

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE TECIDO**  
**OVARIANO PARA O PERITÔNIO DE**  
**RATAS APÓS CONGELAMENTO E**  
**DESCONGELAMENTO**

**Luis Felipe Victor Spyer Prates**

**Belo Horizonte - MG**  
**2008**

**Luis Felipe Víctor Spyer Prates**

**TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE TECIDO  
OVARIANO PARA O PERITÔNIO DE  
RATAS APÓS CONGELAMENTO E  
DESCONGELAMENTO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Saúde da Mulher, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Ciência da Reprodução.

**Orientador:** Prof. Dr. João Lúcio dos Santos Júnior

**Co-orientador:** Prof. Dr. Selmo Geber

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Belo Horizonte  
2008**

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitor da UFMG**

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

### **Vice-reitora**

Profa. Heloísa Starling

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof. Jaime Arturo Ramírez

### **Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Francisco José Penna

### **Vice-Diretor da Faculdade de Medicina:**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **Colegiado de Pós-Graduação em Saúde da Mulher**

Prof. João Lúcio dos Santos Júnior  
Prof. Marcos Mendonça  
Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral  
Prof. Aroldo Fernando Camargos  
Prof. Victor Hugo de Melo  
Prof. Henrique Vitor Leite

### **Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Saúde da Mulher**

Prof. João Lúcio dos Santos Júnior

### **Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**

Prof. João Gilberto de Castro e Silva

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Selmo Geber, pela amizade, disposição em esclarecer minhas dúvidas, pelo trabalho de orientar este estudo com seus conhecimentos e o incentivo constante, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. João Lúcio dos Santos Júnior, pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Henrique Vitor Leite, pela amizade e exemplo profissional.

Aos colegas Dr. Felipe Massote e Dr. José Helvécio Kalil, pela valiosa contribuição no levantamento de dados e coleta da amostra.

À querida tia Ló, pela leitura cuidadosa.

Ao meu primo Leo pela discussão estatística.

À minha esposa, Letícia, pela presença paciente.

A todos que me ajudaram e me apoiaram nessa investida.

## RESUMO

Um dos principais problemas enfrentados pela medicina reprodutiva que não foi solucionado até o momento é a incapacidade da preservação de oócitos em pacientes candidatas a tratamento com quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia. Nestes casos, o transplante de tecido ovariano criopreservado poderia, além, de levar à recuperação da capacidade fértil da mulher, servir como alternativa à terapia de reposição hormonal. No intuito de verificar a viabilidade funcional do transplante ovariano autólogo, para o peritônio, após congelamento e descongelamento, 67 ratas Holtzman foram avaliadas e divididas em três grupos. O grupo 1 (n=20) foi submetido a ooforectomia bilateral, o grupo 2 (n=24) foi submetido a laparotomia e inspeção dos ovários e no grupo 3 (n=23) foi realizada ooforectomia bilateral, seguida de congelamento e descongelamento de um dos ovários e posterior transplante para a superfície peritoneal, à esquerda do feixe vasculo-nervoso epigástrico esquerdo. Foi realizada citologia vaginal funcional por um período de 10 dias nos três grupos e análise histopatológica dos ovários transplantados para avaliação da função ovariana. No grupo da ooforectomia, todas as 20 ratas apresentaram um padrão persistente de atrofia na citologia vaginal, compatível com ausência de ciclo estral. No grupo controle, todas as ratas apresentaram citologia vaginal típica de secreção hormonal cíclica (estro). No grupo do transplante, 21 (91,3%) animais apresentaram alterações citológicas compatíveis com o ciclo estral. Após aplicar o modelo de regressão logística, não se verificou efeito significativo, do tipo de intervenção cirúrgica (transplante ou laparotomia e inspeção dos ovários), na probabilidade da ocorrência de ciclos irregulares. Após 40 dias da realização do transplante, os ovários foram retirados e estudados histologicamente. Todos os 23 ovários apresentavam folículos em todas as fases de desenvolvimento, inclusive, grandes folículos antrais, além de corpos lúteos. Com isso, concluiu-se que o transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas, após congelamento e descongelamento, é capaz de restaurar a função endócrina dos ovários e o desenvolvimento folicular adequado, havendo, até mesmo, evidências da ocorrência de ovulação, nos implantes.

**Palavras-chave:** Transplante, ovário, criopreservação, ratas

## SUMMARY

One of the major problem against reproductive medicine is the incapacity of oocyte preservation. In these cases, ovary preservation could restore hormonal e fertility capacity. Objective: Assess the ovarian function after removal of the ovaries, cryopreservation and intraperitoneal autotransplantation. Design: Prospective experimental study involving 67 rats. Materials/Methods: A total of 67 Holtzman rats were randomized to one of the three groups: Group 1 (n 5 20) bilateral oophorectomy, Group 2 (n 5 24) shame operation, Group 3 (n 5 23) cryopreserved ovarian autotransplantation group. The rats in Group 3 had frozen/thawed ovaries replaced to the peritoneum 10 days after freezing with DMSO. Daily vaginal cytology was performed for 10 days starting 7 days after surgery in group 1 and 2, and 15 days after surgery in group 3. Histologic examination of the transplanted frozen/thawed ovarian tissue was performed in all cycling animals 40 days following transplantation. Results: In group 1 none of the animal showed cytologic alterations compatible with estrus. All animals in group 2 were considered as having hormone secretion. Cytologic examination of vaginal smears from group 3 revealed 13 animals with the normal cycle sequence and 8 animals showing alterations compatible with estrus. One animal had 4 days of diestrus and 2 days of metaestrus and another had 3 days of estrus followed by one day of metaestrus and one day of distrus. Morphologic study of the ovaries showed no ischemic or inflammatory alterations and all ovaries showed follicles in different stages of maturation, i.e., viable primordial, antral follicles and corpus luteum. Conclusions: Our study demonstrates that frozen/thawed ovaries transplanted to the peritoneum without vascular anastomosis in rats preserve endocrine and reproductive functions. These findings might encourage the development of human autologous ovarian transplantation protocols for women at increased risk of ovarian failure.

**Key-words:** Transplantation, ovary, cryopreservation, rats

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus centígrados
ACS	<i>American Cancer Society</i>
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FIV	Fertilização <i>in-vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas hipofisárias
Gy	<i>Gray</i>
HCG	Hormônio gonadotrófico humano
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IM	Intramuscular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kg	Kilograma
l	Litro
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas
ml	Militros
mm	Milímetros

µm	Micrômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
pmol	Pico-mol
PVPI	Povidona-iodo
SSS	Substituto sintético de soro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade internacional
US	Ultrassonografia
WHO	<i>World Health Organization</i>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Laparotomia com identificação dos cornos uterinos.....	48
Figura 2 -	Ovários ressecados bilateralmente.....	49
Figura 3 -	Inspeção bilateral dos ovários.....	49
Figura 4 -	Ovários ressecados.....	51
Figura 5 -	Feixe vásculo-nervoso epigástrico.....	52
Figura 6 -	Transplante ovariano.....	53
Figura 7 -	Folículo primordial.....	60
Figura 8 -	Folículo antral.....	60
Figura 9 -	Corpos lúteos.....	60
Figura 10 -	Transplante ovariano após 40 dias.....	61
Gráfico 1 -	Regularidade do ciclo estral nas ratas do grupo controle e transplante após congelamento e descongelamento dos ovários.....	58

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Comparação entre o efeito do transplante ovariano após congelamento/descongelamento e o grupo controle na regularidade do ciclo estral das ratas.....	57
--	----

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	13
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1- Falência ovariana.....	14
2.1.1- Falência ovariana pós-quimioterapia.....	14
2.1.2- Falência ovariana pós-radioterapia.....	15
2.1.3- Falência ovariana após cirurgia.....	16
2.2- Métodos de preservação da função endócrina ovariana.....	18
2.2.1- Ooforopexia.....	18
2.2.2- Análogos do GnRH.....	19
2.2.3- Antagonista do GnRH.....	20
2.2.4- Sphingosine-1-phosphate (Antagonista de apoptose).....	21
2.2.5- Congelamento de embriões.....	21
2.2.6- Criopreservação de oócitos maduros.....	22
2.2.7- Criopreservação de oócitos imaturos.....	23
2.2.8- Criopreservação de tecido ovariano.....	23
2.3- Transplante autólogo e heterólogo de tecido ovariano criopreservado.....	25
2.3.1- Transplante autólogo e heterólogo sem criopreservação em animais.....	26
2.3.2- Princípios da criopreservação.....	29
2.3.3- Congelamento de ovários.....	32
2.3.4- Criopreservação de tecido ovariano e transplante autólogo e heterólogo.	33
2.3.5- Transplante autólogo criopreservado em humanos.....	38
2.3.5.1- Ortotópico.....	39
2.3.5.2- Heterotópico.....	42
2.3.6- Transplante de ovário inteiro com reanastomose vascular.....	44

3- OBJETIVO.....	46
4- METODOLOGIA.....	47
4.1- Desenho de estudo.....	47
4.2- Amostra.....	47
4.3- Métodos.....	48
4.3.1- Procedimento cirúrgico.....	48
4.3.2- Congelamento e descongelamento dos ovários.....	50
4.3.3- Transplante ovariano após congelamento/descongelamento.....	52
4.3.4- Citologia vaginal funcional.....	53
4.3.5- Estudo histológico dos implantes.....	54
4.4- Análise estatística.....	55
4.5- Normalização bibliográfica.....	56
5- RESULTADOS.....	57
6- DISCUSSÃO.....	62
7- CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A.....	84

## 1 – INTRODUÇÃO

A necessidade de preservação dos gametas femininos e o problema da reposição hormonal relacionado à melhor droga, dose e via de administração, indicações e efeitos colaterais são assuntos que vêm sendo discutidos há décadas e que até o momento não apresentam soluções definitivas. O banco de tecido ovariano congelado pode ser uma das alternativas possíveis para atender estas questões e encontra-se em investigação experimental tanto em animais quanto em humanos, ainda em fases iniciais. Ele pode ser uma solução para a preservação da fertilidade em pacientes com câncer, situação em que o tratamento poderá levar à falência hormonal, assim como o que ocorre em pacientes com endometriose grave ou tumores ovarianos benignos. Essa questão torna-se especialmente importante para mulheres solteiras e crianças, nas quais não é possível o uso do congelamento de embriões. Além disso, acredita-se que o transplante ovariano possa restaurar a função endócrina da mulher, sendo uma alternativa à terapia hormonal. Outra possível indicação seria para pacientes que retardam a concepção para um período avançado da vida reprodutiva, quando a reserva ovariana encontra-se diminuída ou esgotada, hoje candidatas a tratamento com doação de oócitos.

