metáfase II foi de 9,7 (8,4-11,2) no grupo da fase folicular precoce versus 9,9 (7,7-12,7) no grupo da fase folicular tardia ou lútea. A taxa de fertilização no grupo da fase folicular precoce foi de 0,72 (0,65-0,80) e no grupo da fase folicular tardia ou lútea foi de 0,87 (0,72-1,00). O número total de oócitos obtidos, as taxas de maturidade dos oócitos e as taxas de fertilização foram similares nos dois grupos (CAKMAK *ET AL.*, 2013). Foi o primeiro estudo que comparou os resultados da estimulação e a competência dos oócitos obtidos em ciclos de estimulação alternativos (iniciados na fase folicular tardia ou lútea) com a estimulação convencional (fase folicular precoce) em pacientes com câncer (CAKMAK *ET AL.*, 2013).

Recentemente, foi realizada por Friedler et al., uma meta-análise com apenas 7 estudos, comparando a resposta ovariana após estimulação controlada em pacientes com doenças malignas para preservação da fertilidade (grupo estudado) com pacientes hígdas inférteis por fator tubário ou fator masculino (grupo controle). Os sete estudos incluídos na meta-análise totalizaram 218 pacientes oncológicas que se submeteram a ciclos de indução antes da quimioterapia ou radioterapia, entretanto todos os ciclos de indução foram iniciados na fase folicular inicial. Foi observada uma média mais baixa de oócitos captados no grupo de mulheres oncológicas quando comparadas com o grupo controle ($11,7 \pm 7,5$ versus $13,5 \pm 8,4$; $p=0,002$), assim como uma média mais baixa de número de oócitos maduros quando comparadas com o grupo controle ($9,0 \pm 6,5$ versus $10,8 \pm 6,8$; $p=0,002$) (FRIEDLER *ET AL.*, 2012).

Outro estudo observacional retrospectivo e multicêntrico realizado na Espanha e publicado em 2013 avaliou 560 pacientes não oncológicas e 475 pacientes oncológicas a respeito da

vitrificação de óocitos para preservação de fertilidade. As variáveis comparadas foram dias de estimulação, dose total de gonadotrofinas, nível de estrogênio, número de oócitos obtidos e vitrificados e taxa de gravidez. A média de dias de estímulo foi de $10,1 \pm 2,1$ no grupo das pacientes não oncológicas versus $9,5 \pm 5,9$ no grupo das pacientes oncológicas. A média da dose total de gonadotrofina foi de $3038 \text{UI} \pm 337$ no grupo das pacientes não oncológicas versus $1851 \text{UI} \pm 979$ no grupo das pacientes oncológicas. O nível médio de estradiol foi de $2.214 \text{pg/mL} \pm 566$ no grupo das pacientes não oncológicas versus $1.369 \text{pg/mL} \pm 1371$ nas pacientes oncológicas. O número médio de oócitos em metáfase II por paciente foi de $9,9$ no grupo das pacientes não oncológicas versus $8,5$ no grupo das pacientes oncológicas. O número de nascidos vivos foi cinco no grupo de pacientes não oncológicas versus um nas pacientes oncológicas. Os resultados obtidos foram comparáveis nos dois grupos, sendo que apenas a dose total de gonadotrofina usada e os níveis séricos de estradiol foram mais baixos nas mulheres com câncer (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013).

Mais um estudo retrospectivo e multicêntrico, porém estudo tipo coorte, foi realizado no período de 1999 até 2011 na França e publicado em 2013. Foram selecionadas 52 pacientes submetidas à FIV de urgência. Das pacientes selecionadas, 48 pacientes tinham doenças oncológicas e 4 delas doenças auto-imunes sistêmicas. Vários tipos de protocolos de estimulação foram usados neste estudo (protocolo antagonista em 42,2%, protocolo longo com agonista em 30,3%, protocolo curto com agonista em 23,2% e protocolo com inibidor de aromatase em 3,5% dos casos). Os resultados obtidos foram $8,2 \pm 4,8$ oócitos captados, destes $6,1 \pm 4,2$ eram maduros (metáfase II), a taxa de fertilização foi de 72,3% e foram $4,2 \pm 3,1$ embriões congelados por ciclo. Um total de 25 embriões foram transferidos, resultando em 1 gravidez bioquímica, um aborto e 3 nascidos vivos. A taxa de gravidez clínica e nascidos vivos por casal que desejaram gravidez após o câncer foi respectivamente de 36% e 27% (COURBIERE *ET AL.*, 2013).

Em 2014, foi publicado por Kuang et al., o primeiro estudo de coorte prospectivo avaliando a estimulação ovariana com hMG e letrozol durante a fase lútea em mulheres inférteis por fator tubário, fator masculino ou infertilidade sem causa aparente. Um total de 242 mulheres

foi selecionado e todas as pacientes conseguiram produzir oócitos. Destas 227 mulheres (93,8%), tiveram embriões de alta qualidade para criopreservação (KUANG *ET AL.*, 2014).

Dentre as técnicas de preservação da fertilidade feminina disponíveis atualmente, a criopreservação de embriões (técnica já bem estabelecida e com resultados cada dia mais satisfatórios) seguida da criopreservação de oócitos são as mais promissoras técnicas para as pacientes diagnosticadas com tumores malignos. Ambas necessitam de estimulação ovariana para que seja possível atingir um número satisfatório de embriões/oócitos para criopreservação. E para aquelas pacientes que não podem retardar o início do tratamento oncológico, a indução de urgência se torna uma possível e revolucionária opção.

3. OBJETIVO

Avaliar os resultados da indução ovariana controlada com posterior captação de oócitos, em ciclos de estimulação ovariana iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, em mulheres com câncer, que não podem adiar o início do tratamento oncológico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional com a finalidade de avaliar a capacidade de obtenção de oócitos, após indução da ovulação, iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual (indução de urgência) em pacientes com câncer. Participaram do estudo pacientes atendidas na Clínica Origen - Centro de Medicina Reprodutiva com indicação de indução de urgência devido a necessidade de iniciarem o tratamento oncológico com um prazo limite de 15 a 20 dias. Após se inteirarem da pesquisa, sanarem todas as dúvidas e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE-Anexo II), as pacientes foram incluídas no estudo. Todas as pacientes foram previamente informadas sobre as opções alternativas existentes para a preservação da fertilidade.

A realização deste estudo foi autorizada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), registro 16871, Parecer 039/2013, Processo nº 5000.045088/2012-61 (Anexo I).

4.2 Grupo de Estudo

Durante o período de abril de 2013 até junho de 2014, todas as pacientes atendidas na Origen Centro de Medicina Reprodutiva com diagnóstico de câncer, sem tratamento quimioterápico ou radioterápico prévio, foram submetidas ao protocolo de estimulação de urgência, independente da fase do ciclo menstrual em que se encontravam para preservação da

fertilidade. Durante o período do estudo, 12 mulheres com câncer foram selecionadas e submetidas à hiperestimulação ovariana.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão no estudo foram:

1. Pacientes em idade reprodutiva com ciclos menstruais regulares nos últimos seis meses (intervalo de 25 a 35 dias entre as menstruações),
2. Pacientes com desejo de preservação da sua fertilidade,
3. Pacientes com diagnóstico de câncer, sem qualquer tratamento prévio e com indicação de tratamento (quimioterapia, radioterapia ou cirurgia) a ser iniciado no máximo em 15 a 20 dias
4. Autorização e conscientização prévia da paciente sobre o presente estudo.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- Pacientes com câncer metastático
- Pacientes muito debilitadas ou com qualquer quadro infeccioso
- Pacientes com menos de 18 anos ou mais de 44 anos de idade
- Recusa em assinar o termo de consentimento

4.2.3 Características da amostra

Participaram do estudo 12 pacientes, sendo que uma delas foi excluída durante a hiperestimulação ovariana por motivos médicos. As características clínicas das pacientes foram resumidas no quadro 1.

As pacientes foram divididas em dois grupos: grupo da fase lútea (grupo I) ou grupo da fase folicular (grupo II), de acordo com a fase do ciclo menstrual que as pacientes estavam no início da hiperestimulação. Foi considerada fase folicular a primeira fase do ciclo menstrual com duração média 10 a 14 dias (dia 1 a 14 do ciclo menstrual). A fase lútea foi considerada o período iniciado após a ovulação, com duração média de 14 dias (15 a 28 dia do ciclo menstrual).

Tabela 1: Características das pacientes com câncer submetidas à estimulação ovariana controlada iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual

| Pacientes | Idade(anos) | Paridade(GPA) | Estado civil | Tipo de cancer | Fase do ciclo |
|------------------|--------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|
| 1 | 32 | G0 | Casada | Mama | Lútea |
| 2 | 30 | G1A1 | Casada | Mama | Lútea |
| 3 | 38 | G1A1 | Casada | Endométrio | Folicular |
| 4 | 31 | G0 | Solteira | Ovário | Folicular |
| 5 | 27 | G0 | Solteira | Sistema Nervoso Central | Lútea |
| 6 | 31 | G0 | Casada | Intestino | Folicular |
| 7 | 21 | G0 | Solteira | Ovário | Lútea |
| 8 | 32 | G1A1 | Casada | Endométrio | Lútea |
| 9 | 40 | G0 | Solteira | Mama | Lútea |
| 10 | 33 | G0 | Casada | Sistema Nervoso Central | Folicular |
| 11 | 31 | G0 | Solteira | Mama | Folicular |

4.3 Protocolo de Estimulação, aspiração folicular e Vitrificação

A fase do ciclo menstrual em que as pacientes se encontravam no início da hiperestimulação ovariana foi avaliada pela data da última menstruação (DUM), associada a avaliação ultrassonográfica e dosagem sérica de estradiol (E2), Hormônio Luteinizante (LH) e progesterona. As pacientes foram submetidas ao protocolo de estimulação com hormônio folículo estimulante recombinante (rFSH) diário (Gonal F ;Merck Serono). O início do uso foi imediato e a dose inicial de rFSH foi definida de acordo com a idade da paciente

(pacientes com até 30 anos: dose inicial 225UI, pacientes entre 30 e 35 anos: dose inicial 300UI e pacientes de 35 a 40 anos: dose inicial de 375UI) e ajustada de acordo com a resposta ovariana avaliada pela ultrassonografia e pelos níveis de E2.

A monitorização foi feita através de ultrassonografia endovaginal (Tosbee – Toshiba, Japan) e dosagem hormonal seriada, realizada a cada 3 ou 4 dias de acordo com a resposta folicular de cada paciente. O uso do antagonista do GnRH (Cetrotide; Merck Serono) foi iniciado assim que evidenciada a presença de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14mm na ultrassonografia seriada e/ou níveis elevados de LH ($LH > 8IU/L$).

O crescimento folicular foi monitorizado através de ultrassonografia endovaginal seriada. O hormônio da gonadotrofina coriônica recombinante (rhCG; Ovidrel 250 μ g; Merck Serono) ou o análogo de GnRH (Gonapeptyl, Ferring ou Lorelin Depot, Bergamo) foi administrado quando pelo menos dois folículos atingiram o diâmetro médio de 17mm com níveis concordantes de estradiol.

A captação oocitária foi realizada 34-36 horas após a administração do rhCG (250 μ g) ou GnRH por punção guiada por ultrassonografia vaginal, com a paciente em posição de litotomia, sob analgesia venosa, com propofol, sem intubação orotraqueal. Foi utilizada a agulha de punção folicular conectada a uma sonda endovaginal e a uma bomba a vácuo. Os folículos foram aspirados, e seu conteúdo enviado para tubos de ensaio de 14ml (Falcon – EUA). Quando necessário, os folículos foram lavados utilizando-se meio de cultivo tamponado (Flushing media) à base de Earle's balanced salt solution (EBSS) contendo solução tamponada de HEPES (Sigma – EUA). O conteúdo foi colocado em placa de Petri, de 100mm x 20mm (Corning – EUA), em capela de fluxo laminar, e foi observado sob aumento de 8 vezes em microscópio estereoscópico (Nikon – Japão). Os oócitos identificados foram colocados em placas de cultivo de 60mm x 15mm (Corning – USA) contendo gotas de 20 μ l de meio de cultura EBSS (Sigma – EUA) suplementado com 10% de substituto sintético do soro (SSS) (Irvine Scientific – EUA) e 0,47mM de piruvato (sigma –

EUA), cobertas com óleo mineral (Sigma – EUA) pré-filtrado (Figura 1), preparadas e equilibradas 15 horas antes.