Nosso grupo já vem desenvolvendo uma linha de pesquisa nessa área e os resultados iniciais são realmente promissores. Barros et al. (2001) mostraram que o transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas castradas, restaura o ciclo estral desse animal e o desenvolvimento folicular adequado, havendo fortes evidências da ocorrência de ovulação nos implantes. Com esse trabalho estamos, então, dando prosseguimento à linha de pesquisa mencionada, aproveitando que a criopreservação já vem se tornando um procedimento seguro e bem estabelecido.

## **2 – REVISÃO DA LITERATURA**

No ano de 2006, foram estimados 1.399.790 novos casos de câncer nos Estados Unidos, sendo 679.540 em mulheres e 8% disso em mulheres abaixo de 40 anos (Jemal et al., 2006). Estima-se que em 2010, uma em cada 250 pessoas adultas serão sobreviventes de câncer na infância (Blatt, 1999). Os grandes avanços obtidos no diagnóstico e tratamento do câncer em crianças, adolescentes e adultos aumentou a expectativa de vida de mulheres sobreviventes na pré-menopausa, entretanto resultou numa população crescente de adolescentes e adultos curados de neoplasias malignas que experimentarão problemas de infertilidade devido a falência ovariana prematura (Blatt, 1999). Os efeitos das quimioterapias, radioterapias e cirurgias mutiladoras no futuro da fertilidade são matéria de estudos e preocupações das pacientes e de seus familiares.

### **2.1 – FALÊNCIA OVARIANA**

#### **2.1.1 – Falência Ovariana Pós-Quimioterapia**

A quimioterapia, especialmente quando se utilizam agentes alquilantes, é reconhecidamente gonadotóxica. A gonadotoxicidade das drogas varia entre elas, sendo algumas extremamente tóxicas (ciclofosfamida, melphalan, clorambucil, ifosfamida, thiotepa e mostarda nitrogenada) e outras com efeitos mínimos ou nulos sobre a reserva folicular ovariana (Metotrexate, 5-fluoracil, vincristina) (Sonmezer & Oktay, 2004). A perda folicular é também dose dependente, sendo que cada curso de quimioterapia resulta em perda adicional proporcional à reserva (Akar & Oktay, 2005). O risco de falência ovariana aumenta com a idade, simplesmente como consequência da menor

reserva ovariana em mulheres mais velhas (Meirow & Nugent, 2001). Mulheres novas possivelmente não experimentarão falência ovariana imediata com drogas altamente gonadotóxicas, mas eventualmente elas desenvolverão infertilidade e menopausa precoce (Poniatowski et al., 2001). Desse modo, a restauração de ciclos menstruais regulares não garante a fertilidade normal (Demeestere et al., 2007).

Em uma recente revisão, Lobo (2005) mostrou que a chance de gravidez espontânea após o tratamento é de 28% em mulheres abaixo de 20 anos e de apenas 5% em mulheres acima de 25 anos. Além disso, relata que a terapêutica preconizada para o transplante de medula óssea induz falência ovariana em mais de 80% dos casos, mesmo em crianças.

### **2.1.2 – Falência Ovariana Pós-Radioterapia**

A radiação induz dano gonadal através de efeitos citotóxicos diretos e indiretos (formação de radicais livres) no DNA. A dose de radiação calculada para destruir 50% da reserva oocitária é estimada em menos de 2 gray (Gy) (Wallace, 2003). Enquanto um total de 20 Gy pode induzir falência ovariana em mulheres abaixo de 40 anos, uma dose baixa, como 6 Gy, é suficiente para levar à falência mulheres acima de 40 anos. Pacientes que mantêm ciclos regulares, após irradiação pélvica, também não estão livres de desenvolver menopausa precoce (Wallace et al., 1989).

Além da radioterapia pélvica e abdominal utilizada em tumores pélvicos e doença de Hodgkin, a irradiação crânio-espinhal em tumores cerebrais e leucemia linfoblástica aguda e irradiação total usada conjuntamente aos procedimentos de transplante de células tronco também estão intimamente associadas a falência endócrina ovariana. O

fracionamento da dose total permite uma menor toxicidade (Wallace, 2003). E, além do mais, a exposição uterina a doses de irradiação tão baixas quanto 10 Gy pode comprometer a vascularização e musculatura uterina e levar à perda de distensibilidade, tendo como consequência altas taxas de aborto e infertilidade por fator uterino (Wallace et al., 1989).

Algumas condições tidas como benignas podem também levar à perda da função endócrina ovariana em decorrência do tratamento instituído. Doenças como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, a doença de Behçet e outras auto-imunes podem ser tratadas com quimioterapia e/ou radioterapia nos dias atuais (Mattle et al., 2005).

### **2.1.3 – Falência Ovariana Após Cirurgia**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 493.000 novos casos de cânceres do colo uterino no mundo estão estimados para 2008, sendo o tumor que mais acomete as mulheres em idade fértil (WHO, 2008). Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento, onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres (INCA, 2008). A *American Cancer Society* (ACS) preconizou que, em 2007, ocorreriam 22.430 eventos novos em relação aos tumores ovarianos e 11.150 eventos de tumor do colo uterino (ACS, 2008).

Já, no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 18.680 novas ocorrências de câncer de colo, em 2008, representando 19 para cada 100.000 mulheres. É o tumor mais incidente, em mulheres na região Norte, com incidência de 22:100.000. Na região sudeste

brasileira, é o terceiro em frequência, com 17 casos novos em cada grupo de 100.000 mulheres. Importante ressaltar que, nessas estatísticas, não estão sendo computados os cânceres de pele não-melanoma. A incidência do câncer de colo de útero torna-se mais evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente entre 45 e 49 anos, dados que esclarecem a importância de sua consequência sobre a fertilidade feminina (INCA, 2008).

Pacientes jovens podem, nessas situações, ter seus ovários retirados cirurgicamente como alternativa terapêutica. Além dos casos de câncer, algumas doenças benignas como cistos ovarianos extensos, de natureza progressiva e/ou recorrentes semelhante ao que ocorre em alguns casos de endometriose, cistos mucinosos e teratomas podem ter indicação de ooforectomia bilateral, o que levaria à perda da função endócrina ovariana e de 100% da reserva folicular. (Sonmezer & Oktay, 2004).

Sklar et al. (2006) estudaram 2.819 sobreviventes femininas de tumores e as compararam com 1.065 de suas irmãs, em relação à ocorrência de menopausa prematura. Observaram que esta ocorreu em 126 mulheres que sobreviveram ao tumor e em 33 no grupo das irmãs (controle). Entre estas, a ooforectomia cirúrgica foi verificada em 61 (48%) e em 31 (94%) mulheres dos dois grupos, respectivamente. Entretanto, viram que a incidência cumulativa de menopausa prematura não-cirúrgica é de 8% nas sobreviventes do 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. Daí, conclui-se que a menopausa não cirúrgica é mais frequente nas sobreviventes de tumores malignos e que, em mulheres em idade fértil que têm menopausa precoce, a castração cirúrgica responde por 98%.

Em crianças e adolescentes, estima-se a ocorrência de 2,6 casos de massas anexiais a cada 100.000 mulheres e a prevalência de 4,2 a 9,6% de tumores malignos. Dados da literatura mostram que mesmo pacientes que são submetidas a ooforectomia unilateral por patologia benigna ainda apresentam risco de 3 a 15% de torção ou neoplasia no ovário residual (Bristow et al., 2006).

## **2.2 – MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DA FUNÇÃO ENDÓCRINA OVARIANA**

A primeira opção para preservação da função ovariana e fertilidade futura será a utilização de drogas menos gonadotóxicas e menores doses possíveis de radioterapia. Não sendo isso possível, deve-se partir para alternativas que visem diminuir a ação dos quimioterápicos e da radiação nos ovários. Isso inclui a transposição dos ovários ou ooforopexia, a utilização concomitante aos quimioterápicos de agonistas e/ou antagonistas dos hormônios liberadores das gonadotrofinas hipofisárias (GnRH) (Demeestere et al, 2007) e novas drogas antagonistas da apoptose – *Sphingosine-1-Phosphate* (Kim, 2006).

### **2.2.1 – Ooforopexia**

Na ooforopexia, os ovários são retirados do campo de irradiação, evitando, assim, os efeitos diretos da radiação ionizante. A transposição dos ovários tem sido utilizada por décadas, com o objetivo de preservar a função ovariana. Antigamente, era feita conjuntamente à laparotomia para estadiamento na doença de Hodgkin ou à histerectomia radical no câncer de colo uterino. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de videolaparoscopia, esse tem sido o procedimento de escolha, devido à sua simplicidade, segurança e efetividade (Kim, 2006). A eficácia na prevenção da falência

ovariana nunca foi muito boa, variando nos estudos entre 16 e 90 %. Essa grande variação é devido às diferentes doses utilizadas, ao grau de comprometimento da vasculatura, à idade da paciente e à concomitância ou não de quimioterapia (Bisharah & Tulandi, 2003). Diversas complicações são associadas ao procedimento, diminuindo ainda mais sua efetividade e incluem: isquemia da trompa, dor pélvica crônica, formação de cistos ovarianos e migração dos ovários de volta à sua posição original antes do início da radioterapia (Meirow & Nugent, 2001). Quando a ooforopexia é realizada, a gravidez espontânea torna-se inviável, a não ser que seja realizado um novo procedimento cirúrgico. Assim, como essas pacientes necessitarão de Fertilização *In Vitro* (FIV) no futuro, a coleta de oócitos será um grande desafio. Desse modo, pacientes candidatas à transposição devem ser cuidadosamente escolhidas, analisando-se as diversas variáveis que podem afetar o resultado final. Finalizando, nunca se deve indicar o procedimento a pacientes que serão submetidas à quimioterapia conjuntamente à radio (Sonmezer & Oktay, 2004).

### **2.2.2 – Análogos do GnRH**

Considerando a possibilidade de preservação da função testicular em homens submetidos a quimioterapia nos quais foi realizada supressão gonadal e na premissa que garotas pré-púberes são menos afetadas pela gonadotoxicidade dos quimioterápicos, foi aventada a hipótese de que a supressão ovariana pode ser protetora (Kim, 2006). Estudos realizados em animais demonstraram menor perda de folículos primordiais quando foi utilizado o análogo em animais submetidos à quimioterapia (Blumenfeld, 2007). Entretanto, falhou em mostrar os mesmos benefícios quando os animais foram submetidos à radioterapia (Sonmezer & Oktay, 2004). Em humanos, Blumenfeld et al. (1996) demonstraram

claramente os efeitos benéficos da utilização do GnRH: no grupo tratado com o análogo, 15 de 16 pacientes (94%) reassumiram ciclos menstruais regulares entre 3 e 8 meses após o fim da quimioterapia, enquanto no grupo controle 61% apresentou falência ovariana. Já no estudo de Waxman (1987), não houve benefício com o uso do análogo, já que, após 3 meses de seguimento, 4 de 8 mulheres no grupo tratado e 6 de 9 no grupo controle ficaram amenorréicas. Em estudo publicado recentemente, Blumenfeld et al. (2008) mostraram novamente os benefícios da utilização do GnRH. No grupo que recebeu o GnRH, menos de 7% desenvolveu amenorréia hipergonadotrópica irreversível, ao passo que todas as outras voltaram a ter ciclos menstruais regulares, além de 33 terem engravidado espontaneamente 46 vezes. Alguns estudos randomizados fase III se encontram em andamento e irão, provavelmente, resolver a questão a respeito do uso de agonistas de GnRH na preservação da função ovariana e fertilidade em mulheres jovens na menacme, expostas à quimioterapia gonadotóxica (Blumenfeld, 2007).

### **2.2.3 – Antagonista do GnRH**

Tem sido sugerido que novos estudos devem avaliar os antagonistas do GnRH, ao contrário dos agonistas, com o objetivo de se conseguir uma dessensibilização hipofisária mais rápida, eliminando a necessidade de aguardar os 7-14 dias que os segundos levam para provocar o bloqueio hipofisário (Kim, 2006). Meirow et al. em 2004 realizaram um estudo com animais, com o objetivo de testar o efeito protetor do Cetrorelix contra a ciclofosfamida e demonstraram que este existe, mas é dose dependente, diminuindo com o aumento da dose do quimioterápico. Outro estudo concluiu que, apesar dos efeitos benéficos conhecidos com os agonistas, os antagonistas de GnRH não conseguiram proteger o ovário dos efeitos danosos da ciclofosfamida

(Danforth et al., 2005), colocando em dúvida a afirmação de que os antagonistas poderão, num futuro próximo, substituir os agonistas na proteção ovariana contra quimioterapia gonadotóxica (Blumenfeld, 2007).

#### **2.2.4 – Sphingosine-1-Phosphate (Antagonista de Apoptose)**

Os oócitos possuem intrinsecamente um mecanismo de apoptose que pode ser ativado por diversos estímulos, entre eles radiação e quimioterapia. Na teoria, então, a morte oocitária poderia ser evitada se o programa de apoptose pudesse ser inativado. Em estudo com ratos, a supressão da depleção de *pools* de folículos imaturos foi obtida com uma única injeção na bursa ovariana de *Sphingosine-1-Phosphate*, 2 horas antes da irradiação (Morita et al., 2000). Outro estudo (Paris et al., 2002) demonstrou que a proteção à radiação que ocorre devido a *Sphingosine-1-Phosphate* não está associada à propagação de danos genômicos a nível anatômico, histológico, bioquímico ou citológico, promovendo, assim, credibilidade prospectiva à utilização da droga. Apesar de ser uma droga promissora na preservação da função ovariana e da fertilidade após quimioterapia e irradiação, sua eficácia e aplicabilidade prática em humanos ainda precisa ser testada (Kim, 2006; Blumenfeld, 2007).

#### **2.2.5 – Congelamento de Embriões**

O único método estabelecido até o momento e rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução assistida é a criopreservação de embriões, mas essa opção requer estimulação ovariana, coleta de oócitos e fertilização *in vitro*, o que pode levar entre 2-5 semanas. Assim, o atraso no início do tratamento quimioterápico para o armazenamento de

embriões não é factível para algumas pacientes e pode ser, até mesmo, um risco em alguns tipos de câncer. Mais ainda, esse método não deve ser considerado uma opção em garotas pré-puerperais e é frequentemente inaceitável por mulheres que não possuem parceiro fixo e naquelas que não desejam utilizar espermatozóide de doadores (Kim, 2006). Além disso, a estimulação não deve ser feita em mulheres que apresentam tumores hormônio dependentes, como o câncer de mama, apesar de terem surgido novos protocolos de estimulação com o uso do Tamoxifeno e de inibidores da aromatase (Letrozole), mostrando resultados animadores (Oktay et al., 2005). Desse modo, o congelamento de embriões deve ser considerado como primeira opção na preservação da fertilidade em mulheres com parceiro fixo e com disponibilidade para ser submetida a pelo menos um ciclo de FIV (Donnez et al., 2006).

#### **2.2.6 – Criopreservação de Oócitos Maduros**

Outra alternativa é a criopreservação de oócitos, que pode ser utilizada em mulheres sem parceiro sexual definido e que tenham condições de serem submetidas a um ciclo de estimulação ovariana antes do início da quimioterapia (Jain & Paulson, 2006). Apesar do primeiro nascimento ocorrido a partir de oócitos congelados ter sido relatado em 1986 por Chen e das altas taxas de sucesso obtidas com o congelamento de embriões e espermatozoides, os resultados obtidos, a partir de FIV após oócitos descongelados, eram ruins, com baixas taxas de sobrevivência, de fertilização e de gravidezes (Sonmezer & Oktay, 2004). Entretanto, a partir de significativa melhora obtida nas técnicas de congelamento e descongelamento, houve um pequeno incremento nas taxas de sobrevivência de oócitos congelados/descongelados e até de gravidezes (Borini et al., 2004). Uma revisão de estudos realizada em 2004 mostrou uma taxa de sobrevivência média de 47%, uma taxa

de fertilização média de 52,5% e de gravidez por oócito descongelado de 1 a 5% (Sonmezer & Oktay, 2004). Meta-análise publicada por Oktay et al. (2006a) mostrou: taxa de nascimento por oócito descongelado variando de 1,9 a 2,0%; taxa de nascimento por oócito injetado de 3,4% e por embrião transferido de 21,6%. As novas tecnologias adotadas que possibilitaram essa melhoria incluem: aumento na concentração de sucrose, tempo de descongelamento mais lento e equilibrado e uso de meios com depleção de sódio, além da técnica de vitrificação (Donnez et al., 2006). Pode ser considerado um método promissor, mas ainda assim apresenta baixas taxas de sucesso.

### **2.2.7 – Criopreservação de Oócitos Imaturos**

Esse método surgiu como uma alternativa ao congelamento de oócitos maduros, pois se acredita que por serem mais indiferenciados, não possuem um fuso tão delicado que possa ser lesado e terem cromossomos protegidos por uma membrana nuclear, sejam mais resistentes ao processo. Entretanto, parece ser problemático em termos de sobrevivência e maturação até metáfase II. Esse método não será válido até que a maturação do oócitos *in vitro* se torne corriqueira (Kim, 2006). Até o momento, apenas algumas gravidezes foram relatadas na literatura com o uso de oócitos imaturos (Wu et al., 2001)

### **2.2.8 – Criopreservação de Tecido Ovariano**

A criopreservação de tecido ovariano é a única opção disponível para garotas pré-púberes e para mulheres em que não é possível postergar o início da quimioterapia. O congelamento de tecido ovariano foi feito, até o momento, por três técnicas: ovário

inteiro com pedículo vascular, fragmentos do córtex ovariano e folículos isolados. Até o momento, a maioria das pesquisas animais e em humanos concentra-se em métodos de congelamento e transplante de fragmentos do córtex avascular, sendo que essa técnica foi a única que possibilitou a ocorrência de nascimentos em humanos até o momento (Donnez et al., 2006).

A criopreservação de tecido ovariano apresenta diversas vantagens e traz menos dilemas éticos. Nesse método, centenas de oócitos imaturos podem ser preservados sem necessidade de estimulação. Estes são menores, quiescentes, não apresentam zona pelúcida, nem grânulos corticais. Realmente, a preservação do tecido ovariano através de congelamento/descongelamento tem se mostrado um sucesso em animais, mas existe ainda a questão de como desenvolver esses folículos imaturos armazenados no tecido congelado e permitir a fertilização.

Teoricamente, existem três estratégias que permitem o desenvolvimento dos folículos: transplante autólogo/heterólogo, transplante xenólogo e cultura *in vitro*.

A estratégia mais desejada seria a que permitisse o desenvolvimento de um meio que possibilitasse o crescimento e maturação *in vitro*, considerando a ausência de novos procedimentos cirúrgicos, melhor acompanhamento do desenvolvimento e risco zero de transmissão de células cancerosas (Shaw et al., 1996). Apesar de já ser possível isolar folículos primordiais de tecido ovariano humano, não se obteve sucesso na sua maturação *in vitro*. Estudos em ratos nesse sentido são promissores, mas, se esse sucesso poderá ser transportado para humanos, ainda é uma incógnita (Sonmezer & Oktay, 2004).

O Xeno-transplante de tecido ovariano humano em ratos imunodeficientes, com o crescimento e maturação de folículos nestes, mostrou ser essa uma técnica eficaz de desenvolvimento de folículos imaturos armazenados em tecido ovariano congelado (Oktay et al., 1998). Em estudo recente, Kim et al. (2005) avaliaram a integridade de oócitos humanos obtidos após transplante xenólogo para ratos imunodeficientes e maturação in-vitro do complexo cúmulo-oocitário. Através de análise imunocitoquímica de micro-túbulos e DNA, alguns oócitos apresentaram-se com anormalidades nucleares e maturação citoplasmática. Além disso, a possibilidade de infecção viral trans-espécies, além de questões éticas e de segurança, ainda impedem seu uso na prática clínica (Kim, 2006).

### **2.3 – TRANSPLANTE AUTÓLOGO E HETERÓLOGO DE TECIDO OVARIANO CRIOPRESERVADO**

Apesar de diversas tentativas terem sido realizadas durante 100 anos, não foi possível proceder ao congelamento de células vivas até que o primeiro crioprotetor, glicerol, foi descoberto em 1948 em Londres (Kim, 2006). Assim, nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Em 1956, Parkes mostrou a restauração da função endócrina após transplante autólogo de ovário em ratas. Devido à falta de aplicabilidade clínica, esse método de preservação da fertilidade ficou somente no campo das pesquisas por aproximadamente 30 anos, até que em 1994, Gosden et al. obtiveram sucesso restaurando a fertilidade em ovelhas após transplante autólogo de tecido ovariano congelado/descongelado e mostraram novas perspectivas, especialmente como estratégia para preservar a função ovariana em mulheres com

câncer. Dez anos depois, em 2004, foi descrito o primeiro nascimento após a realização de transplante ortotópico de tecido ovariano humano congelado/descongelado de uma mulher que teve linfoma de Hodgkin (Donnez et al., 2004).

### **2.3.1 – Transplante Autólogo e Heterólogo sem Criopreservação em Animais**

Vários estudos utilizaram o transplante ovariano fresco para diversos sítios anatômicos, no intuito de testar a viabilidade funcional desse tecido.

Um dos primeiros estudiosos foi Parkes (1956), que realizou transplante de metades de ovários de ratas para o tecido subcutâneo das próprias ratas. Ele verificou função endócrina dos implantes após 12-13 meses em todas as 18 ratas submetidas a transplante autólogo.

Deanesly (1956), em um trabalho realizando o mesmo tipo de transplante subcutâneo de tecido ovariano em ratas, mostrou evidência histológica de ovulação em 31 das 38 ratas submetidas a transplante autólogo.