Figura 1: Placa de cultivo dos oócitos imaturos. A placa é composta por gotas de meio EBSS suplementado com 10% de SSS mais 0,47 mM de piruvato, cobertas com óleo mineral pré-filtrado.
Fonte: Clínica Origen

Os oócitos foram incubados durante duas horas na incubadora com atmosfera de 6% de CO₂ a uma temperatura de 37 graus Celsius. Após este tempo, eles foram colocados em placas de 35mm x 10mm, contendo Flushing Medium com hialuronidase 80 UI/ml (Sigma – EUA) durante alguns segundos. As células da corona radiata foram removidas através da denudação mecânica, utilizando-se pipetas Pasteur com luz reduzida. A remoção do cumulus dos oócitos possibilita a verificação do estágio de maturação nuclear ou o acompanhamento desta, caso os oócitos não sejam maduros (MII) (Figura 2).

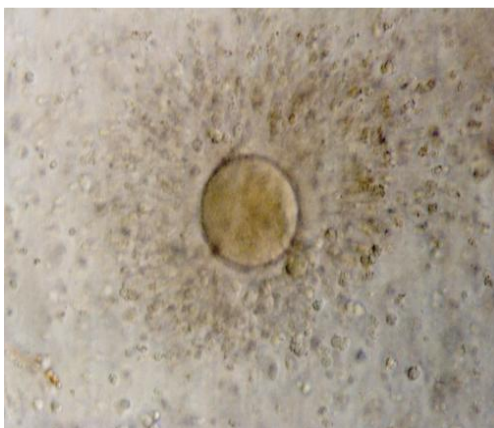


Figura 2: Oócito antes da denudação. O oócito é envolvido pelas células do cumulus oophorus e corona radiata que serão removidas por denudação enzimática e mecânica respectivamente, para verificação do estágio de maturação oocitária.
Fonte: Clínica Origen

O estágio de maturação era confirmado em microscópio invertido (Nikon – Japão), utilizando-se o aumento de 400 vezes. Os oócitos foram classificados como imaturos ou vesícula germinal (VG) se possuísem núcleo contendo um nucléolo (Figura 3); maturidade intermediária ou metáfase I (MI) se não possuísem corpúsculo polar e núcleo com nucléolo (Figura 4); maduros ou metáfase II (MII) se possuísem corpúsculo polar no espaço perivitelínico (Figura 5).



Figura 3: Vesícula Germinal. A presença de núcleo com nucléolo (seta) indica que o oócito encontra-se no estágio de vesícula germinal ou prófase I.

Fonte: Clínica Origen



Figura 4: Oócito em metáfase I. A ausência de núcleo com nucléolo e ausência de corpúsculo polar indicam que o oócito encontra-se no estágio de metáfase I.

Fonte: Clínica Origen

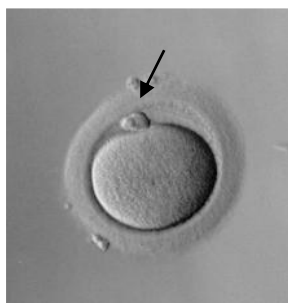


Figura 5: Oócito em metáfase II. A presença do corpúsculo polar no espaço perivitelínico (seta) indica que o oócito é maduro ou metáfase II.

Fonte: Clínica Origen

Os oócitos maduros foram criopreservados através da técnica de vitrificação, utilizando o kit de vitrificação Ingámed. O kit é composto por solução de equilíbrio VI-1 e solução de vitrificação VI-2. Fase de equilíbrio: Uma placa de 15 x 60mm (cat.15100,Ingamed) foi preparada com uma gota de 20 μ l de solução tampão HEPES próxima a 2 gotas de 20 μ l de solução VI (gotas 1 e 2) e mais 3 gotas de VI-1 (gotas 3, 4 e 5) distante das primeiras gotas. Os oócitos foram colocados na gota HEPES e depois acrescentada a gota 1 de VI-1 e aguardado 3 minutos. A gota 2 de VI-1 foi associada à gota HEPES + VI-1 e mais 3 minutos de espera.O ócito foi então transferido para a primeira gota das 3 gotas de VI-1 (gota 3), homogeneizado nas gotas 3 e 4 e deixado na gota 5.O ócito permaneceu na gota 5 VI-1 até a total reidratação.

Fase de vitrificação: Em outra placa de 15 x 60 mm, foram colocadas 3 gotas de 20 μ l de VI-2. O ócito foi então aspirado da gota VI-1 e transferido para a primeira gota de VI-2, homogeneizado várias vezes em pontos diferentes da gota e transferido para a segunda gota de VI-2. Homogeneizado novamente em pontos diferentes e transferido para a terceira gota de VI-2 com posterior homogeneização. O ócito foi então transferido para a haste de vitrificação com volume mínimo de líquido. A haste foi mergulhada diretamente em nitrogênio líquido e depois inserida no protetor, já mergulhado no tanque de nitrogênio líquido, para criopresevação.

4.4 Análise estatística

Foi utilizado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para a análise estatística do estudo. Na análise estatística foram apresentadas as medidas descritivas Mínimo, Máximo, Mediana, Média, desvio-padrão (d.p.) e erro padrão da média (e.p.m.), além, de percentuais como medidas para descrever os resultados das variáveis estudadas.

Mesmo tratando-se de uma amostra pequena, o teste utilizado (teste não paramétrico) é adequado. Todos os resultados foram considerados significativos para uma probabilidade de significância inferior a 5% ($p < 0,05$), tendo, portanto, pelo menos 95% de confiança nas conclusões apresentadas.

5. RESULTADOS

No estudo, foram incluídas 12 pacientes. Uma paciente foi excluída durante a pesquisa, pois apresentou sinais de compressão pelo tumor (linfoma Mediastinal) e necessidade de cirurgia de urgência. A idade das pacientes variou de 21 a 40 anos com média de 31,4. Do total, quatro tinham diagnóstico de câncer de Mama, duas pacientes tinham câncer de Ovário, uma paciente tinha câncer de Intestino, duas pacientes tinham câncer do Sistema Nervoso Central e duas pacientes tinham câncer de endométrio. Sete pacientes eram casadas e quatro pacientes eram solteiras. Em relação à paridade, oito pacientes eram nuligestas e três pacientes tinham história de um aborto prévio (Tabela 1).

Tabela 2: Características das pacientes com câncer submetidas ao estímulo ovariano controlado iniciado nas diferentes fases do ciclo menstrual

| Característica | Fase Lútea | Fase Folicular |
|---------------------------------|-------------------|-----------------------|
| Paridade | | |
| GO | 4(66,7%) | 4(80%) |
| G1A1 | 2(33,3%) | 1(20%) |
| Estado Civil | | |
| Casada | 4(66,7%) | 3(60%) |
| Solteira | 2(33,3%) | 2(40%) |
| Tipo de Câncer | | |
| Mama | 3(50%) | 1(20%) |
| Endométrio | 1(16,%) | 1(20%) |
| Ovário | 1(16,7%) | 1(20%) |
| Intestino | 0(0) | 1(20%) |
| Sistema Nervoso Central | 1(16,7%) | 1(20%) |
| Dia do ciclo- início | | |
| 1-14 | 0(0) | 5(100%) |
| 15-28 | 6(100%) | 0(0) |
| Protocolo de estimulação | | |
| Agonista | 0(0%) | 1(20,0) |
| Antagonista | 6(100%) | 4(80%) |
| Maturação Final | | |
| GnRH | 5(83,3%) | 4(80%) |
| hCG | 1(16,7%) | 1(20%) |

As pacientes foram divididas em 2 grupos de acordo com a fase do ciclo menstrual em que se encontravam no início do estímulo. No grupo I, foram incluídas as pacientes que se encontravam na Fase Lútea (n=6) e no grupo II as pacientes que se encontravam na Fase Folicular (n=5) (Tabelas 2 e 3)

Tabela 3: Resultados da estimulação ovariana controlada iniciada na fase lútea em pacientes com câncer

| Início estímulo (dia do ciclo) | Protocolo utilizado | Duração do estímulo | Dose total de FSHr | Antagonista | Maturação final | Folículos ao US | Folículos aspirados | Óocitos capturados | Oócitos MII | Oócitos MI | VG |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------|------------|----|
| 18 | Antagonista | 8 | 2100UI | 4 Ampolas | GnRH | 30 | 30 | 30 | 24 | 3 | 3 |
| 28 | Antagonista | 10 | 3150UI | 4 Ampolas | hCG | 11 | 11 | 9 | 6 | 2 | 1 |
| 20 | Antagonista | 11 | 2625UI | 5 Ampolas | GnRH | 19 | 28 | 28 | 19 | 6 | 3 |
| 20 | Antagonista | 10 | 2400UI | 4 Ampolas | GnRH | 13 | 11 | 14 | 12 | 2 | 0 |
| 22 | Antagonista | 11 | 2400UI | 5 Ampolas | GnRH | 30 | 9 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| 21 | Antagonista | 10 | 2850UI | 6 Ampolas | GnRH | 26 | 26 | 26 | 17 | 9 | 0 |

G: Gestações; P: Partos; A: Abortos (GPA); UI: Unidades Internacionais; US: ultrassonografia; MII: oócitos em metáfase II; MI: óocitos em metáfase I; VG: Vesícula germinal

Tabela 4: Resultados da estimulação ovariana controlada iniciada na fase folicular em pacientes com câncer

| Início Estímulo (dia do ciclo) | Protocolo utilizado | Duração do estímulo | Dose total de FSHr | Antagonista | Maturação final | Folículos ao US | Folículos aspirados | Oócitos capturados | Oócitos MII | Oócitos MI | VG |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------|------------|----|
| 7 | Agonista | 10 | 3075UI | 0 Ampolas | hCG | 34 | 34 | 34 | 18 | 9 | 7 |
| 5 | Antagonista | 11 | 2850UI | 4 Ampolas | GnRH | 20 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Antagonista | 12 | 2550UI | 7 Ampolas | GnRH | 40 | 37 | 26 | 4 | 7 | 15 |
| 4 | Antagonista | 10 | 2175UI | 6 Ampolas | GnRH | 22 | 22 | 18 | 15 | 3 | 0 |
| 7 | Antagonista | 10 | 2400UI | 6 Ampolas | GnRH | 17 | 24 | 24 | 13 | 11 | 0 |

G: Gestações; P: Partos; A: Abortos (GPA); UI: Unidades Internacionais; US: ultrassonografia; MII: oócitos em metáfase II; MI: óocitos em metáfase I; VG: Vesícula germinal

Quando comparamos as pacientes que iniciaram o tratamento na fase lútea com aquelas que iniciaram na fase folicular observamos que no grupo I, a idade das pacientes variou de 21 a 40 anos, com média de $30,3 \pm 2,6$ e no grupo II, a idade variou de 31 a 38 anos com média $32,8 \pm 1,4$.

A duração do estímulo na fase Lútea foi $10,0 \pm 0,4$ e na fase folicular foi de $10,6 \pm 2,1$. A dose total de FSH utilizada durante a indução foi de $2587 \text{UI} \pm 152$ no grupo da fase Lútea e $2610 \text{UI} \pm 160$ no grupo da fase Folicular. O número de ampolas utilizadas de antagonistas de GnRh no grupo da fase Lútea foi de $4,7 \pm 0,3$ e no grupo da fase folicular foi de $4,6 \pm 1,2$. No grupo I, a média de folículos aspirados foi de $19,2 \pm 4,0$, a média de oócitos captados foi de $18,5 \pm 4,5$, a média de oócitos maduros (MII) foi de $13,7 \pm 3,2$, a média de oócitos imaturos (MI) foi de $3,7 \pm 1,3$ e a média de VG foi de $1,2 \pm 0,6$. Já no grupo da fase Folicular, a média de folículos aspirados foi de $26,6 \pm 3,9$, a média de oócitos captados foi de $20,4 \pm 5,7$; a média de oócitos maduros foi de $10,0 \pm 3,4$; a média de oócitos imaturos foi de $6,0 \pm 2,0$ (mediana de 7,0) e a media de VG foi de $4,4 \pm 3,0$. Não houve diferença significativa em nenhuma das variáveis analisadas quando comparamos o grupo da fase Lútea com o grupo da fase Folicular ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 5: Análise descritiva e comparativa entre os grupos I e II em relação às variáveis de interesse

| Variáveis | Fase Lútea | Fase Folicular | P |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-------|
| Idade das pacientes (anos) | $30,3 \pm 2,6$ | $32,8 \pm 1,4$ | 0,460 |
| Dias de estímulo | $10,0 \pm 0,4$ | $10,6 \pm 2,1$ | 0,481 |
| Dose total de FSHr | 2.587 ± 152 | 2.610 ± 160 | 0,926 |
| Doses de Antagonista | $4,7 \pm 0,3$ | $4,6 \pm 1,2$ | 0,508 |
| Folículos ao US | $19,2 \pm 4,0$ | $26,6 \pm 3,9$ | 0,360 |
| Folículos Aspirados | $19,2 \pm 4,0$ | $26,6 \pm 3,9$ | 0,272 |
| Oócitos Captados | $18,5 \pm 4,5$ | $20,4 \pm 5,7$ | 0,927 |
| Oócitos maduros | $13,7 \pm 3,2$ | $10,0 \pm 3,4$ | 0,410 |
| Oócitos imaturos | $3,7 \pm 1,3$ | $6,0 \pm 2,0$ | 0,311 |
| VG | $1,2 \pm 0,6$ | $4,4 \pm 3,0$ | 0,765 |

O valor da probabilidade de significância(p) na tabela refere-se ao teste de Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou a viabilidade do uso da estimulação ovariana controlada, iniciada independente da fase do ciclo menstrual, como alternativa para mulheres com doenças oncológicas e que não podem retardar o início do tratamento do câncer.

Na literatura, existem poucos estudos sobre a estimulação ovariana controlada na fase folicular tardia ou fase lútea para preservação de fertilidade de urgência. Apesar de termos avaliado uma amostra limitada de mulheres, por tratar-se de pacientes de um único centro reprodutivo privado, conseguimos demonstrar que a preservação da fertilidade de urgência para criopreservação de oócitos é possível tanto na fase lútea como na fase folicular tardia. Comparando nosso resultado com os principais estudos publicados sobre indução de urgência em pacientes oncológicas, pudemos perceber resultados semelhantes aos nossos.

O câncer de mama foi o mais prevalente dentre os cânceres apresentados pelas pacientes avaliadas, correspondendo a 36,3% dos casos. Segundo relatório do INCA de 2014, o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, excluindo os cânceres de pele não melanoma (INCA, 2014). Quintero et al. publicaram estudo em 2010 sobre preservação da fertilidade em mulheres com câncer. Do total de 50 pacientes oncológicas, 28 (56%) pacientes tinham diagnóstico de câncer de mama (QUINTERO *ET AL.*, 2010). Domingo et al. em 2012 relataram que das pacientes com câncer avaliadas no estudo referente a reposta ovariana controlada após o hiperestímulo, 68,7% apresentavam câncer de mama (DOMINGO *ET AL.*, 2012). Frieder et al. publicaram meta-análise, incluindo 7 estudos. Do total de 218 pacientes incluídas, 124 (56,9%) apresentavam câncer de mama (FRIEDLER *ET AL.*, 2012). Cakmak et al. em 2013 publicaram estudo com 128 mulheres com câncer submetidas a estimulação ovariana para preservação de urgência. Um total de 93 mulheres apresentava câncer de mama (72,6%) (CAKMAK *ET AL.*, 2013). Velasco et al. em 2013 publicaram estudo referente à experiência de

vitrificação de óocitos para preservação da fertilidade em mulheres com ou sem indicação médica. Das pacientes oncológicas avaliadas, 67% apresentam câncer de mama (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013). Em 4 outros estudos referentes a preservação da fertilidade com câncer, o tipo mais prevalente de câncer da amostra estudada foi o hematológico, porém o câncer de mama ainda configurava como um dos mais frequentes (VON WOLFF *ET AL.*, 2009; DAS *ET AL.*, 2011; MAMAN *ET AL.*, 2011; COURBIERE *ET AL.*, 2013).

A idade das pacientes variou de 21 a 40 anos, com média de 31,4, sendo que nas pacientes do grupo I (fase lútea) a média de idade foi de $30,3 \pm 2,6$ e no grupo II (fase folicular) foi de $32,8 \pm 1,4$. Trata-se de uma amostra de mulheres jovens com diagnóstico de câncer que desejam preservar sua fertilidade para terem filhos no futuro, o que está de acordo com a literatura mundial. A média de idade (anos) apresentada nos estudos sobre preservação de fertilidade com mulheres oncológicas foi de $31,9 \pm 5,1$ (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013); $34,2 \pm 4,6$ para mulheres na fase lútea ou folicular tardia e $33,8 \pm 4,6$ para mulheres na fase folicular precoce (CAKMAK *ET AL.*, 2013); no estudo de meta-análise, a média de idade variou de $31 \pm 2,0$ a $36 \pm 3,6$ (FRIEDLER *ET AL.*, 2012); $32,3 \pm 5,0$ (QUINTERO *ET AL.*, 2010); $27,6 \pm 4,9$ (fase folicular) e $31,2 \pm 5,7$ (fase lútea) (VON WOLFF *ET AL.*, 2009); $23,4 \pm 6,5$ para pacientes da fase lútea e $24,1 \pm 5,4$ para pacientes da fase folicular (MAMAN *ET AL.*, 2011); $28,9 \pm 4,3$ (COURBIERE *ET AL.*, 2013).

Em relação à dose total de gonadotrofinas utilizada durante o estímulo ovariano controlado, não observamos diferença significativa entre os dois grupos avaliados (pacientes na fase lútea: $2.587 \text{UI} \pm 152$ e pacientes na fase folicular: $2.610 \text{UI} \pm 160$, $p = 0,926$). Resultados semelhantes foram por von Wolff et al. em 2009 (dose total: $2255 \text{UI} \pm 928$ para o grupo folicular e $2720 \text{UI} \pm 964$ para o grupo lúteo) que também compararam a dose total utilizada nas duas diferentes fases do ciclo menstrual. Cakmak *et al.* (2013), entretanto, encontraram diferença significativa ($p = 0,001$) quando compararam a dose utilizada por pacientes oncológicas na fase folicular (dose total: 3.404UI ($3180-3.628$)) com a dose total nas pacientes da fase folicular tardia ou lútea (dose total: 4.158UI ($3.774-4.542$)) em uso de

letrozol. Apesar dos autores não discutirem o motivo para tal diferença no seu estudo, ela pode ser decorrente do uso aleatório do letrozol (CAKMAK *ET AL.*, 2013).

A dose total de gonadotrofinas foi comparada entre pacientes oncológicas e pacientes inférteis não oncológicas (grupo controle) submetidas a FIV. Domingo *et al.* (2012), publicaram não haver diferença significativa na dose de gonadotrofina total utilizada em pacientes oncológicas (2 grupos de pacientes oncológicas - dose total: 1803UI±889 e 1755UI±1114) e no controle (dose total:1947±808) (DOMINGO *ET AL.*, 2012); Das *et al.* (2011), também não encontraram diferença entre a dose total de gonadotrofinas entre o grupo de mulheres com doenças oncológicas (4 grupos de doenças oncológicas: 2.484UI±313; 2.857UI±428; 1.760UI±222 e 1850UI±292,8) e o grupo controle (2.487UI±229,5) (DAS *ET AL.*, 2011). Entretanto, Quintero *et al.* (2010), demonstraram que no grupo de mulheres oncológicas a dose total de gonadotrofinas era significativamente maior (4.174UI±1.276) quando comparada com o grupo controle (3.416UI±1209; p:0,003) (QUINTERO *ET AL.*, 2010) e justificam tal achado com a hipótese de que pacientes com câncer necessitam de uma estimulação mais longa e agressiva devido a diminuição da capacidade reprodutiva secundária à sua doença. Além disso, os autores utilizaram tamoxifeno nas mulheres com câncer de mama (DOMINGO *ET AL.*, 2012). Contrariando Quintero *et al.* (2010), Velasco *et al.* (2013), descreveram uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de pacientes oncológicas, porém as pacientes oncológicas utilizaram uma dose total de gonadotrofinas menor (dose total: 1.851UI±979) do que o controle (dose total: 3.038±337, p<0,001), sem justificativas para tal diferença (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013). Assim, não existe um consenso de que seja necessária uma dose diferente de gonadotrofina para estimulação ovariana em mulheres com câncer, independente da fase do ciclo que foi iniciada.

O tempo médio total de estímulo ovariano (em dias) não apresentou diferença nos dois grupos. Nas pacientes que se encontravam na fase lútea foi de 10,0 ±0,4 dias e 10,6 ±2,1 dias naquelas que estavam na fase folicular ao iniciarem o tratamento (p=0,481). No estudo de von Wolff *et al.* (2009), também não encontraram diferença significativa em relação à média

total de dias do estímulo ovariano. Nas pacientes da fase lútea, o tempo médio total de estímulo foi de $11,4\pm 2,6$ e nas pacientes da fase folicular foi de $10,6\pm 2,5$ (VON WOLFF *ET AL.*, 2009). Das *et al.* (2011) também não encontraram diferença na média total de dias de estímulo quando compararam grupo controle (pacientes inférteis: $8,0\pm 0,3$) com pacientes oncológicas (câncer hematológico: $8,0\pm 0,5$; Câncer ginecológico e gastrointestinal: $9,0\pm 0,6$; câncer do sistema nervoso central: $8,0\pm 1,4$; câncer ósseo: $8,0\pm 0,3$) (DAS *ET AL.*, 2011). Domingo *et al.* (2012), apresentaram no seu estudo que a média de duração do estímulo não diferiu nas pacientes com câncer hormônio dependentes ($9,6\pm 2,4$ dias) em relação ao grupo controle de pacientes inférteis ($9,9\pm 1,6$ dias). Entretanto, quando comparadas com pacientes com câncer não hormônio dependente ($8,7\pm 1,7$ dias ; $p<0,05$), houve diferença significativa, justificada pelo fato de uso de protocolos diferentes entre os grupos (DOMINGO *ET AL.*, 2012). Cakmak *et al.* (2013) encontraram diferença significativa em relação à duração do estímulo em pacientes com câncer. Nas pacientes em que o estímulo foi iniciado na fase folicular precoce, a média de dias de estímulo foi de 9,3 dias e no grupo de início do estímulo aleatório foi de 10,9 dias (CAKMAK *ET AL.*, 2013). Quintero *et al.* (2010), demonstraram no seu estudo que as pacientes oncológicas necessitaram de um estímulo mais longo, em dias, (média de $10,5\pm 2,4$) quando comparadas com o grupo controle de paciente inférteis(média de $9,0\pm 1,4$; $p<0,001$) (QUINTERO *ET AL.*, 2010). Contrariando Quintero *et al.* (2010), Velasco *et al.* (2013) apresentaram em seu estudo que nas mulheres não oncológicas, o tempo de estímulo médio foi significativamente maior ($10,1\pm 2,1$ dias) quando comparado com mulheres oncológicas ($9,5\pm 5,9$ dias; $p<0,001$) (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013). A diferença observada no tempo de estímulo das pacientes com câncer nos estudos de Cakmak *et al.* e Quintero *et al.* pode ser explicada pelo uso de letrozol e tamoxifeno.

Courbiere *et al.* (2013), avaliaram 56 casos de FIV de urgência em pacientes com câncer e a média de duração total do estímulo foi de $11,2\pm 2,5$ dias (COURBIERE *ET AL.*, 2013). Kuang *et al.* (2014) avaliaram no seu estudo apenas pacientes inférteis em que o estímulo foi iniciado durante a fase lútea e encontraram uma média de duração de estímulo de $10,2\pm 1,6$ dias (KUANG *ET AL.*, 2014). Na meta-análise publicada por Friedler *et al.* (2012), em quatro dos sete estudos incluídos, houve comparação do tempo de duração média do estímulo em

pacientes com câncer e pacientes do grupo controle. Não houve diferença estatística na média de duração do estímulo do grupo estudado versus o controle ($10,9 \pm 2,2$ versus $10,9 \pm 1,9$ respectivamente, $p=0,97$) (FRIEDLER *ET AL.*, 2012). Os estudos acima quando comparados entre si, apresentam grupos bem heterogêneos, o que dificulta determinar se o tempo de estímulo ovariano médio iniciado na fase lútea nas pacientes com câncer é diferente, quando comparado com pacientes inférteis ou mesmo pacientes com câncer com estímulo iniciado na fase folicular.

No nosso estudo, tanto a quantidade de oócitos captados quanto a maturidade dos óocitos não diferiu significativamente entre os grupos que iniciaram o tratamento na fase lútea e na fase folicular (oócitos captados: $18,5 \pm 4,5$ versus $20,4 \pm 5,7$, $p:0,927$; oócitos metáfase II: $13,7 \pm 3,2$ versus $10,0 \pm 3,4$; $p:0,410$). Esse achado está de acordo com o observado por von Wolff *et al.* (2009), realizado apenas com mulheres com câncer, que identificaram uma média de oócitos no grupo da fase lútea de $10 \pm 5,7$ e na fase folicular de $13,3 \pm 6,8$ e a taxa de oócitos em metáfase II foi respectivamente de 80,4% e 83,7%, indicando uma qualidade oocitária igual em ambos os grupos (VON WOLFF *ET AL.*, 2009).