O trabalho mais importante nessa época foi o de Goding et al. (1967), que desenvolveu um estudo com 14 ovelhas realizando transplante ovariano autólogo com reanastomose vascular para a região cervical. Eles mostraram desenvolvimento folicular, através de histologia, em 3 animais, comportamento estral em 2 animais, secreção espontânea de progesterona em 4 animais e após o uso de gonadotrofinas em mais 1 animal.

Durante as décadas de 60, 70 e 80 os estudos continuaram, sendo que quase todos mostram evidências de retorno da função ovariana (Barros, 2000). Nos anos 90, os estudos se intensificaram com os diversos trabalhos corroborando o sucesso da técnica.

Dissen et al. (1994), em um experimento com ratas, realizaram transplante autólogo de ovário fresco, sem reanastomose vascular, para a região cervical, próximo às veias jugulares. Os autores verificaram revascularização profusa em 48 horas e controle da secreção de gonadotrofinas em uma semana após o transplante.

Tobias et al. (1994) verificaram, através de um estudo com ratas, os efeitos do transplante ovariano na perda óssea após ooforectomia. Os transplantes levaram ao retorno dos ciclos estrais na quase totalidade das ratas transplantadas e o volume do osso trabecular não diferiu do grupo controle.

Von Eye Corletta et al. (1998) verificaram produção estrogênica estral em 8 de 9 ratas submetidas a transplante subcutâneo autólogo de ovário inteiro fresco e em 8 de 9 ratas submetidas a transplante de fragmentos de tecido ovariano frescos, para o mesmo sítio. No grupo onde o ovário inteiro foi transplantado, foram encontradas, à histologia, alterações isquêmicas significativas em 6 dos 9 implantes e no grupo onde foi transplantado fragmento de tecido ovariano, em apenas 1 dos 9 implantes.

Barros et al. (2001) demonstraram que transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas castradas, restaura o ciclo estral desse animal e o desenvolvimento folicular adequado. Há fortes evidências da ocorrência de ovulação nos implantes, demonstrando a viabilidade dos tecidos ovarianos reanastomosados sem

anastomose vascular, em superfície peritoneal. Àquela época disseram que este seria um procedimento de grande valia, uma vez que a criopreservação ovariana se tornava um procedimento com metodologia bem estabelecida.

Novamente em nosso meio, Alberti et al. (2002) em estudo conduzido com ratas Wistar concluíram que o implante autólogo de ovários fatiados no omento maior mantém a função endócrina ovariana preservada, avaliada a partir de esfregaços vaginais.

O mesmo grupo em 2006, mas agora em estudo com coelhos, mostrou que o transplante alogênico ortotópico de ovários inteiros ou fragmentados sem pedículo vascular preserva a função endócrina ovariana e a fertilidade (Petroianu et al., 2006).

Yang et al. (2006) utilizaram modelo experimental em ratas para avaliar qual o melhor local para transplante de tecido ovariano (bursa ovariana, cápsula renal e subcutâneo). Todos os sítios levaram ao desenvolvimento de embriões e taxas comparáveis de implantação, entretanto há influência destes no número e qualidade dos oócitos produzidos.

Um caso de gravidez após transplante de tecido ovariano fresco em macaca (Lee et al., 2004) foi descrito. Tecido ovariano fresco foi transplantado heterotopicamente para sete macacas rhesus, seus oócitos foram coletados e fertilizados e quatro embriões transferidos para quatro diferentes receptoras. Dos três sítios heterotópicos (braço, abdome e rim), a parede abdominal foi a que mostrou o melhor desenvolvimento folicular.

### 2.3.2 – Princípios da Criopreservação

Para se manterem viáveis após longo período de estocagem, as células vivas devem ser colocadas num estado de inativação, no qual podem permanecer durante um longo período e do qual podem ser trazidas de volta à atividade em algum ponto no futuro. A temperatura normalmente utilizada para estocagem de células em mamíferos é  $-196^{\circ}\text{C}$ , que corresponde à temperatura do nitrogênio líquido. Nessas baixas temperaturas, a água existe apenas no estado sólido e não há conhecimento de qualquer reação biológica (Jain & Paulson, 2006).

Considerando que os tecidos biológicos se encontram na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e nenhuma atividade biológica ocorre na temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ , os maiores danos durante a criopreservação encontram-se durante as transições de temperatura: no congelamento até  $-196^{\circ}\text{C}$  e no descongelamento até  $37^{\circ}\text{C}$ .

Quando a água é levada a temperaturas menores que seu ponto de solidificação, ocorre a formação de estruturas cristalinas, conhecidas como gelo e, considerando que o gelo é menos denso que a água, ele ocupa um maior volume quando é formado. Assim, quando o líquido adjacente às células se solidifica, sua expansão leva a aumento da pressão e compressão de organelas intracelulares, podendo causar considerável dano. Portanto, evitar a formação de cristais de gelo parece ser um dos principais objetivos para permitir a criopreservação.

À medida que há a transformação de líquido para sólido, os solutos dissolvidos no líquido são excluídos do estado sólido, diminuindo, assim, o ponto de solidificação do

restante da solução ainda não congelada. E quanto mais a temperatura cai e o gelo se expande, maior se torna a concentração de eletrólitos e outros solutos. Essas altas concentrações podem ser extremamente tóxicas às proteínas intracelulares e, assim, evitar a formação dessa solução seria outro objetivo para permitir o sucesso da criopreservação.

Já durante o descongelamento, o gelo derrete-se e libera água, levando a um decréscimo da osmolaridade da solução em volta. Quando o descongelamento é lento, corre-se o risco da água que se descongela recristalizar, causando novos danos. Já quando o descongelamento é rápido, a queda brusca na pressão osmótica extracelular pode levar a rápidas mudanças na água intra e extracelular, levando à distensão e danos sobre esta (Choque extracelular). Esse seria o terceiro problema a ser evitado para obter sucesso na criopreservação.

Assim, a simples imersão de tecidos no nitrogênio líquido não possibilita sucesso na criopreservação. Todos os métodos possíveis devem evitar as três questões levantadas acima e, até o momento, todas as técnicas disponíveis utilizam os crioprotetores como adjuvantes para evitar o dano celular.

Os crioprotetores permeáveis (Propileno-glicol, etileno-glicol, glicerol e dimetil-sufóxido), ao adentrarem as células, formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água, prevenindo a formação de cristais. Em baixas concentrações, eles diminuem a temperatura de congelamento. Já em altas concentrações, eles inibem a formação dos cristais de gelo e permitem o desenvolvimento de um estado sólido chamado vitrificado, no qual a água é solidificada, mas não se expande. Além disso, eles também protegem as

células das altas concentrações intracelulares de solutos, pois eles permanecem na solução, efetivamente diluindo os eletrólitos remanescentes (Jain & Paulson, 2006). Esse efeito se baseia na regra que diz que, num sistema com duas fases (líquido e sólido) numa dada pressão, a concentração total de soluto na fase líquida é constante para uma dada temperatura (Friedler et al., 1988). Assim, à medida que a água se solidifica, a solução remanescente vai conter progressivamente maiores concentrações de eletrólitos e crioprotetores e, como essa concentração deve ser sempre constante, quanto maior a concentração de crioprotetores, menor a de eletrólitos. Desse modo, a presença do crioprotetor na solução efetivamente dilui os eletrólitos e diminui sua toxicidade.

Já os crioprotetores impermeáveis (sacarose e trehalose) agem sugando o excesso de água intracelular, levando à desidratação da célula e, quando em conjunto com os permeáveis, aumentando a concentração desses últimos no espaço intracelular. Além disso, eles desempenham importante papel durante o descongelamento. Durante esse processo, a água gerada pelo derretimento do gelo diminui a pressão osmótica extracelular. O choque extracelular pode ocorrer se o crioprotetor intracelular não puder se difundir rápido o suficiente para prevenir o afluxo de água, o inchaço e conseqüentemente a ruptura da célula. Assim, a maioria dos protocolos de descongelamento utiliza um crioprotetor não permeável para evitar que isso ocorra.

O método de congelamento lento, inicialmente, utiliza baixas concentrações de crioprotetores enquanto as células ainda estão à temperatura ambiente e possuem metabolismo e isto está associado a menor toxicidade. (Jain & Paulson, 2006). Geber et al., (2002) descreveram a seguinte técnica para ser utilizada durante o processo de congelamento lento utilizando uma máquina de congelamento: inicialmente, a

temperatura deve ser reduzida em 2°C por minuto até atingir a temperatura de -9°C, quando deve ser realizado o *seeding* (formação de gelo extracelular com entrada do crioprotetor) e a temperatura mantida por 10 minutos. Em seguida, as rampas deverão ser de: 3°C por minuto até -40°C e 10°C por minuto até atingir -140°C, quando os tubos serão levados para os *racks* e inseridos em nitrogênio líquido a -196°C. Durante o descongelamento, uma rápida transição de temperatura é desejável com o objetivo de prevenir a recristalização da água que poderia ser potencialmente danosa à célula.

### **2.3.3 – Congelamento de Ovários**

A criopreservação do tecido ovariano através da técnica de congelamento lento e descongelamento rápido tem obtido melhores resultados nos últimos anos, mas ainda não é o ideal. Ao contrário do congelamento de células únicas, o congelamento de tecido é muito mais difícil, visto que há uma grande quantidade de diferentes células (Kim, 2006). O maior dano que ocorre durante o processo é a formação intracelular de cristais e aumento da concentração de sais e, normalmente, a fase em que isso ocorre é durante o congelamento entre -10°C e -40°C. Newton et al. (1996) postularam que, com o objetivo de diminuir a injúria, a taxa de congelamento deveria ser rápida o suficiente para diminuir a exposição das células a altas concentrações intracelulares de eletrólitos e lenta o suficiente para desidratar as células e evitar a formação de cristais. A escolha do crioprotetor com a máxima permeabilidade e mínima toxicidade e potencial de formação de cristais deve ser específico para cada célula e tipo de tecido (Fuller & Paynter, 2004). De acordo com Hovatta (2005), o método padrão para a criopreservação de tecido ovariano deve ser o congelamento lento e programado usando meio contendo albumina humana associado ao propanediol, dimetilsufóxido ou etileno-glicol como crioprotetor e

combinado ou não à sucrose. Com essa metodologia, as melhores taxas de sobrevivência de folículos obtidos de tecido congelado têm ficado em torno de 70 – 80% (Newton et al., 1996).

#### **2.3.4 – Criopreservação de Tecido Ovariano e Transplante Autólogo e Heterólogo**

Os pioneiros no transplante ovariano pós criopreservação demonstraram a capacidade de preservação dos folículos levando à restauração da função ovariana endócrina e fértil. E, apesar dos primeiros esforços na realização dessas pesquisas, a técnica de criopreservação foi abandonada até os anos 1990 devido à falta de crioprotetores efetivos e máquinas automatizadas de criopreservação. Durante os anos 60 o único crioprotetor disponível era o glicerol, que não se mostrou efetivo para congelar ovários (Akar & Oktay, 2005).