Outro estudo coorte retrospectivo realizado por Cakmak *et al.* e publicado em 2013 avaliou 128 pacientes com câncer. O número total de oócitos obtidos na fase convencional de estímulo (fase folicular precoce) foi de 14,4 (12,8-16,2) e na fase aleatória foi de 14,5 (11,8-17,8), as taxas de maturidade dos oócitos foram de 9,7 (8,4-11,2) e 9,9 (7,7-12,7). Não houve diferença significativa nos dois grupos. O uso de letrozol, nos casos de câncer sensíveis ao estrogênio, não afetou os resultados em ambos os grupos (CAKMAK *ET AL.*, 2013). Foi o primeiro estudo que comparou os resultados da estimulação e a competência dos oócitos obtidos em ciclos de estimulação alternativos (iniciados na fase folicular tardia ou lútea) com a estimulação convencional (fase folicular precoce) em pacientes com câncer (CAKMAK *ET AL.*, 2013).

Mais um estudo retrospectivo e multicêntrico, porém estudo tipo coorte, foi realizado no período de 1999 até 2011 na França e publicado em 2013. Foram selecionadas 52 pacientes

submetidas à FIV de urgência devido a enfermidades que necessitavam de tratamentos gonadotóxicos em 14 centros de fertilização, sendo que do total, 48 pacientes tinham câncer. Os resultados obtidos foram $8,2\pm 4,8$ oócitos captados, destes $6,1\pm 4,2$ estavam em estágio de metáfase II (COURBIERE *ET AL.*, 2013).

Bedoschi *et al.* (2010) descreveram 2 relatos de caso de pacientes oncológicas (Cancer de Mama e Linfoma Hodgkin) que foram estimuladas (indução de urgência) na fase lútea. Ambas as pacientes obtiveram 12 oócitos em metáfase II. Sonmezer *et al.* (2011) publicaram o relato de 3 casos de pacientes com câncer de mama que necessitavam ser estimuladas com urgência na fase do ciclo menstrual em que se encontravam quando optaram por preservação da fertilidade. A estimulação ovariana foi iniciada nos dias 11,14 e 17 do ciclo menstrual. Foram captados 17,9 e 16 oócitos e 10,7 e 11 oócitos em metáfase II, respectivamente. Nayak *et al.* apresentaram em 2011, o relato de 4 casos de pacientes oncológicas que foram estimuladas na fase folicular tardia ou lútea devido a estreita janela entre o diagnóstico do câncer e o início do tratamento. Foram obtidos 14-40 oócitos, sendo que oócitos em metáfase II foram 6-30. Também em 2011, Maman e *et al.* demonstraram que a média de oócitos aspirados nas pacientes na fase lútea foi de $12,8\pm 8,4$ e na fase folicular foi de $17,3\pm 13,5$ para maturação *in vitro*, sem estimulação ovariana prévia. A captura de oócitos na fase lútea para posterior maturação *in vitro* é uma ótima alternativa para preservação da fertilização de urgência, quando não há tempo suficiente para a captura oocitária convencional na fase folicular antes que a quimioterapia seja iniciada. Não houve diferença significativa nos números de oócitos captados, nas taxas de maturação *in vitro* ($48,6\%\pm 18,3$ versus $57,8\%\pm 29,2$), nas taxas de fertilização ($69,2\%\pm 47,4$ versus $63,2\%\pm 27,3$) ou no total de oócitos e embriões que foram criopreservados ($6,4\pm 6,6$ versus $7,8\pm 7,5$, respectivamente) (MAMAN *ET AL.*, 2011). Apesar da técnica de maturação *in vitro* ser considerada ainda experimental e a amostra deste estudo ser limitada, podemos concluir que existe a possibilidade de capturar oócitos “competentes” para maturação *in vitro* na fase lútea, assim como podemos também estimular o crescimento de folículos na fase lútea com posterior captura de oócitos maduros para indução de urgência como vimos nos trabalhos anteriores citados acima.

Outro estudo observacional retrospectivo e multicêntrico realizado na Espanha e publicado em 2013 avaliou 560 pacientes não oncológicas e 475 pacientes oncológicas entre Março de 2007 a Junho de 2012. Neste estudo, avaliaram a vitrificação de óocitos para preservação de fertilidade em pacientes com e sem indicação médica. A média de oócitos captados nas pacientes não oncológicas foi de $13,0 \pm 24,0$ e das pacientes oncológicas foi de $11,8 \pm 8,0$. O total de oócitos em metáfase II por paciente foi de $9,9 \pm 22,6$ nas pacientes não oncológicas e $8,5 \pm 6,4$ nas pacientes oncológicas. Ambos os parâmetros (total de oócitos captados e oócitos em metáfase II) não apresentaram diferença estatística quando comparados entre os grupos. O estudo concluiu que a vitrificação de oócitos é simples, segura e uma eficiente opção para preservação de gametas com diferentes indicações médicas e não médicas (GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013).

Friedler *et al.* (2012), realizaram uma meta-análise com apenas sete estudos. Um total de 218 pacientes oncológicas foi submetido a ciclos de indução antes da quimioterapia ou radioterapia, entretanto todos os ciclos de indução foram iniciados na fase folicular inicial. Do total de 218 pacientes, 124 (56,9%) tinham câncer de mama. Por causa das preocupações com a exposição a altas doses de estrogênios, as pacientes com câncer de mama receberam juntamente com a gonadotrofina, um inibidor da aromatase (letrozol) ou modulador seletivo do receptor de estrógeno (tamoxifeno). Foi observada uma média mais baixa de oócitos captados no grupo de mulheres oncológicas quando comparadas com o grupo controle, mulheres inférteis, ($11,7 \pm 7,5$ versus $13,5 \pm 8,4$; $p=0,002$), assim como uma média mais baixa de número de oócitos metáfase II quando comparadas com o grupo controle ($9,0 \pm 6,5$ versus $10,8 \pm 6,8$; $p=0,002$). Neste estudo, discutiu-se que tanto a doença maligna como a condição multissistêmica da paciente podem ter influência na resposta ovariana após estimulação. O aumento do estado catabólico, a má nutrição e o aumento de hormônios pelo stress da presença do câncer podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-ovário e diminuir a fertilidade. Alguns autores (AGARWAL E SAID, 2004; QUINTERO *ET AL.*, 2010; DOMINGO *ET AL.*, 2012) corroboram com o fato de que a doença maligna pode ter um impacto negativo sobre a resposta aos tratamentos de preservação da fertilidade . Já outros autores (MICHAAN *ET AL.*,

2010; DAS *ET AL.*, 2011; ROBERTSON, MISSMER E GINSBURG, 2011; GARCIA-VELASCO *ET AL.*, 2013; DEVESA *ET AL.*, 2014; NURUDEEN *ET AL.*, 2014) demonstraram que as doenças malignas parecem não afetar os resultados após estímulo ovariano. A falta de consenso sobre o efeito do câncer sobre a resposta ovariana após estímulo para a preservação da fertilidade pode ser explicada pelo limitado número de ciclos de FIV descritos. Além disso, sabe-se muito pouco sobre os resultados clínicos a longo prazo nos casos de FIV para doenças malignas (COURBIERE *ET AL.*, 2013).

O estudo publicado em 2014, por Kuang *et al.*, reafirma a possibilidade de estimulação ovariana na fase lútea, mesmo em mulheres inférteis, sem câncer. Foi o primeiro estudo de coorte prospectivo avaliando a estimulação ovariana com (gonadotrofina menopusal humana (hMG) e letrozol durante a fase lútea em mulheres inférteis por fator tubário, fator masculino ou infertilidade sem causa aparente. Um total de 242 mulheres foi selecionado e em todas foram identificados oócitos. A média de oócitos captados foi de $13,1 \pm 8,5$ e de oócitos maduros foi de $11,2 \pm 7,2$. Esse estudo mostrou pela primeira vez que, mesmo em mulheres inférteis sem câncer, a estimulação ovariana na fase lútea é factível para produzir oócitos e embriões competentes com boas taxas de gravidez (KUANG *ET AL.*, 2014). Assim, o uso da estimulação ovariana controlada iniciada na fase lútea é uma técnica viável como um procedimento de urgência para as pacientes recentemente diagnosticadas com câncer e que urgem em iniciar o tratamento oncológico (KUANG *ET AL.*, 2014).

No nosso estudo, utilizamos, em 91% das pacientes (n=10) o antagonista de GnRh, assim que o primeiro folículo apresentou 14mm de diâmetro médio ou mesmo para promover a luteólise. Em todos os artigos apresentados sobre indução na fase folicular tardia ou na fase lútea foi necessário o uso de antagonista de GnRh para promover a luteólise. O seu uso durante a fase lútea foi originalmente explorado em pacientes com câncer e depois usado também em má respondedoras na FIV como um método para aprimorar a estimulação ovariana através da luteólise e sincronizando o desenvolvimento com a próxima onda de folículos (CAKMAK E ROSEN, 2013). O seu uso na fase lútea em pacientes com câncer foi descrito primeiramente por Anderson *et al.* em 1999 com o objetivo de minimizar qualquer

atraso no tratamento definitivo da doença maligna das pacientes envolvidas. Neste estudo, seis pacientes com câncer foram submetidas ao protocolo de estimulação ovariana para preservação da fertilidade. Dentre elas, duas pacientes encontravam-se na fase lútea e uma dose de antagonista de GnRh foi usada para induzir a luteólise. A luteólise foi confirmada pela rápida queda da concentração da progesterona medida em 2 a 4 dias e logo após as pacientes foram estimuladas por 9 e 11 dias respectivamente com aplicação de 150UI/dia de hMG, resultando na captação de 8 e 6 oócitos e posterior fertilização de 6 e 4 oócitos (taxa de fertilização de 71%) (ANDERSON, KINNIBURGH E BAIRD, 1999; VON WOLFF *ET AL.*, 2009).

O conceito de induzir a luteólise através do uso do antagonista do GnRh seguido de estimulação ovariana alguns dias depois já foi descrito por outros estudos com pacientes inférteis na tentativa de aumentar a eficácia do tratamento convencional de FIV (VON WOLFF *ET AL.*, 2009). Em um destes estudos, Humaidan *et al.* (2005) demonstraram em 72 ciclos de FIV/ICSI que o número de oócitos capturados foi maior no grupo que utilizou antagonista de GnRh para luteólise quando comparado com o protocolo longo convencional (HUM AidAN *ET AL.*, 2005; VON WOLFF *ET AL.*, 2009).

O uso do antagonista de GnRH tem por objetivo impedir o pico endógeno de LH através do bloqueio hipofisário, caso o pico ainda não tenha acontecido. Se já houver o corpo lúteo (CL), o antagonista de GnRH, pelo mesmo mecanismo, irá abaixar o nível sérico de LH. Poucos dias após a formação do CL, a luteólise é adiada pelos baixos níveis basais de LH. Isso implica dizer que a luteólise, induzida pela redução dos níveis de LH, leva mais tempo durante fase inicial da formação do CL. Já na fase lútea tardia, a regressão natural do CL é induzida pela queda do LH. Para sustentar a função do CL, assim como no início da gestação, altas doses de LH/hCG são necessárias. A regressão artificial do CL pode ser feita através da administração de antagonista de GnRh que irá reduzir os baixos níveis basais de LH (VON WOLFF *ET AL.*, 2009). Sendo assim, o mesmo efeito (bloqueio da hipófise) causado pelo antagonista de GnRH apresentará funções diferentes de acordo com a fase do ciclo menstrual que ele for utilizado.

Ao contrário do que se acreditava anteriormente, a presença do corpo lúteo ou os níveis mais elevados de progesterona na fase lútea não afetam adversamente o desenvolvimento folicular e nem a obtenção de oócitos nas pacientes estimuladas em protocolos alternativos (CAKMAK E ROSEN, 2013).

O uso do agonista de GnRh e não do hCG para desencadear a maturação oocitária final em um ciclo de FIV, iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual foi primeiramente descrito por Nayak *et al.* (2011). Neste estudo, demonstrou-se que é possível obter oócitos maduros em qualquer fase do ciclo quando usamos o agonista de GnRh para o gatilho final da maturação oocitária (NAYAK E WAKIM, 2011). No nosso estudo, tal premissa foi confirmada, já que dos 11 casos analisados, em 9 deles (5 pacientes da fase lútea e 4 pacientes da fase folicular) usamos o agonista de GnRh com a vantagem ainda de reduzir o risco de Síndrome de Hiperestímulo Ovariano. A necessidade de minimizar o risco da Síndrome do Hiperestímulo Ovariano é particularmente importante nas mulheres com câncer, pois o advento da síndrome poderia resultar no atraso do tratamento oncológico (CHUNG *ET AL.*, 2013).

Apesar da taxa de sobreviventes do câncer aumentar a cada dia, os oncologistas referenciam pouco as pacientes para avaliação de preservação da fertilidade. Apesar da maioria dos oncologistas nos centros acadêmicos de ensino discutir com suas pacientes sobre o risco de infertilidade após o tratamento, raramente encaminha suas pacientes para um Centro de Medicina Reprodutiva (FORMAN, ANDERS E BEHERA, 2010). Em um estudo recente realizado na Suécia, 48% das mulheres em tratamento oncológico receberam informações sobre os efeitos adversos do tratamento na sua fertilidade, apenas 14% receberam informações sobre preservação da fertilidade e somente 2% realizaram algum tratamento para preservação da fertilidade (ARMUAND *ET AL.*, 2012). Niemasik *et al.* em 2012, também relataram sobre a falta de informação sobre preservação da fertilidade com apenas 12,2% das pacientes sobreviventes do câncer terem sido informadas sobre as possibilidades de preservação da fertilidade (NIEMASIK *ET AL.*, 2012).

Somado a esse fato, muitas pacientes se encontram muito abaladas com a doença maligna que possuem e por isso não conseguem discernir sobre o seu desejo ou não de preservação da fertilidade. Como o tempo de decisão é curto, muitas iniciam o tratamento quimioterápico, radioterápico ou cirúrgico tão logo são aconselhadas pelo seu oncologista.

Um estudo recente demonstrou que as mulheres que receberam aconselhamento especializado sobre questões referentes a preservação da fertilidade relataram menos pesar e maior qualidade de vida (LETOURNEAU *ET AL.*, 2012; VADAPARAMPIL E QUINN, 2013). Neste estudo, 1041 mulheres diagnosticadas com câncer entre 18 e 40 anos de vida responderam um questionário retrospectivo. Destas mulheres, 918 fizeram parte do estudo. Das 918, 61% foram aconselhadas sobre preservação da fertilidade pelos oncologistas, 5% pelos especialistas em Reprodução Humana e 4% adotaram medidas para preservação da fertilidade (8 pacientes congelaram embriões, 9 congelaram oócitos, 1 foi submetida a transposição ovariana e 18 pacientes utilizaram medicação para supressão da função ovariana). As restantes não obtiveram nenhuma informação sobre a preservação da fertilidade (LETOURNEAU *ET AL.*, 2012). Letourneau *et al.* (2012) relataram no seu estudo que o potencial risco da perda da fertilidade tem um profundo impacto nas mulheres jovens com câncer e talvez possa ser mais estressante que o próprio diagnóstico do câncer (LETOURNEAU *ET AL.*, 2012).

A preservação da fertilidade é um componente em constante evolução e de extrema importância do atendimento integral da paciente com câncer (NAYAK E WAKIM, 2011). Estima-se que mais de um terço das mulheres jovens expostas a tratamentos oncológicos desenvolverão FOP (CHUNG *ET AL.*, 2013). Como a janela entre o diagnóstico do câncer e o início do tratamento pode ser estreita, é essencial que as técnicas de reprodução assistida a serem utilizadas sejam eficientes e aceleradas, já que tais pacientes terão provavelmente uma única chance de estímulo ovariano controlado.

Nas pacientes com câncer, o início da quimioterapia ou radioterapia não pode ser adiado por mais 3 semanas após o diagnóstico, na maioria dos casos. Sendo assim, não somente o

encaminhamento imediato para um especialista em Reprodução Humana é necessário, como também a possibilidade de indução em qualquer fase do ciclo menstrual deve ser considerada.

Existe uma necessidade mundial urgente de transmitir informações claras relacionadas à fertilidade para pacientes do sexo feminino com câncer, com o objetivo de melhorar as suas oportunidades de participar de decisões sobre seu tratamento e principalmente sobre sua capacidade reprodutiva futura (ARMUAND *ET AL.*, 2012).

Essa nova alternativa de estimulação ovariana (indução de urgência) possivelmente terá um grande impacto, já que minimizará os atrasos no tratamento, permitirá que todas as pacientes iniciem seu tratamento oncológico em 2 a 3 semanas após a primeira consulta e criará uma oportunidade de tentativa de preservação da fertilidade para pacientes que não teriam tal chance devido a restrições temporais (CAKMAK *ET AL.*, 2013).

Estudos clínicos adicionais com amostras maiores devem ser realizados para comprovar a eficácia desta nova estratégia, especialmente em relação a taxas de gravidez e nascidos vivos originários de embriões ou oócitos criopreservados obtidos de estimulações ovarianas com início aleatório (CAKMAK E ROSEN, 2013).

O cuidado com as pacientes oncológicas é complexo, desafiador e requer um acompanhamento multidisciplinar. Para àquelas que desejam preservar a fertilidade, o contato e intercâmbio de informações entre oncologista e especialista em Medicina Reprodutiva deve ser estreitado, sendo sempre crucial oferecer a melhor opção de tratamento possível, visando o bem estar da paciente.

7. CONCLUSÃO

A estimulação ovariana controlada, iniciada em qualquer fase do ciclo (indução de urgência), é uma alternativa viável, sem comprometer o número de oócitos capturados e sua maturidade.

REFERÊNCIAS

ACS. American Cancer Society. Cancer Statistics 2014. A Presentation from the American Cancer Society. 2014. Disponível em: < <http://www.cancer.org> >. Acesso em: 05/08/2014.

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Implications of systemic malignancies on human fertility. **Reprod Biomed Online**, v. 9, n. 6, p. 673-9, Dec 2004.

AL-INANY, H.; ABOULGHAR, M. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted conception. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD001750, 2001.

ANDERSON, R. A.; KINNIBURGH, D.; BAIRD, D. T. Preliminary experience of the use of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist in ovulation induction/in-vitro fertilization prior to cancer treatment. **Hum Reprod**, v. 14, n. 10, p. 2665-8, Oct 1999.

ANDERSON, R. A.; WALLACE, W. H. Fertility preservation in girls and young women. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 75, n. 4, p. 409-19, Oct 2011.

ARMUAND, G. M. et al. Sex differences in fertility-related information received by young adult cancer survivors. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 17, p. 2147-53, Jun 2012.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. **Fertil Steril**, v. 80, n. 1, p. 116-22, Jul 2003.

_____. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. **Hum Reprod Update**, v. 18, n. 1, p. 73-91, 2012 Jan-Feb 2012.

BECK-FRUCHTER, R.; WEISS, A.; SHALEV, E. GnRH agonist therapy as ovarian protectants in female patients undergoing chemotherapy: a review of the clinical data. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 6, p. 553-61, 2008 Nov-Dec 2008.

BEDOSCHI, G.; OKTAY, K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. **Fertil Steril**, v. 99, n. 6, p. 1496-502, May 2013.

BEDOSCHI, G. M. et al. Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, n. 8, p. 491-4, Aug 2010.

BYRNE, J. et al. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 166, p. 788-793, 1992.

CAKMAK, H. et al. Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. **Fertil Steril**, v. 100, n. 6, p. 1673-80, Dec 2013.

CAKMAK, H.; ROSEN, M. P. Ovarian stimulation in cancer patients. **Fertil Steril**, v. 99, n. 6, p. 1476-84, May 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Disponível em: < <http://www.cdc.com> >. Acesso em: 08/05/2014.

CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**, v. 1, n. 8486, p. 884-6, Apr 1986.

CHUNG, K. et al. Emergency IVF versus ovarian tissue cryopreservation: decision making in fertility preservation for female cancer patients. **Fertil Steril**, v. 99, n. 6, p. 1534-42, May 2013.

COURBIERE, B. et al. Emergency IVF for embryo freezing to preserve female fertility: a French multicentre cohort study. **Hum Reprod**, v. 28, n. 9, p. 2381-8, Sep 2013.

CRITCHLEY, H. O.; WALLACE, W. H. Impact of cancer treatment on uterine function. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 34, p. 64-8, 2005.

DAS, M. et al. Ovarian reserve, response to gonadotropins, and oocyte maturity in women with malignancy. **Fertil Steril**, v. 96, n. 1, p. 122-5, Jul 2011.

DEMIRTAS, E. et al. Immature oocyte retrieval in the luteal phase to preserve fertility in cancer patients. **Reprod Biomed Online**, v. 17, n. 4, p. 520-3, Oct 2008.

DEVESA, M. et al. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in women with cancer is as expected according to an age-specific nomogram. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 5, p. 583-8, May 2014.

DIEDRICH, K. et al. Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. **Reprod Biomed Online**, v. 22, n. 3, p. 232-48, Mar 2011.

DOMINGO, J. et al. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment. **Fertil Steril**, v. 97, n. 4, p. 930-4, Apr 2012.

DUNN, L.; FOX, K. R. Techniques for fertility preservation in patients with breast cancer. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 21, n. 1, p. 68-73, Feb 2009.

FALCONE, T. et al. Ovarian function preservation in the cancer patient. **Fertil Steril**, v. 81, n. 2, p. 243-57, Feb 2004.

FORMAN, E. J.; ANDERS, C. K.; BEHERA, M. A. A nationwide survey of oncologists regarding treatment-related infertility and fertility preservation in female cancer patients. **Fertil Steril**, v. 94, n. 5, p. 1652-6, Oct 2010.

FRIEDLER, S. et al. Ovarian response to stimulation for fertility preservation in women with malignant disease: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 97, n. 1, p. 125-33, Jan 2012.

GARCIA-VELASCO, J. A. et al. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. **Fertil Steril**, v. 99, n. 7, p. 1994-9, Jun 2013.

GEORGESCU, E. S. et al. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. **Obstet Gynecol Surv**, v. 63, n. 11, p. 725-32, Nov 2008.

GRIFO, J. A.; NOYES, N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. **Fertil Steril**, v. 93, n. 2, p. 391-6, Feb 2010.

GUNASHEELA, D.; GUNASHEELA, S. Strategies for fertility preservation in young patients with cancer: a comprehensive approach. **Indian J Surg Oncol**, v. 5, n. 1, p. 17-29, Mar 2014.

HUMAIDAN, P. et al. Reproductive outcome using a GnRH antagonist (cetorelix) for luteolysis and follicular synchronization in poor responder IVF/ICSI patients treated with a flexible GnRH antagonist protocol. **Reprod Biomed Online**, v. 11, n. 6, p. 679-84, Dec 2005.

INCA. **Instituto Nacional do Cancer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Cancer. Cancer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e mortalidade.** SAÚDE, M. D. Rio de Janeiro: 220p p. 2008.

_____. **Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil.** SAÚDE, M. D. Rio de Janeiro 2014.

KIM, S. S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. **Fertil Steril**, v. 85, n. 1, p. 1-11, Jan 2006.

KIM, S. S.; KLEMP, J.; FABIAN, C. Breast cancer and fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 95, n. 5, p. 1535-43, Apr 2011.

KUANG, Y. et al. Luteal-phase ovarian stimulation is feasible for producing competent oocytes in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment, with optimal pregnancy outcomes in frozen-thawed embryo transfer cycles. **Fertil Steril**, v. 101, n. 1, p. 105-11, Jan 2014.

LETOURNEAU, J. M. et al. Pretreatment fertility counseling and fertility preservation improve quality of life in reproductive age women with cancer. **Cancer**, v. 118, n. 6, p. 1710-7, Mar 2012.

MAMAN, E. et al. Luteal phase oocyte retrieval and in vitro maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 95, n. 1, p. 64-7, Jan 2011.

MARHHOM, E.; COHEN, I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstet Gynecol Surv**, v. 62, n. 1, p. 58-72, Jan 2007.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 6, p. 535-43, 2001 Nov-Dec 2001.

MICHAAN, N. et al. Ovarian stimulation and emergency in vitro fertilization for fertility preservation in cancer patients. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 149, n. 2, p. 175-7, Apr 2010.

MUKAIDA, T. et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. **Fertil Steril**, v. 76, n. 3, p. 618-20, Sep 2001.

NAYAK, S. R.; WAKIM, A. N. Random-start gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist-treated cycles with GnRH agonist trigger for fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 96, n. 1, p. e51-4, Jul 2011.

NIEMASIK, E. E. et al. Patient perceptions of reproductive health counseling at the time of cancer diagnosis: a qualitative study of female California cancer survivors. **J Cancer Surviv**, v. 6, n. 3, p. 324-32, Sep 2012.