Deanesly (1954), realizando transplantes heterólogos de metades de ovários de ratas de 7 dias para o subcutâneo de ratas adultas ooforectomizadas, sem reanastomose vascular, mostrou, através de citologia vaginal funcional seriada, o retorno do ciclo estral em torno de 15,7 dias para os fragmentos congelados a  $-79^{\circ}\text{C}$  por uma hora, e de 12,4 dias para os fragmentos não congelados.

Green et al. (1956), realizando transplante subcutâneo autólogo de tecido ovariano em 90 ratas, fresco e após congelamento, estudou o número de oócitos nos implantes com intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 20 e 30 dias após o transplante. Foram encontradas diferenças significativas, variando de 260 a 610 oócitos no grupo onde se utilizou tecido ovariano fresco e de 13 a 46 oócitos no grupo onde se utilizou tecido ovariano após congelamento.

Harp et al. (1994) verificaram 75% de retorno à ciclicidade, em camundongos, após transplante de tecido ovariano submetido a congelamento a  $-196^{\circ}\text{C}$  e utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor, resultado semelhante ao verificado com o transplante de tecido ovariano fresco, do grupo controle.

Cox et al. (1996) obtiveram 100% de restauração da ciclicidade de camundongos adultos ooforectomizados, após transplante de tecido ovariano homólogo (fetos de camundongos) congelado.

Guanasena et al. (1997) obtiveram gestações em todas as 12 fêmeas de camundongos submetidas a transplante autólogo de ovário fresco e em 8 das 11 fêmeas submetidas a transplante autólogo de ovário após congelamento. Os transplantes eram realizados para a própria bursa ovariana, sem reanastomose vascular.

Candy et al. (2000) transplantaram ovários frescos e congelados de camundongos. Doze das 13 camundongos fêmeas que receberam ovário fresco e 10 de 12 que foram transplantadas com ovários congelados recuperaram a função ovariana, demonstrada através de ciclicidade estral na citologia vaginal e cortes histológicos dos ovários, mostrando que a criopreservação não afeta a viabilidade do tecido ovariano.

Liu et al. (2000) mostraram que é possível a maturação de folículos primordiais de camundongos através de uma combinação de transplante e maturação *in vivo* e cultura *in vitro*. Após 2 semanas do transplante, 26 fragmentos de ovário foram recuperados, dos quais quatro foram submetidos a análise histológica e mostraram desenvolvimento

folicular normal. Os outros 22 fragmentos foram utilizados para o isolamento de folículos pré-antrais, que se mostrou factível.

Shaw et al. também em 2000 mostraram que é possível restaurar a fertilidade após transplante de tecido ovariano descongelado para a bursa de camundongos fêmeas previamente ooforectomizadas. Todas as fêmeas transplantadas apresentaram ciclos estrais regulares. Quatro delas ficaram grávidas após serem colocadas junto com machos e todos os recém nascidos eram aparentemente normais.

Em 2001, novamente Liu et al. publicaram estudo mostrando a maturação *in vitro* de oócitos imaturos captados a partir de folículos desenvolvidos em fragmentos de tecido ovariano criopreservado transplantado em camundongos. O transplante de tecido ovariano congelado foi feito na cápsula renal de ratas. Após o crescimento inicial de folículos primordiais e coleta dos oócitos que foram maturados, foi realizada a fertilização *in vitro* dos mesmos. Setenta e cinco por cento desses oócitos fertilizaram e, destes, 79,7% progrediram até o estágio de blastocisto, que foram transferidos e resultaram em nascimentos.

Lee et al. (2005), utilizando tecido ovariano fresco e congelado, realizaram transplante autólogo para o subcutâneo de camundongos. Ambos os transplantes sobreviveram em 14 de 16 ratas, sendo morfologicamente normais e contendo folículos em todas as fases da foliculogênese. Um total de 73% de folículos frescos e 62% de congelados sobreviveu após o transplante. Dezesesseis ratas foram submetidas a superovulação, obtendo-se 56 oócitos de folículos antrais retirados de tecido ovariano congelado e implantado no

subcutâneo. Quatorze oócitos encontravam-se em metáfase 2, seis foram fertilizados e dois progrediram até blastocisto.

Gosden et al. (1994), em um estudo com ovários de ovelhas, mostrou que a criopreservação é possível em espécies de maior porte. A camada cortical dos ovários direitos de 6 ovelhas foi cortada em pequenas fatias, sendo que duas fatias foram implantadas imediatamente para o pedículo ovariano direito e as restantes congeladas a -196o C, utilizando o dimetilsulfóxido como crioprotetor. Duas fatias descongeladas foram auto-transplantadas para o pedículo ovariano esquerdo, após 3 semanas quando era realizada a ooforectomia contralateral. Os níveis séricos das gonadotrofinas foram variáveis, mas permaneceram abaixo dos níveis de animais castrados. A primeira ovulação ocorreu cerca de quatro meses após o transplante. Duas das seis ovelhas apresentaram gestações que evoluíram até o termo, sendo uma proveniente de implante de tecido fresco e outra proveniente do implante de tecido após congelamento.

Salle et al. (1998) mostrou desenvolvimento normal de folículos em fragmentos corticais de ovários de 6 ovelhas, auto-transplantados para o hilo ovariano contra-lateral, após congelamento. Folículos primordiais até os estágios antrais foram encontrados na análise histológica, em 5 dos 6 implantes de tecido ovariano após o congelamento.

Baird et al. (1999), continuando o estudo de Gosden et al. (1994), investigaram a sobrevivência de tecido ovariano congelado/descongelado e transplantado, de ovelhas, por um período de aproximadamente 2 anos. Após a ooforectomia e o transplante do fragmento congelados/descongelados, as concentrações de FSH (Hormônio folículo-estimulante) e LH (Hormônio luteinizante) aumentaram muito por aproximadamente 14

semanas antes de caírem para níveis normais e permanecendo por mais ou menos 60 semanas. Entre 10 e 13 meses após o transplante, todas as ovelhas tiveram 5-10 ciclos estrais regulares e similares aos do controle. A função lútea foi avaliada através da dosagem de progesterona que se manteve normal após 11 meses do transplante. A concentração de inibina A, medida 22 meses após o procedimento, encontrava-se significativamente menor que no grupo controle. Todos os transplantes continham, após 22 meses, grandes folículos antrais e cistos, mas apenas uma pequena quantidade de oócitos. Concluíram que, apesar da drástica redução no número de folículos primordiais, a função endócrina ovariana manteve-se preservada após o transplante de tecido ovariano congelado.

Aubard et al. (1999) avaliaram a função de fragmentos de ovários congelados e descongelados que foram transplantados para sítios ortotópicos (corno uterino) e heterotópicos (subcutâneo) de ovelhas. Oócitos dos dois tipos de transplante foram coletados, maturados e fertilizados. O crescimento folicular se deu normalmente, sendo que folículos pré antrais foram encontrados após 4 semanas e antrais após 10 semanas. Apesar da maioria das ovelhas ter voltado a menstruar, nenhuma delas engravidou espontaneamente. Sete meses após o transplante, oócitos ainda puderam ser coletados dos dois sítios, maturados e alguns deles fertilizados. O mesmo grupo, em 2001, obteve desenvolvimento de blastocisto após FIV de oócitos aspirados de transplantes ovarianos de ovelhas (Akar & Oktay, 2005).

Em 2003, Salle et al. publicaram os resultados do seguimento de transplante de tecido ovariano autólogo congelado em ovelhas. Houve o nascimento de 6 ovelhas a partir de 4

gravidezes. Concluíram que há manutenção da fertilidade por um longo período após o transplante, apesar de uma drástica redução no número total de folículos.

Em uma revisão de estudos experimentais com ovelhas, publicados sobre este assunto, Baird et al. (2004) observaram significativo aumento na proporção de folículos em crescimento, variando de menos de 20% antes do congelamento a mais de 70% no sétimo, 30º e 60º dias após o descongelamento. De acordo com esses autores, o recrutamento massivo de folículos primordiais, que também ocorre em culturas de fragmentos, sugere a perda de algum mecanismo inibitório regulando os níveis de FSH. Após o auto-transplante, o número de folículos antrais e a secreção de inibina A se encontram reduzidos, resultando no aumento dos níveis basais de FSH, que poderia levar a um recrutamento massivo, embora se saiba que esse estágio inicial da foliculogênese pode ocorrer na ausência de FSH e LH. Os autores relataram o nascimento de vários carneiros e o funcionamento dos implantes por um período de até 2 anos.

Diversos estudos foram também realizados em outros animais. Almodin et al. (2004) realizaram seu estudo em coelhas e demonstraram a capacidade de retorno à fertilidade, após ooforectomia unilateral e criopreservação ovariana. Obtiveram gravidez espontânea 11 meses após a esterilização do ovário contralateral por meio de radioterapia e implante de fragmentos descongelados sobre esse ovário remanescente.

### **2.3.5 – Transplante Autólogo Criopreservado em Humanos**

Uma vez que o tecido ovariano foi congelado, ele pode ser transplantado de duas maneiras: Ortotópico – colocando o ovário ou fragmentos de ovário na fossa ovárica

próximo ao ligamento infundíbulo-pélvico; Heterotópico – implantando o tecido para o tecido subcutâneo. Uma gravidez espontânea pode, teoricamente, ser obtida quando do transplante ortotópico em uma paciente com trompas pérvias. No caso do heterotópico, quando os fragmentos são inseridos no subcutâneo abaixo da fáscia braquioradial ou no abdome abaixo da fáscia do músculo reto, a gravidez só será possível através de FIV (Akar & Oktay, 2005).

#### *2.3.5.1 – Ortotópico*

Em teoria, uma gestação natural pode ser obtida por meio de transplante ortotópico de tecido cortical ovariano congelado/descongelado, nos casos em que as tubas permanecerem intactas.

Em 2000, Oktay & Karlikaya reportaram um transplante via laparoscópica de tecido ovariano congelado/descongelado para a parede pélvica lateral, em uma paciente de 29 anos de idade, que havia sido submetida à ooforectomia bilateral por patologia benigna. Fragmentos do tecido ovariano criopreservado foram descongelados e transplantados. A paciente teve seu tecido ovariano estimulado por meio de gonadotrofinas após 15 semanas e novamente depois de 10 meses. O desenvolvimento folicular foi demonstrado pela ultrasonografia e a ovulação ocorreu em resposta à administração de hormônio gonadotrófico humano (HCG).

O segundo caso de transplante ortotópico foi relatado por Radford et al. (2001) e foi realizado em uma mulher de 36 anos com linfoma, que teve seu ovário direito criopreservado antes da realização de quimioterapia. Dezenove meses após, com a

paciente em menopausa, dois fragmentos de tecido ovariano descongelado foram transplantados para a fossa ovárica direita e sobre o ovário esquerdo. Cinco meses depois, o estrogênio atingiu 352 pmol/l e a ultrassonografia revelou folículo 20 mm e endométrio 10 mm. Mais dois meses e a paciente não apresentava mais sintomas climatéricos. Posteriormente, (nove meses após o reimplante), o FSH e LH retornaram aos níveis pré-transplante (73 UI/l e 108 UI/l, respectivamente).