NURUDEEN, S. K. et al. Fertility Preservation Decisions Among Newly Diagnosed Oncology Patients: A Single-Center Experience. **Am J Clin Oncol**, Jan 2014.

OKTAY, K.; CIL, A. P.; BANG, H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 86, n. 1, p. 70-80, Jul 2006.

OKTEM, O.; OKTAY, K. Fertility preservation for breast cancer patients. **Semin Reprod Med**, v. 27, n. 6, p. 486-92, Nov 2009.

PCASRM. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**, v. 90, n. 5 Suppl, p. S241-6, Nov 2008.

QUINTERO, R. B. et al. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. **Fertil Steril**, v. 93, n. 3, p. 865-8, Feb 2010.

REDLARA. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. 2014. Disponível em: < <http://www.redlara.com/> >. Acesso em: 05/08/2014.

RIENZI, L. et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. **Hum Reprod**, v. 25, n. 1, p. 66-73, Jan 2010.

ROBERTSON, A. D.; MISSMER, S. A.; GINSBURG, E. S. Embryo yield after in vitro fertilization in women undergoing embryo banking for fertility preservation before chemotherapy. **Fertil Steril**, v. 95, n. 2, p. 588-91, Feb 2011.

RONESS, H.; KALICH-PHILOSOPH, L.; MEIROW, D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. **Hum Reprod Update**, May 2014.

RONN, R.; HOLZER, H. E. Oncofertility in Canada: the impact of cancer on fertility. **Curr Oncol**, v. 20, n. 4, p. e338-44, Aug 2013.

ROQUE, M. et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**, v. 99, n. 1, p. 156-62, Jan 2013.

SCHILSKY, R. L. et al. Long-term follow up of ovarian function in women treated with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. **Am. J. Med.**, v. 71, p. 552-556, 1981.

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, Jul 2006.

SÖNMEZER, M. et al. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. **Fertil Steril**, v. 95, n. 6, p. 2125.e9-11, May 2011.

TAO, T.; DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 7, p. 287-96, Jul 2008.

VADAPARAMPIL, S. T.; QUINN, G. P. Improving communication between oncologists and reproductive specialists to promote timely referral of patients with cancer. **J Oncol Pract**, v. 9, n. 6, p. 300-2, Nov 2013.

VON WOLFF, M. et al. Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. **Fertil Steril**, v. 92, n. 4, p. 1360-5, Oct 2009.

WALLACE, W. H.; THOMSON, A. B.; KELSEY, T. W. The radiosensitivity of the human oocyte. **Hum. Reprod.**, v. 18, p. 117-121, 2003.

WUNDER, D. et al. Fertility preservation in cancer patients. Review of the French speaking part of Switzerland and recommendations for different situations. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. w13645, 2012.

XU, B.; LI, Y. Flexible ovarian stimulation in a poor responder: a case report and literature review. **Reprod Biomed Online**, v. 26, n. 4, p. 378-83, Apr 2013.

ZEILMAKER, G. H. et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. **Fertil Steril**, v. 42, n. 2, p. 293-6, Aug 1984.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer de aprovação do CONEP



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N.º. 039/2013

Registro CONEP 16871 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto – 472727

Processo nº 25000.045088/2012-61

Projeto de Pesquisa: “*Estimulação Ovariana Iniciada em Qualquer Fase do Ciclo Menstrual (Indução de Urgência) com Captação de Oócitos Maduros para Preservação da Fertilidade em Mulheres com Câncer e que Não Podem Retardar o Início do Tratamento Oncológico*”, modificado em 17/05/2012; **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** *Estimulação Ovariana Para Preservação Da Fertilidade*, modificado em 18/05/2012.

Pesquisador Responsável: Selmo Geber

Instituição: Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
(CENTRO ÚNICO)

CEP de origem: COEP – UFMG

Área Temática Especial: Reprodução Humana

Patrocinador: não informado.

Sumário geral do protocolo

Introdução/histórico do projeto: Com os avanços obtidos no tratamento dos diversos tipos de câncer, a taxa de sobrevivência de mulheres jovens, em idade reprodutiva, e com desejo de gravidez aumentou significativamente nos últimos anos. A partir desse aumento, as mulheres que não tem filhos e que não tem parceiro definitivo começaram a buscar alternativas para a preservação de sua capacidade reprodutiva e, com isso, planejar uma futura gestação.

O principal problema do tratamento da maioria dos cânceres mais comuns em mulheres jovens é que esse envolve a cirurgia (ooforectomia) e/ou tratamentos citotóxicos (quimioterapia e radioterapia) que podem parcialmente ou definitivamente afetar a função reprodutiva.

As opções existentes para preservação da fertilidade feminina variam desde técnicas clinicamente estabelecidas até técnicas experimentais. Dentre as opções hoje disponíveis podemos citar a criopreservação de embriões ou de oócitos para futura fertilização *in vitro*, o congelamento de tecido ovariano ou de todo o ovário para futura reimplantação, a transposição ovariana antes da radioterapia e a proteção farmacológica.

A criopreservação de embriões é uma técnica clinicamente bem estabelecida e, por muitas instituições, considerada o único método bem documentado de preservação de fertilidade para mulheres com câncer.

A criopreservação de embriões requer estimulação ovariana, captação oocitária e fertilização *in vitro*. Suas grandes limitações são o tempo necessário para a estimulação ovariana ser de 2 a 5 semanas, retardando o início do tratamento contra o câncer, não ser uma opção para crianças pré-púberes, para as mulheres que não têm parceiros ou não desejam utilizar sêmen doado e para aquelas que apresentam tumores estrogênio dependentes, uma vez que a estimulação ovariana pode gerar níveis suprafisiológicos de estradiol, com risco de progressão tumoral ainda não estabelecido.

Alternativas às limitações da criopreservação de embriões vêm sendo estudadas e se tornando cada vez mais promissoras. Uma delas seria a utilização de tamoxifeno

(modulador seletivo do receptor de estrogênio) ou letrozole (inibidor da aromatase) como estimuladores do crescimento folicular associados ou não a baixas doses de gonadotrofinas para pacientes com neoplasias estrógeno-dependentes, principalmente câncer de mama, no intuito de reduzir as elevações de estradiol. Os resultados obtidos por estudos que utilizaram essas drogas têm como limitadores o número reduzido de oócitos captados quando comparados com os protocolos convencionais de estimulação ovariana.

Surge neste cenário, a promissora possibilidade da indução da ovulação de urgência para captação de oócitos, iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual naquelas pacientes que não podem retardar o início de seu tratamento para o câncer, mantendo assim reais chances de preservação da fertilidade.

A proposta do protocolo de indução de urgência surge para resolver as situações em que a paciente se encontra na fase ovulatória ou lútea e precisa iniciar o tratamento para o câncer em duas semanas. O objetivo do protocolo de urgência é iniciar a indução da superovulação com as gonadotrofinas em qualquer fase do ciclo menstrual. Dessa forma a paciente não compromete o início do tratamento para o câncer e consegue criopreservar seus oócitos e manter sua capacidade reprodutiva.

A introdução dos agonistas de GnRH no final da década de 80 revolucionou a estimulação ovariana nos tratamentos de Reprodução Assistida, uma vez que ao suprimir a secreção pituitária de gonadotrofinas, consegue prevenir o pico prematuro de LH. Anteriormente à sua introdução, cerca de 20% dos ciclos estimulados tinham que ser cancelados devido a ovulação prematura antes da captação oocitária. Nas últimas duas décadas, o protocolo com agonista de GnRH tem sido o tratamento padrão para estimulação ovariana em Reprodução Assistida.

O agonista do GnRH é usado para promover bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, antes da administração da gonadotrofina. A administração do agonista do GnRH diário é iniciada no 2º ou no 21º dia do ciclo menstrual e continua durante a administração subsequente de gonadotrofinas até o dia da administração do hCG. As gonadotrofinas são iniciadas assim que se confirma o bloqueio da função hipofisária. Sendo assim, podem ser necessárias de 2 a 5 semanas para a estimulação completa e captação dos oócitos, dependendo da fase do ciclo menstrual que a mulher se encontra. O prazo para a estimulação ovariana convencional é inaceitável para muitas pacientes com câncer.

Nos protocolos com antagonista de GnRH, não há necessidade de bloqueio do eixo preliminar e a duração da indução ovariana pode ser reduzida consideravelmente. O antagonista de GnRH previne a liberação prematura do LH, permitindo o contínuo desenvolvimento folicular, sem os efeitos colaterais de hipoestrogenismo ou necessidade de aguardar um longo período para a “down-regulation” associados com o uso de agonistas. O antagonista inibe rapidamente a liberação de gonadotrofinas endógenas ao competir com o GnRH natural pela ligação a receptores na hipófise. Isso permite que seu uso ocorra a qualquer momento do crescimento folicular. A estimulação com gonadotrofina exógena começa na fase folicular precoce do ciclo menstrual.

Objetivos: “Avaliar a possibilidade de induzir o desenvolvimento folicular múltiplo com posterior captação de oócitos maduros, em ciclos de estimulação ovariana iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, em mulheres com câncer que não podem adiar o início do tratamento oncológico.”.

Desenho do estudo: Trata-se de um estudo observacional em que serão analisados o número de oócitos maduros aspirados de mulheres submetidas a estimulação ovariana de urgência (iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual) devido à urgência de se submeter ao tratamento para o câncer.

Métodos: A fase do ciclo menstrual em que se encontram será avaliada pela data da última menstruação, associada a avaliação ultrassonográfica e dosagem sérica de estradiol, LH e progesterona.

As pacientes elegíveis serão submetidas ao protocolo de estimulação com rFSH (hormônio folículo estimulante recombinante) diário. O início do uso será imediato e a dose inicial de rFSH será definida de acordo com a idade da paciente e ajustada de acordo com a resposta ovariana avaliada pela ultrassonografia e pelos níveis de E2.

A monitorização é feita com ultrassonografia endovaginal e dosagem hormonal seriada, realizada a cada 3 ou 4 dias de acordo com a resposta folicular de cada paciente.

O uso do antagonista do GnRH será iniciado quando houver a presença de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14mm e níveis elevados de LH. Seu uso impede o pico de LH, interrompe a sua elevação durante o período de estimulação ovariana controlada e induz a luteólise imediata. O crescimento folicular será monitorizado através de ultrassonografia endovaginal seriada. O hormônio da gonadotrofina coriônica recombinante (rhCG) será administrado quando pelo menos dois folículos atingirem o diâmetro médio de 17mm com níveis concordantes de estradiol.

A captação oocitária será realizada 34-36 horas após a administração do rhCG(250µg) por punção guiada por ultrassonografia vaginal, com a paciente sob analgesia.

Os oócitos maduros captados serão criopreservados através da técnica de vitrificação. Inicialmente os oócitos serão levados em meio de cultura e em seguida em meio de vitrificação por 3 minutos. Depois, novamente em meio de vitrificação por mais 3 minutos. Depois de transcorrido os últimos 3 minutos, serão adicionados 240 mL do meio de estabilização, por mais 9 minutos. Uma segunda etapa será realizada para colocar os oócitos na palheta com o cuidado de colocar o mínimo possível de meio de vitrificação. Cada palheta será feita em um trio de gotas.

Para aquelas pacientes que tiverem parceiros fixos, haverá a opção da criopreservação de embriões (caso desejem) também através da técnica de vitrificação.

Avaliação inicial: 1. Anamnese e Exame Físico; 2. Dosagens laboratoriais de estradiol, progesterona e LH; 3. Ficha de acompanhamento. As pacientes a serem avaliadas são aquelas encaminhadas pelo serviço de Oncologia e/ou Mastologia para se submeterem à criopreservação de oócitos no Centro de Medicina Reprodutiva Origen.

Todos os exames laboratoriais e ultrassonográficos para o acompanhamento da indução, a punção folicular para captação oocitária e a criopreservação dos oócitos maduros serão realizados na Clínica Origen.

Critérios de inclusão/exclusão: Os critérios de inclusão e exclusão foram apresentados na página 16 do projeto.

Riscos/Benefícios: “Considerando que os medicamentos usados para estimulação ovariana propostos para a realização da pesquisa são consagrados na literatura e têm seu uso liberado pelo Ministério da Saúde e que os critérios de inclusão e exclusão acima detalhados serão seguidos, o risco para a paciente é apenas de desenvolver a síndrome de hiperestímulo ovariano. Esse risco é descrito como menor que 1%. Entretanto, como não haverá transferência de embriões a gravidez não ocorrerá, reduzindo ainda mais esse risco.

Com relação aos benefícios, serão aqueles advindos dos resultados da pesquisa.”