O nascimento do primeiro bebê após transplante de tecido ovariano congelado em humanos foi relatado por Donnez et al. em 2004. Fragmentos de tecido ovariano de uma paciente com linfoma Hodgkin, que seria submetida a quimioterapia e radioterapia, foram criopreservados. Quatro anos após o fim do tratamento, os fragmentos foram descongelados e implantados em uma janela peritoneal, criada adjacente ao ovário direito. A paciente engravidou espontaneamente. Existe, entretanto, a possibilidade dessa gravidez ter se originado de um oócito que ovulou do ovário remanescente e não do tecido transplantado (Oktay & Tilly, 2004).

No ano seguinte, Meirov et al. (2005) relataram o segundo caso de nascido vivo, após transplante ovariano criopreservado em humanos, em um paciente com falência ovariana prematura, após quimioterapia. A paciente menstruou após 8 meses, e um aumento na dosagem de Hormônio anti-mulleriano e inibina B indicaram a presença de folículos em crescimento e ovulação. Após um ciclo de FIV, um embrião de 4 células foi transferido e a gravidez atingiu o termo.

Também em 2005, Schmidt et al. apresentaram os resultados de três casos de transplante de tecido ovariano para a cavidade peritoneal, próximo do sítio natural ovariano. Todas as

três pacientes com ovários transplantados tiveram retorno da função endócrina ovariana confirmada pelo retorno dos ciclos, pela presença visível de folículos pela ultra-sonografia e pelos níveis hormonais normais. Dois embriões foram obtidos de três oócitos coletados em metáfase II, mas não resultaram em gravidez após a transferência embrionária.

Em 2006, Demeestere et al., utilizando transplante ortotópico e heterotópico, obteve gravidez clínica em uma paciente. Tecido ovariano criopreservado de uma mulher de 29, anos tratada previamente com transplante de medula óssea após doença de Hodgkin, foi transplantado para o ovário, para o peritônio e para o tecido abdominal subcutâneo. Os marcadores de reserva ovariana foram se normalizando após 5 meses. Seis ciclos naturais foram acompanhados e a paciente engravidou durante o sexto, mas abortou após 7 semanas de gestação. Essa paciente continuou a ser acompanhada pelo grupo e, um ano após o primeiro transplante, um aumento no FSH e uma diminuição nos níveis de inibina B sugeriram deterioração dos fragmentos (Demeestere et al., 2007). Um novo transplante ortotópico e heterotópico foi então realizado: dois fragmentos de ovário foram suturados no ovário remanescente e mais dois no tecido subcutâneo abdominal. A partir do terceiro ciclo, o FSH retornou para valores abaixo de 10 UI/l e durante o quinto, 2 folículos de 15 mm cada foram observados no local do ovário remanescente. Um exame de gravidez positivo no 14º dia da fase lútea e batimentos cardio-fetais à ultrassonografia (US) confirmaram a gestação. Esta transcorreu sem intercorrências e a paciente pariu uma menina saudável com 41 semanas de gravidez.

### 2.3.5.2 – *Heterotópico*

Ainda não se conhece a longevidade dos fragmentos de tecido ovariano e, desse modo, repetidos transplantes podem ser necessários para permitir a manutenção da função ovariana. Desse modo, o transplante heterotópico se torna mais factível evitando repetidos procedimentos invasivos e anestésias e tornando o acompanhamento e a captação de oócitos mais fácil. Entretanto, ainda não se conhece o melhor sítio para o transplante e o grande desafio é conseguir obter oócitos maduros e saudáveis (Kim, 2006).

O primeiro caso de transplante de tecido ovariano fragmentado para o subcutâneo foi descrito por Oktay et al. (2001a) e foi realizado em uma paciente de 35 anos com carcinoma cervical estadio IIIB e que foi submetida a radioterapia pélvica. Após 10 meses do transplante, a ultrassonografia realizada mostrou folículo dominante 15 mm e quatro folículos antrais, enquanto que os níveis de FSH e LH entre 120 e 227 dias ficaram em torno de 8,6 UI/l e 12,8 UI/l, respectivamente.

Kim et al. (2004) realizaram transplante heterotópico de tecido ovariano em três mulheres com câncer de colo uterino. Das duas que sobreviveram, observou-se restauração da função ovariana após 14-18 semanas do transplante e essa função normal vem se mantendo desde então, apesar de novos transplantes terem sido necessários. O FSH basal em 2005 encontrava-se abaixo de 10 UI/l (Kim, 2006). Os autores investigaram qual o melhor sítio para o transplante e viram que houve uma maior frequência de folículos dominantes quando o transplante foi feito para a parede abdominal, em comparação com mama e coxa, além de ser possível ocorrer ovulação

espontânea. O grupo já conseguiu coletar cinco oócitos maduros a partir do implante abdominal e um do implante na coxa.

Oktaý et al. (2004) conseguiram obter um embrião de 4 células, após transplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado de uma mulher de 36 anos com câncer de mama. Essa paciente havia sido submetida a mastectomia e esvaziamento axilar bilateral, além de ter recebido quimioterapia 6 anos antes. A paciente teve todos os sintomas do climatério e a menopausa após a quimioterapia. Três meses após o transplante, a mulher voltou a apresentar função ovariana e oócitos começaram a ser coletados.

Wolner-Hassen et al. (2005) relataram o transplante de tecido ovariano criopreservado para o antebraço. Apenas dois folículos desenvolveram e o tecido sobreviveu por apenas 7 meses. Os autores alertam sobre o risco de exposição à temperatura baixa, pressão alta e trauma para os fragmentos transplantados para o subcutâneo.

Rosendahl et al. (2006) publicaram o caso de uma gravidez bioquímica, ocorrida após transplante ovariano heterotópico de tecido criopreservado. Uma paciente de 28 anos de idade, cujos ovários foram criopreservados previamente ao tratamento quimioterápico para linfoma de Hodgkin, teve fragmentos descongelados implantados no ovário remanescente, na parede pélvica e numa janela criada no retroperitônio. A mulher voltou a apresentar secreção hormonal e folículos desenvolveram-se nos três sítios. Os folículos que se desenvolveram no retroperitônio foram aspirados diversas vezes. Realizou-se Injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) nos óvulos coletados e embriões foram transferidos. Em uma dessas situações, o teste de gravidez ficou positivo 14 dias após a transferência. Entretanto, gravidez clínica não foi detectada.

Apesar de todos esses esforços, até o momento não houve nenhum relato de nascido vivo de tecido ovariano criopreservado transplantado heterotopicamente, o que pode ser atribuído ao fato dos folículos nunca atingirem mais do que 15 mm. Esse desenvolvimento folicular limitado pode ser devido a diferentes temperaturas e pressões que os folículos são submetidos no subcutâneo, quando comparado à cavidade abdominal (Donnez et al., 2006).

### **2.3.6 – Transplante de Ovário Inteiro com Reanastomose Vascular**

Outra estratégia que vem sendo estudada é o transplante do ovário inteiro com reanastomose vascular. Através desta técnica, obtém-se fluxo sanguíneo imediato para o órgão transplantado, minimizando a injúria causada pela isquemia, que pode levar a diminuição da reserva folicular e conseqüente sobrevida do tecido. Wang et al. (2002a) descreveram o sucesso que obtiveram com essa técnica em ratas quando congelaram a parte superior do útero, o oviduto, o ovário com sua vascularização e depois realizaram o transplante com anastomose vascular. A função reprodutora normal foi restabelecida em 4 de 7 (57%) animais, sendo que um engravidou.

Apesar do sucesso obtido em ratos, o congelamento de ovários inteiros de grandes animais ainda permanece como um desafio devido à dificuldade de difusão adequada do crioprotetor em grandes massas de tecido e à injúria vascular causada pela formação intravascular de gelo. Seguindo este raciocínio, Bedaiwy et al. (2003) relataram a restauração da função ovariana após auto-transplante de ovários intactos de ovelhas com anastomose vascular. Entretanto, deve-se ressaltar que 27% dos ovários foram perdidos durante o *follow-up*, devido a eventos trombóticos no pedículo vascular anastomosado.

Mais recentemente, Imhof et al. (2006) demonstraram que o auto-transplante de ovários inteiros de ovelhas com anastomose vascular pode levar à gravidez. E mais surpreendente é que, em seis dos oito ovários, os vasos estavam livres de trombos e a estrutura do estroma ovariano encontrava-se intacta, após 19 meses do procedimento.

Estudos em humanos já vêm sendo realizados, inclusive com a adoção de protocolos de congelamento. Martinez-Madrid et al. (2004) descreveram o processo de criopreservação e transplante de ovário inteiro com pedículo vascular e mostraram sobrevivência folicular de 75% e estrutura histológica normal. Entretanto, até o momento, ainda não há relatos de nascimentos ou gravidezes na literatura.

### **3 – OBJETIVO**

Verificar a viabilidade funcional hormonal do transplante ovariano autólogo para o peritônio de ratas, após o congelamento e descongelamento, através de citologia vaginal seriada e estudo histológico dos fragmentos de ovários transplantados.

## 4 – METODOLOGIA

### 4.1 – DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental descritivo que utilizou ratas albinas da raça Holtzman, nuligestas, com idade e peso aproximados.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 101/05 (ANEXO A). A abordagem dos animais foi feita de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque e com as Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Cooper, 1985).

As ratas foram fornecidas pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da UFMG, onde também foram mantidas em regime de luz/escuridão, de 12/12horas com água e ração (Nuvilab®) *ad libitum*<sup>1</sup>, permanecendo acomodadas em gaiolas semelhantes àquelas em que já se encontravam antes.

### 4.2 – AMOSTRA

As ratas foram divididas em 3 grupos e os animais foram operados em conjuntos de 6, todos pertencendo à mesma ninhada, sendo 2 para cada um dos grupos de estudo, de forma aleatória. Desta maneira, os três grupos foram emparelhados quanto à habilidade do cirurgião, no decorrer do experimento e ao tempo decorrido entre a cirurgia e o início da realização da citologia vaginal funcional.

---

<sup>1</sup> À vontade.

### 4.3 – MÉTODOS

#### 4.3.1 – Procedimento Cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no biotério central da Faculdade de Medicina da UFMG. As ratas eram retiradas uma a uma da gaiola e submetidas à cirurgia, conforme indicado para cada grupo de estudo.

Os animais foram submetidos à analgesia e anestesia com a associação de xilazina (10mg/kg) e ketamina (60 mg/kg) por via IM (intramuscular). Após tricotomia e antissepsia do abdômen com iodo (PVPI) solução alcoólica, realizou-se uma incisão mediana infra-umbilical, de cerca de 3 centímetros, com abertura da cavidade peritoneal, na linha média e identificação dos cornos uterinos (FIG. 1).