Destinação das amostras: Os oócitos congelados serão usados exclusivamente para a própria paciente, sendo fertilizados por sêmen de marido ou parceiro da mesma para posterior transferência dos embriões para o útero. Se a paciente assim desejar, os oócitos poderão ser descartados.

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico. O total de sujeitos de pesquisa é de 20, todos recrutados no centro em tela.

Apresentação do protocolo

Juntamente com as respostas ao Parecer CONEP Nº. 218/2012, os seguintes documentos foram apresentados: Protocolo de Pesquisa na íntegra; Folha de Rosto devidamente preenchida termo de compromisso assinado pela Diretoria da Faculdade de Medicina da UFMG e pelo pesquisador principal; Declaração de apoio institucional da FM/UFMG assinada pela Direção da Unidade; Termo de Compromisso assinado pelos pesquisadores envolvidos, endereço dos currículos dos pesquisadores; Anexo 3 - Declaração de apoio institucional da Origen; Anexo 4 Certificado de acreditação da Origen; Anexo 5 - Parecer consubstanciado de projeto pelo Departamento de Ginecologia e Obstetrícia/UFMG; Termo de Consentimento livre e esclarecido, modificado em 18/05/12; Cronograma; Documento de aprovação do COEP/UFMG.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº. 218/2012, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. A Folha de Rosto informa que o investigador principal do estudo em tela é Selmo Geber. Entretanto, no projeto de pesquisa também consta o nome de Ana Paula Caldeira Brant Campos como pesquisadora responsável. Solicita-se esclarecer quem é de fato o(a) pesquisador(a) responsável pelo estudo. Ressalta-se que, caso se trate de uma pesquisa de pós-graduação, o(a) aluno(a) possui qualificação para assumir o papel de pesquisador responsável, devendo assinar a Folha de Rosto.

Resposta: O Dr. Selmo Geber é o pesquisador responsável pelo estudo. A Dra. Ana Paula Caldeira Brant Campos é aluna de mestrado e será orientada pelo Dr. Selmo Geber neste projeto.

Análise:pendência atendida

2. Em relação ao projeto de pesquisa:
 - a. Solicita-se apresentar uma lista com o significado das abreviaturas utilizadas no documento.

Resposta: Conforme solicitado, incluímos a Lista das abreviaturas utilizadas no documento ao final do Protocolo de Pesquisa (vide anexo 6 - páginas: 25 e 26)

- FOP: Falência Ovariana Prematura
- GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina
- IARC: Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (Internacional Agency for Research on Câncer)
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- INCA: Instituto Nacional do Câncer
- FSH: Hormônio Folículo Estimulante
- Gy: Gray
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- RNA: Ácido ribonucléico
- FIV: Fertilização in vitro
- Min: Minutos
- ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
- LH: Hormônio Luteinizante
- hCG: Hormônio da gonadotrofina coriônica humana
- rFSH: Hormônio Folículo Estimulante recombinante
- E2: Estradiol
- UI: Unidade Internacional
- rhCG: Hormônio da gonadotrofina coriônica recombinante

- DUM: Data da última menstruação
- HGO: História Ginecológica e Obstétrica
- HP: História Progressiva
- HF: História Familiar
- HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica
- AVC: Acidente Vascular Cerebral
- QT: Quimioterapia
- RT: Radioterapia
- PA: Pressão Arterial
- mmHg: milímetros de mercúrio
- Kg: Quilograma
- D: Direito
- E: Esquerdo
- MII: Metáfase II
- MI: Metáfase I
- COEP: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Análise: pendência atendida

- b. A partir das informações fornecidas na introdução do projeto, depreende-se que o protocolo com agonista de GnRH tem sido o tratamento padrão para estimulação ovariana em reprodução assistida, e que a introdução dos antagonistas de GnRH na prática clínica surgiu como uma nova alternativa. Na página 15/25 o pesquisador informa que se trata “*de um estudo observacional em que serão analisados o número de oócitos maduros aspirados de mulheres submetidas a estimulação ovariana de urgência (iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual) devido à urgência de se submeter ao tratamento para o câncer.*”. Além disso, na página 1/3 do TCLE lê-se: “*A sua concordância em participar do estudo significa que você permite que nós utilizemos os resultados obtidos em seu tratamento para análise científica. Isso quer dizer que vamos apenas utilizar os seus dados, como: idade, fase do ciclo em que começou a usar a medicação, dose de medicação utilizada, número de folículos que cresceram, número de óvulos que foram colhidos e congelados. A participação no estudo não irá interferir em nada no tratamento indicado para você e ao qual você será submetida.*”. Entretanto, no item II.3. do projeto – “Descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa (material e métodos, casuística)” – consta que haverá uso do antagonista de GnRH “*quando houver a presença de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14mm e níveis elevados de LH*”. O pesquisador esclarece que o estudo propõe mudança no protocolo de indução, sugerindo que o tratamento utilizado no estudo em tela não corresponde ao padrão para estimulação ovariana normalmente realizado na Clínica Origen. Com base nessas informações, entende-se que **não se trata de estudo observacional**. Solicitam-se esclarecimentos e, caso necessário, adequações no projeto e no TCLE.

Resposta: O projeto em questão trata-se de um estudo observacional, uma vez que o protocolo de antagonista de GnRH não é uma inovação. Ele é usado rotineiramente há mais de 10 anos para tratamento de infertilidade com as Técnicas de Reprodução Assistida. Os antagonistas de GnRH atuam bloqueando os receptores de GnRH na hipófise, impedindo a ligação

com o GnRH endógeno, de maneira a levar ao rápido bloqueio do eixo Hipotálamo-Hipófise-Ovário. Ao contrário do uso do agonista de GnRH, tal bloqueio ocorre em poucas horas após início dos antagonistas, e não está relacionado a uma liberação de gonadotrofinas na fase inicial. Os antagonistas de GnRH são introduzidos quando o folículo dominante atinge o tamanho de 14 mm, sendo usado até a indução da maturação final dos oócitos. Os principais benefícios são: uma redução da dose total de gonadotrofinas e do número de dias necessários para a estimulação; uma redução no risco para a ocorrência da síndrome de hiperestimulação ovariana; e a possibilidade da indução da maturação final com agonista de GnRH. As pacientes incluídas no estudo são aquelas com diagnóstico de câncer, com desejo de preservação da fertilidade e que, por esse motivo irão se submeter a esse tratamento, independentemente do estudo em questão. Devido à urgência em iniciar o tratamento oncológico destas pacientes, não existe tempo hábil para aguardar a fase adequada para administrar o agonista de GnRH e nem esperar o tempo necessário para o bloqueio hipofisário. Desta forma, o protocolo proposto com antagonista do GnRH é o mais adequado para estas pacientes. O nosso objetivo é apenas utilizar os dados obtidos a partir destes tratamentos para posterior publicação científica.

Análise: pendência atendida

- c. Na página 17/25 lê-se: “A pesquisa será suspensa a qualquer momento se novos estudos apresentarem prejuízo para as pacientes com o uso de qualquer medicamento utilizado no presente estudo ou se a qualquer momento perceber-se que as pacientes estão sendo prejudicadas.”. Solicita-se acrescentar ao texto transcrito acima a informação de que, caso a interrupção do estudo seja feita em caráter de urgência, o CEP será comunicado a posteriori, na primeira oportunidade (Resolução CNS 251/97, item III.2. “e”).

Resposta: A informação de que caso a interrupção do estudo seja feita em caráter de urgência, o CEP será comunicado a posteriori, na primeira oportunidade (Resolução CNS 251/97, item III. 2 “e”) foi devidamente acrescentada no local determinado na página 17/26.

Análise: pendência atendida

- d. Na página 18/25 constam as seguintes informações: “Como o tratamento para a preservação da capacidade reprodutiva pela técnica de vitrificação já é realizado de forma rotineira na clínica Origen, não serão necessários recursos específicos para esse projeto. A mudança no protocolo de indução, proposta nesse projeto, não muda os recursos já utilizados rotineiramente. O pesquisador não será remunerado para essa pesquisa. O fato da paciente permitir que seus dados sejam utilizados para a pesquisa não implica que as despesas corram por conta da clínica que fará o tratamento. Assim, o tratamento correrá por conta da paciente.”. Trata-se de aividade de pesquisa, inclusive testando a utilização de antagonistas de GnRH. Dessa forma, cabe ressaltar que, por não se tratar de estudo observacional, não é eticamente aceitável afastar as devidas responsabilidades integrais do patrocinador em relação ao custeio dos procedimentos a serem realizados,

transferindo-o aos sujeitos de pesquisa participantes. Portanto, solicita-se apresentar orçamento financeiro detalhado do estudo, bem como a fonte dos recursos, conforme as exigências do item VI.2.“j” da Resolução CNS 196/96.

Resposta: Conforme explicação dada no item 2.b), trata-se de um estudo observacional. As pacientes incluídas no estudo são aquelas com diagnóstico de câncer, com desejo de preservação da fertilidade e que, por esse motivo irão se submeter a esse tratamento, independentemente do estudo. Sendo assim, o tratamento correrá por conta da paciente, uma vez que a mesma irá apenas permitir que seus dados sejam utilizados na pesquisa. Desta forma, não serão necessários recursos específicos para esse projeto. O processo de estimulação ovariana proposto na pesquisa com antagonista de GnRH é um dos protocolos existentes na Medicina Reprodutiva e já bem estabelecido na literatura desde meados dos anos 90, apresentando resultados semelhantes ao protocolo longo com agonista de GnRH, conhecido como “ protocolo padrão ou clássico”. Nos últimos anos, esse protocolo vem sendo utilizado com mais frequência que o protocolo com agonista do GnRH.

Análise: pendência atendida

- e. Na página 19/25 lê-se: “*no caso de um número muito grande de folículos, (...) ao invés de administrarmos o hCG para deflagrar a maturação oocitária, administraremos o agonista do GnRH que apresenta a mesma taxa de maturação sem o risco da síndrome de hiperestímulo ovariano.*”. Entretanto, no item “II.3. Descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa (material e métodos, casuística)” não há qualquer referência à administração do agonista do GnRH; o pesquisador informa apenas que “*O uso do antagonista do GnRH será iniciado quando houver a presença de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14mm e níveis elevados de LH.*” (grifo nosso). Considerando que o presente estudo tem como objetivo “*Avaliar a possibilidade de induzir o desenvolvimento folicular múltiplo com posterior captação de oócitos maduros, em ciclos de estimulação ovariana iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual*” (grifo nosso), e tendo em vista que a indução com agonista do GnRH deve obrigatoriamente ser realizada em fases específicas do ciclo, solicita-se apresentar justificativa para sua administração.

Resposta: O efeito inicial do agonista de GnRH é um potente estímulo sobre a hipófise (flare-up), desencadeando uma elevação do FSH e do LH. A elevação do LH é suficiente para deflagrar a maturação oocitária. Por isso, pode ser usado em substituição ao hCG para esta função.

Quando o agonista de GnRH é utilizado de forma contínua, por mais de 10 dias, seu efeito é o de bloquear a hipófise (down-regulation). Assim, quando utilizado na fase folicular precoce ou lútea tardia por tempo prolongado induz o bloqueio hipofisário. Como a hipófise já está bloqueada por esse mecanismo de ação, a administração de uma nova dose de agonista de GnRH apenas manterá o bloqueio, não sendo eficaz para deflagrar a maturação oocitária. Nesses casos, é obrigatório o uso do hCG para maturação oocitária. O uso de uma dose única de agonista de GnRH em substituição ao hCG para a maturação final dos oócitos está associado a uma acentuada redução no risco de desenvolvimento da Síndrome do Hiperestímulo Ovariano, sem piora nos embriões formados. Sendo assim, aquelas pacientes da pesquisa que apresentarem um número muito grande de folículos (mais que 20) e por isso com maiores riscos de desenvolverem a

Síndrome de Hiperestímulo Ovariano durante o protocolo de estimulação com antagonista, receberão a dose de agonista de GnRH para maturação oocitária.

Análise: pendência atendida

3. Em relação ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):

- a. De acordo com a Carta Circular N.º. 003/2011/CONEP/CNS, tendo em vista sua vulnerabilidade no momento de adesão a um protocolo de pesquisa, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apondo suas assinaturas na última página do referido Termo. Portanto, solicita-se acrescentar ao TCLE os campos necessários para a obtenção das rubricas.

Resposta: Favor verificar no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), a presença dos campos necessários para obtenção de rubricas em todas as páginas.