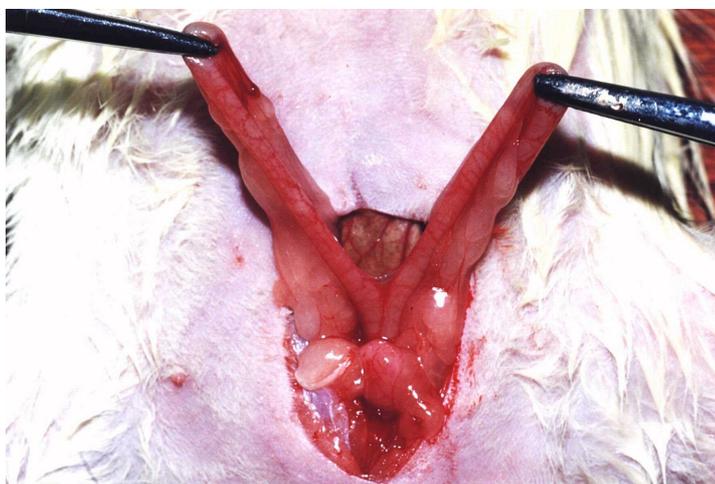


FIGURA 1 – Laparotomia com identificação dos cornos uterinos

Nas ratas do grupo I (Ooforectomia, n=20), os ovários foram dissecados de sua bursa e ressecados bilateralmente, após a laparotomia (FIG. 2).

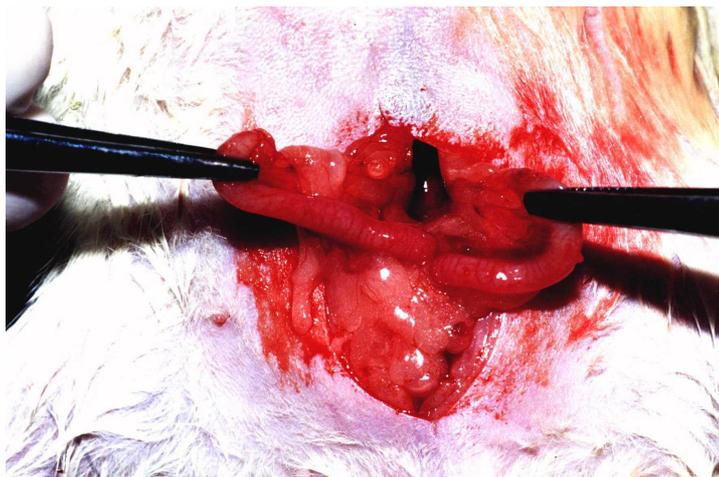


FIGURA 2 – Ovários ressecados bilateralmente

Nas ratas do grupo II (Controle, n=24), realizou-se, simplesmente, a inspeção bilateral dos ovários, após a abertura da cavidade peritoneal (FIG. 3).

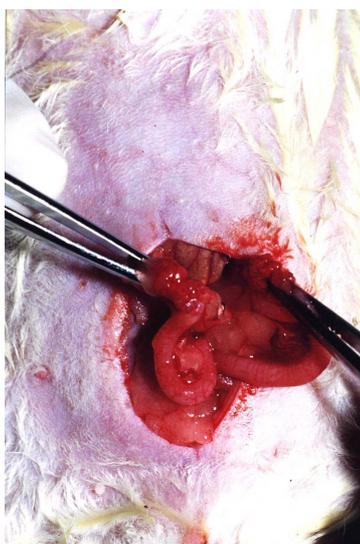


FIGURA 3 – Inspeção bilateral dos ovários

Nas ratas do grupo III (Transplante, n=23), os dois ovários foram dissecados de sua bursa e ressecados bilateralmente, seguido de congelamento e descongelamento de metade de um dos ovários após 10 dias e posterior transplante para a superfície peritoneal, à esquerda do feixe vâsculo-nervoso epigástrico.

As ratas que foram alocadas nesse grupo foram identificadas por meio de pequenas incisões ( $\pm 0,5$  cm) nas orelhas das mesmas. Na rata de número 1, fez-se uma incisão única na orelha esquerda; na de número 2, duas; na de número 3, três incisões. A rata de número 4 foi identificada com uma incisão única na orelha direita, a de número 5 com duas e a de número 6 com três incisões nessa mesma orelha. Essas identificações foram realizadas após cada procedimento cirúrgico de cada rata, antes que elas saíssem do estado anestésico em que se encontravam.

Após a realização dos procedimentos, efetuou-se sutura em plano único, através de sutura contínua simples, com fio de nylon 3-0. Depois disso, as ratas eram observadas até o seu restabelecimento (movimentação, deambulação e alimentação). Esse período nunca foi superior a 15 minutos. Só então eram recolocadas, com as demais de seu grupo, nas respectivas gaiolas.

#### **4.3.2 – Congelamento e Descongelamento dos Ovários**

Os ovários removidos (FIG. 4) foram colocados em meio de cultura tamponado (Hepes buffered - Earle's Balanced Salt Solution) em tubos *Eppendorf* numerados, em gelo, para transporte. Os ovários foram então preparados para o congelamento, através da retirada de toda gordura peritoneal e peri-ovariana e secção em duas metades. Foi realizado o congelamento de apenas uma das metades de cada ovário. Cada fragmento foi lavado por três vezes em meio de cultura tamponado contendo 10% de substituto sintético de soro (SSS – Irvine® - Estados Unidos da América - EUA) e então colocado em criotubos contendo um volume final de 1,8 ml de crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO - *Sigma-Aldrich*® - EUA) 1,5 Molar, acrescido

de 10% de SSS. Os criotubos foram identificados com a mesma marcação dos tubos *Eppendorf* que continham os ovários previamente. Em seguida, foram colocados em uma máquina de congelamento (*KRYO 10 - Planer* – EUA) para a realização do procedimento, seguindo-se o protocolo lento, primeiramente descrito por Newton *et al.* (1996). Inicialmente, a temperatura foi reduzida em 2°C por minuto até atingir a temperatura de -9°C, quando foi realizado o *seeding*<sup>2</sup> e a temperatura foi mantida por 10 minutos. Em seguida, as rampas foram de: 3°C por minuto até -40°C e 10°C por minuto até atingir -140°C, quando os tubos foram levados para os *racks* e inseridos em nitrogênio líquido a -196°C, onde foram mantidos por 10 dias (Geber *et al.*, 2002).

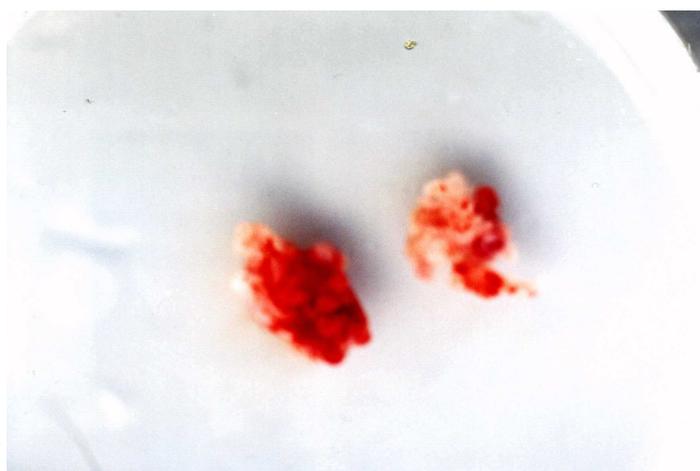


FIGURA 4 – Ovários ressecados

O descongelamento de cada fragmento de ovário foi realizado individualmente na manhã do transplante seguindo protocolo rápido (Newton *et al.* 1996): os tubos foram colocados em banho-maria à temperatura de 37°C por 3 minutos em agitação. O tecido ovariano foi, então, exaustivamente lavado em meio de cultura tamponado. Os fragmentos descongelados foram colocados dentro de um tubo numerado

---

<sup>2</sup> Cristal de gelo extracelular ➔ entrada de crioprotetor.

contendo meio de cultura tamponado e, em gelo, rapidamente transportados para o biotério para a realização do transplante.

#### 4.3.3 – Transplante Ovariano

As ratas foram novamente operadas após 10 dias, seguindo os procedimentos já descritos anteriormente (analgesia, anestesia, tricotomia, antissepsia, laparotomia). Após aberta a cavidade, a metade do ovário descongelada era suturada com um ou dois pontos simples à superfície peritoneal, à esquerda do feixe vâsculo-nervoso epigástrico esquerdo (FIG. 5). Realizou-se, então, sutura em plano único, através de sutura contínua simples, com fio de nylon 3-0 (FIG. 6). Depois disso, as ratas eram observadas até o seu restabelecimento (movimentação, deambulação e alimentação). Só então eram recolocadas nas suas respectivas gaiolas.



FIGURA 5 – Feixe vâsculo-nervoso epigástrico

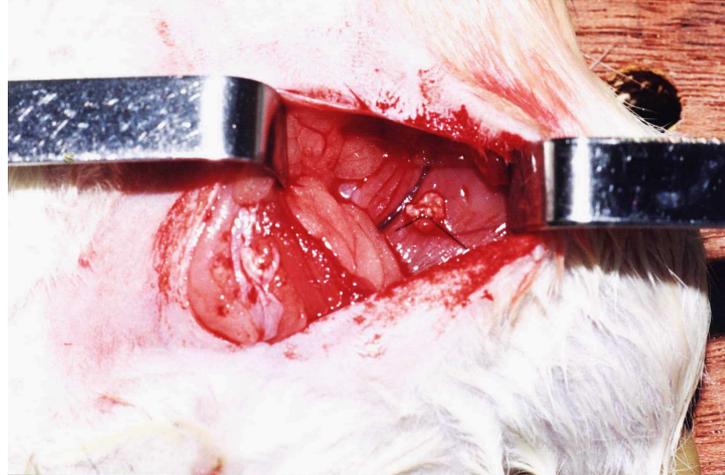


FIGURA 6 – Transplante ovariano

#### 4.3.4 – Citologia Vaginal Funcional

A citologia vaginal funcional foi realizada por 10 dias seguidos, nos três grupos, e iniciada 7 dias após a cirurgia nas ratas dos grupos 1 e 2, e 15 dias após a segunda cirurgia nas ratas do grupo 3.

Foi realizado um lavado da vagina com 0,5 ml de solução salina a 0,9%, aplicado através de conta-gotas, tomando o devido cuidado de não se tocar o colo uterino e de não aplicar a solução salina com muita pressão, tentando evitar, desse modo, a pseudogestação. O líquido coletado foi colocado em lâmina de vidro. As lâminas foram examinadas em microscópio ótico (Nikon Labophot 2, Japão) com aumento de 40 e 100x, logo após o seu preparo, para observação das características celulares.