Análise: pendência atendida

- b. Na página 1/3 lê-se: *“Para seu tratamento, você será submetida a exames de imagem (ultrassonografias) e exames laboratoriais que não causarão riscos e nem interferirão em seu bem estar.”* (grifo nosso). Cabe ressaltar que, conforme preconiza o item V da Resolução CNS 196/96, *“considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade”*. O item II.8 da mesma Resolução define como risco da pesquisa qualquer *“possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente”*. Desse modo, não é adequado informar ao sujeito de pesquisa que os procedimentos do estudo são desprovidos de riscos. Os riscos existem, ainda que mínimos. Solicita-se retirar o trecho transcrito acima do TCLE.

Resposta: Conforme solicitação, retiramos o trecho *“não causarão riscos e nem interferirão em seu bem estar”*. Favor consultar página 1/3 do TCLE.

Análise: pendência atendida

- c. Ainda na página 1/3 consta a seguinte informação: *“Após a estimulação ovariana, você será submetida a um procedimento de captação dos seus óvulos por via vaginal, guiado por ultrassonografia, em bloco cirúrgico, sob sedação.”*. Solicita-se explicar em linguagem clara e acessível ao sujeito de pesquisa o significado da expressão *“bloco cirúrgico”* (Resolução CNS 196/96, item IV.1).

Resposta: Conforme solicitação, explicamos em linguagem clara o significado de bloco cirúrgico (vide página 1/3 do TCLE):

O bloco cirúrgico é uma unidade dentro do hospital ou de uma clínica composta por várias áreas interligadas entre si, convenientemente preparado, segundo um conjunto de requisitos, a fim de proporcionar ótimas condições para a realização de procedimentos cirúrgicos executados por uma equipe integrada. Nele são realizadas técnicas estéreis para garantir a segurança do paciente quanto ao controle de infecção.

Análise: pendência atendida

- d. Na página 2/3 lê-se: “Você receberá uma cópia deste documento de consentimento que ficará em seu poder.” (grifo nosso). Ressalta-se que, de acordo com o item IV.2.“d” da Resolução CNS 196/96, o TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito de pesquisa ou seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador. Portanto, solicita-se substituir o texto transcrito acima por “Você receberá uma via assinada deste documento de consentimento, que ficará em seu poder.”.

Resposta: Conforme solicitação, substituímos o termo cópia pelo termo via assinada na página 2/3 do TCLE.

Análise: pendência atendida

- e. O TCLE apresenta o endereço e as formas de contato com o Comitê de Ética em Pesquisa responsável pelo acompanhamento da pesquisa. Entretanto, não informa sobre que é o CEP e qual sua função no estudo. Solicita-se adequação.

Resposta: Conforme solicitação, acrescentamos no TCLE as seguintes informações (vide página 2/3 e 3/3 do TCLE):

O COEP (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais) e a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) concederam parecer favorável para a realização deste estudo. O Comitê de Ética Local e a Comissão Nacional de Ética são grupos de pessoas que são compostos por muitos profissionais, incluindo profissionais médicos e não médicos que revisam estudos com o objetivo de proteger os direitos e o bem estar dos participantes.

Caso tenha alguma preocupação ou dúvida com relação à participação neste estudo, entre em contato com: Médico Coordenador: Dr. Selmo Geber CRM: 22188 (Av. do Contorno,7747-Lourdes/Belo Horizonte - Minas Gerais - CEP:30110-051 ; tel (31) 2102-6363).

No entanto, se tiver alguma queixa ou preocupação sobre a maneira como o médico do estudo realizou o estudo, você pode entrar em contato com o responsável pelo COEP: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - Av. Antonio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005 - CEP: 31270-901. BH/MG. Telefax (31)3409-4592 – email: coep@prpq.ufmg.br.

Análise: pendência atendida

- f. De acordo com o preconizado pelos itens III.3.“q”, IV.1.“d”, V.5 e V.6 da Resolução CNS 196/96, deve-se garantir aos sujeitos de pesquisa o direito de assistência integral e indenização pelos danos decorrentes de sua participação no estudo, bem como explicitar as formas de acompanhamento e seus responsáveis. Solicita-se acrescentar essas informações ao TCLE.

Resposta: Conforme solicitado, acrescentamos as seguintes informações no TCLE (vide página 2/3 do TCLE):

Você terá direito à assistência integral durante todo o seu tratamento e à indenização pelos danos decorrentes de sua participação no estudo. A Clínica Origen conta com uma equipe integrada (composta por médicos, enfermeiros, biólogos e psicólogos) que o acompanhará através de consultas e exames clínicos, ultrassonográficos e laboratoriais durante todo o seu tratamento, visando seu conforto e bem estar.

Análise: pendência atendida

Cont. Parecer CONEP nº. 039/2013

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 23 de Abril de 2011.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: ESTIMULAÇÃO OVARIANA PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

Projeto de Pesquisa: “ESTIMULAÇÃO OVARIANA INICIADA EM QUALQUER FASE DO CICLO MENSTRUAL (INDUÇÃO DE URGÊNCIA) COM CAPTAÇÃO DE OÓCITOS MADUROS PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM MULHERES COM CÂNCER E QUE NÃO PODEM RETARDAR O INÍCIO DO TRATAMENTO ONCOLÓGICO”

Você foi convidada a participar do estudo sobre estimulação ovariana para preservação da sua fertilidade. O estudo será realizado pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais com colaboração da clínica Origen sob o comando do Prof Dr. Selmo Geber e da Dra. Ana Paula Caldeira Brant Campos.

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidos vários estudos sobre preservação da fertilidade em mulheres diagnosticadas com câncer devido ao aumento das taxas de sobrevivência destas mulheres e seu desejo de constituir família. Os recentes avanços nas técnicas de Reprodução Assistida permitiram o congelamento dos óvulos destas mulheres para posterior fertilização e implantação no útero.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a possibilidade de captação de óvulos maduros para serem congelados, após estimulação ovariana que será iniciada em qualquer fase do seu ciclo menstrual. Esse estudo vai permitir o congelamento dos seus óvulos sem comprometer o início do seu tratamento para o câncer. Os conhecimentos obtidos poderão ajudar diversas pessoas, mesmo que não haja benefício direto para você neste momento.

A sua concordância em participar do estudo significa que você permite que nós utilizemos os resultados obtidos em seu tratamento para análise científica. Isso quer dizer que vamos apenas utilizar os seus dados, como: idade, fase do ciclo em que começou a usar a medicação, dose de medicação utilizada, número de folículos que cresceram, número de óvulos que foram colhidos e congelados. A participação no estudo não irá interferir em nada no tratamento indicado para você e ao qual você será submetida. Não mudará seu cronograma de tratamento e nem o resultado.

Para seu tratamento, você será submetida a exames de imagem (ultrassonografias) e exames laboratoriais. Para obtenção dos seus óvulos, será necessário o uso de medicamentos para estimulação ovariana por um período de aproximadamente 10 dias. Durante esse período, você será avaliada periodicamente. Os medicamentos podem causar incômodos/efeitos colaterais. Apesar da incidência destes efeitos ser muito baixa, podem ocorrer reações no local da injeção, febre, dor na região baixa do abdome, náuseas, vômitos e ganho de peso. Após a estimulação ovariana, você será submetida a um procedimento de captação dos seus óvulos por via vaginal, guiado por ultrassonografia, em bloco cirúrgico, sob sedação. (O bloco cirúrgico é uma unidade dentro do hospital ou de uma clínica composta por várias áreas interligadas entre si, convenientemente preparado, segundo um conjunto de requisitos, a fim de proporcionar ótimas condições para a realização de procedimentos cirúrgicos executados por uma equipe integrada. Nele são realizadas técnicas estéreis para garantir a segurança do paciente quanto ao controle de infecção). Os riscos do procedimento são muito raros, podendo ser: sangramento vaginal, náuseas e vômitos. Os seus óvulos maduros obtidos serão congelados (criopreservados) para preservação da sua fertilidade.

Rubrica do Paciente:_____ Rubrica do Médico:_____

Os mesmos serão usados exclusivamente para você, sendo fertilizados por sêmen de marido ou parceiro para que os embriões formados sejam transferidos posteriormente para seu útero. Caso deseje, os óvulos poderão ser descartados.

Informamos que você não será obrigada a participar do estudo, independente de qual seja o motivo e que pode desistir da participação na pesquisa em qualquer fase.

Você estará sob os cuidados da equipe médica responsável pelo tratamento durante todo o período e se tiver alguma dúvida com relação ao estudo, poderá recorrer à equipe da pesquisa sempre que julgar necessário. Você terá direito à assistência integral durante todo o seu tratamento e à indenização pelos danos decorrentes de sua participação no estudo. A Clínica Origen conta com uma equipe integrada (composta por médicos, enfermeiros, biólogos e psicólogos) que o acompanhará através de consultas e exames clínicos, ultrassonográficos e laboratoriais durante todo o seu tratamento, visando seu conforto e bem estar.

Todos os detalhes sobre os exames e procedimentos foram devidamente explicados, serão repetidos quando da realização dos mesmos e/ou quando você achar necessário.

Existe outra forma de preservação da fertilidade que é o congelamento de tecido ovariano, que implica em necessidade de procedimento cirúrgico para retirada de fragmento do ovário.

É importante lembrar que sua identificação será mantida em sigilo e que a sua participação é voluntária.

Você será mantida a par dos progressos das pesquisas através de cartas informativas. Os resultados serão publicados em revistas científicas e, desta forma, serão apresentados para você, para a comunidade científica e sociedade em geral.

Esclarecemos ainda que antes, durante e depois da pesquisa não haverá nenhum tipo de benefício financeiro para quem optar por liberar seus dados para a pesquisa.

A clínica Origen conta com um serviço de acolhimento psicológico, caso seja do seu interesse participar. Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos e acompanhamentos que se façam necessários.

Se você optar por participar do projeto, por favor, assine e preencha a seção que segue. Ao assinar este documento você tem o direito de dar sua opinião, de fazer perguntas, além dos demais direitos mencionados acima.

Você receberá uma via assinada deste documento de consentimento, que ficará em seu poder. Nós agradecemos por sua colaboração e interesse em nosso projeto.

Atenciosamente,

Dr. Selmo Geber e Dra. Ana Paula Caldeira Brant Campos

Rubrica do Paciente:_____ Rubrica do Médico:_____

Eu, _____

RG _____, CPF _____

Concordo em participar da pesquisa intitulada “Estimulação ovariana iniciada em qualquer fase do ciclo menstrual (indução de urgência) com captação de oócitos maduros para preservação de fertilidade em mulheres com câncer e que não podem retardar o início do tratamento”, estando ciente dos desconfortos e riscos possíveis assim como dos benefícios esperados.

O COEP (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais) e a CONEP(Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) concederam parecer favorável para a realização deste estudo.O Comitê de Ética Local e a Comissão Nacional de Ética são grupos de pessoas que são compostos por muitos profissionais, incluindo profissionais médicos e não médicos que revisam estudos com o objetivo de proteger os direitos e o bem estar dos participantes.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante

Testemunha

Dr. Selmo Geber

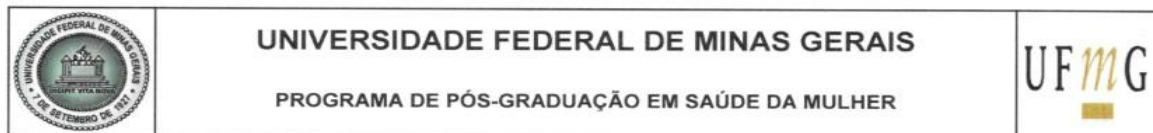
Dra Ana Paula Caldeira Brant Campos

Caso tenha alguma preocupação ou dúvida com relação à participação neste estudo, entre em contato com:

Médico Coordenador: Dr. Selmo Geber CRM: 22188 (Av. do Contorno,7747-Lourdes/Belo Horizonte - Minas Gerais - CEP:30110-051 ; tel (31) 2102-6363)

No entanto, se tiver alguma queixa ou preocupação sobre a maneira como o médico do estudo realizou o estudo, você pode entrar em contato com o responsável pelo COEP: Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - Av. Antonio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005 -CEP: 31270-901. BH/MG. Telefax (31)3409-4592 – email: coep@prpq.ufmg.br.

Anexo 3: Folha de Aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da resposta ovariana após estímulo ovariano controlado, iniciado em qualquer fase do ciclo menstrual, para congelamento de oócitos em mulheres com câncer

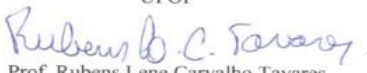
ANA PAULA CALDEIRA BRANT CAMPOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 27 de agosto de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Selmo Geber - Orientador
UFMG


Prof. Jose Helvecio Kalil de Souza
UFOP


Prof. Rubens Lene Carvalho Tavares
UFMG

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2014.