O padrão de atrofia foi definido pelos achados citológicos das ratas do grupo 1 (Ooforectomia) e foi caracterizado por raras células basais e inúmeros leucócitos.

O proestro caracterizava-se por um predomínio de células epiteliais de descamação, arredondadas, com núcleo central e facilmente visível. Durante o estro, verificava-se uma maior celularidade, com predomínio das células epiteliais queratinizadas, com formato losangular ou poligonal, com citoplasma de aspecto granuloso e núcleo reduzido ou picnótico, além de muco, que se apresenta em formato de samambaia ou como fibras em formato de agulhas. No metaestro, as células queratinizadas já se encontravam em menor número e já se verifica neutrófilos polimorfonucleados. O diestro era caracterizado por uma predominância absoluta de neutrófilos polimorfonucleados.

O ciclo foi considerado inadequado quando havia estro persistente, por pelo menos quatro dias, ou quando não havia uma ciclicidade com padrão proestro => estro => metaestro => diestro => proestro (Marcondes et al., 2002).

#### **4.3.5 – Estudo Histológico dos Implantes**

As ratas do grupo do transplante (Grupo 3) foram sacrificadas por meio de deslocamento cervical 40 dias após a segunda cirurgia e tiveram seus implantes ovarianos excisados (FIG. 7). Importante relatar que esse procedimento de sacrifício se deu sem dor e sofrimento, já que se encontravam anestesiadas, sem resposta a estímulos externos. Os implantes foram fixados imediatamente em formol a 10%. Após o processo de fixação, foi realizada a desidratação dos tecidos pela passagem dos mesmos em banhos de concentrações crescentes de etanol, de 70 até 100%. Em seguida, o etanol foi substituído por xilol (processo de clareamento) e os tecidos foram mergulhados em parafina fundida numa estufa de 60°C. Aguardou-se a

solidificação da parafina, à temperatura ambiente, obtendo-se, dessa maneira, blocos de parafina com o tecido em seu interior (processo de inclusão).

Foram realizados 20 cortes de sete micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), por cada implante, através da navalha do micrótomo. A coloração utilizada na confecção das lâminas foi a hematoxilina-eosina. As lâminas foram estudadas no microscópio ótico, com aumentos de 100 e 400 x (Nikon Labophot 2, Japão), procurando-se folículos nos seus vários estágios de desenvolvimento (primordiais, primários, pré-antrais e antrais) e corpos lúteos. Os folículos foram classificados como primordiais, quando apresentavam uma camada única de células pré-granulosas ao redor dos oócitos; como primários, quando possuíam uma camada de células da granulosa cubóides; como pré-antrais, quando tinham duas ou mais camadas de células da granulosa, mas não mostravam um antro folicular; e como antrais, quando a cavidade antral era observada (Oktay et al., 1995).

#### **4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Por tratar-se de um estudo experimental descritivo, não foi necessária a realização de cálculo amostral.

Foi utilizado o modelo de regressão logística para medir a interferência do peso e do tipo de intervenção cirúrgica (transplante ou controle) no tipo de ciclo estral (regular ou inadequado). A significância estatística foi considerada quando o valor p era menor que 0,05.

#### **4.5 – NORMALIZAÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

Para a redação desta dissertação, foram seguidas as normas de formatação recomendadas pelo Manual para normalização de publicações técnico-científicas (França et al., 2004) e o Manual para elaboração e apresentação de dissertações e teses no curso de pós-graduação em ginecologia e obstetrícia (Cabral et al., 2001).

## 5 – RESULTADOS

Um total de 67 ratas, todas com aproximadamente 60 dias de vida, foram incluídas neste estudo. Não foram observados óbitos ou perdas durante a realização do mesmo. O peso das ratas variou de 200 a 350g e não houve diferença significativa entre os três grupos pela análise de variância ( $p = 0,432$ ).

Com relação à análise do ciclo hormonal estral nas ratas estudadas, no grupo 1 (ooforectomia), todas as 20 ratas apresentaram um padrão persistente de atrofia na citologia vaginal, compatível com ausência de ciclo estral. No grupo 2 (controle), todas as ratas apresentaram citologia vaginal típica de secreção hormonal cíclica (estro). No grupo 3 (transplante), 13 animais apresentaram ciclo estral normal e 8 apresentaram alterações citológicas compatíveis com o ciclo estral (FIG. 7). Uma rata teve 4 dias de diestro e 2 de metaestro, outra apresentou 3 dias de estro, seguido de 1 dia de metaestro e 1 dia de diestro (GRAF. 1 e TAB. 1).

TABELA 1

Comparação entre o efeito do transplante ovariano após congelamento/descongelamento e o grupo controle na regularidade do ciclo estral das ratas

Grupo	Ciclos		Total
	Regulares	Inadequado	
Controle	24	0	24
Transplante	21	2	23
<b>Total</b>	45 (95,7%)	2 (4,3%)	47

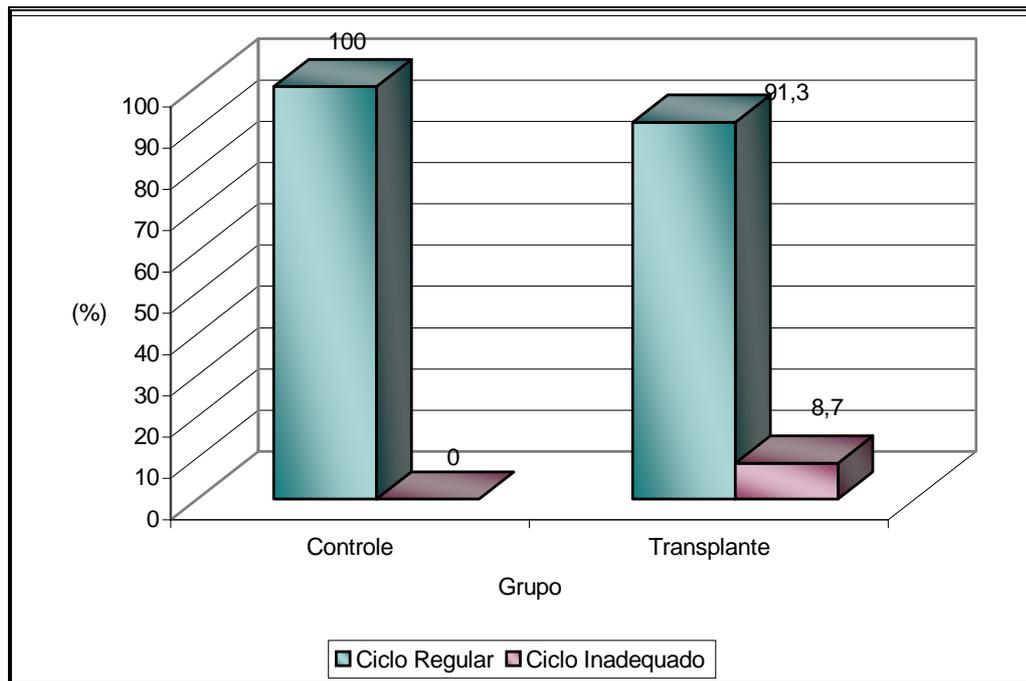


GRÁFICO 1 - Regularidade do ciclo estral nas ratas do grupo controle e transplante após congelamento e descongelamento dos ovários

Aplicou-se o modelo de regressão logística para se verificar a interferência do peso e do tipo de intervenção cirúrgica (transplante ou laparotomia branca) na probabilidade de ocorrência de um ciclo inadequado. Apesar de o peso não ter se diferido significativamente nos três grupos, ele foi incluído na análise, para se verificar a sua influência no ciclo das ratas. Na análise do tipo de intervenção cirúrgica, foram comparados apenas os grupos controle e transplante, visto que o grupo ooforectomia foi utilizado apenas para se definir o padrão de atrofia genital à citologia vaginal.

A variável resposta de interesse, no estudo, foi a classificação do ciclo (Y), sendo o evento de interesse a ocorrência de ciclos inadequados. As variáveis explicativas são o peso das ratas (variável contínua, medida em gramas) e o grupo (Controle ou Transplante). A forma do modelo logístico para essa situação é dada por:

$$\pi(x) = P(Y = 1) = \frac{\exp\{\alpha + \beta_1(\textit{peso}) + \beta_2(\textit{grupo})\}}{1 + \exp\{\alpha + \beta_1(\textit{peso}) + \beta_2(\textit{grupo})\}},$$

onde  $\pi(x)$  é a possibilidade de ocorrência de ciclo inadequado em uma rata com um determinado peso ou pertencendo a um dos dois grupos comparados (Controle ou Transplante),  $Y = 1$  é a ocorrência de ciclo inadequado e  $\alpha$  e  $\beta$  são parâmetros do modelo logístico.

Como pôde ser verificado, não houve efeito significativo do tipo de intervenção cirúrgica (laparotomia branca x transplante) no ciclo das ratas ( $p=0,782$ ), uma vez que, em ambos os grupos, todos os animais apresentaram ciclicidade hormônio dependente. No grupo de estudo (transplante), duas ratas apresentaram ciclos irregulares, mas compatíveis com produção hormonal. Ainda que estes animais tivessem sido considerados como apresentando ciclo inadequado, utilizando-se a mesma fórmula, a diferença se manteria não significativa ( $p=0,698$ ).

O estudo histológico para análise morfológica dos ovários congelados/descongelados e transplantados demonstrou uma ausência de alterações isquêmicas ou inflamatórias, e todos os ovários apresentaram folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação, isto é, folículos primordiais, antrais e corpo lúteo (FIG. 7 a 9). Verificou-se uma grande quantidade de vasos sanguíneos, em todos os cortes de todos os implantes, traduzindo a intensa revascularização dos tecidos (FIG. 10).

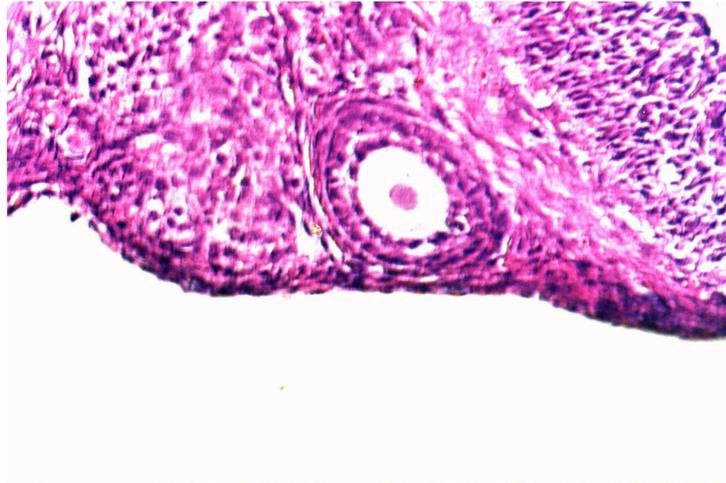


FIGURA 7 – Folículo primordial

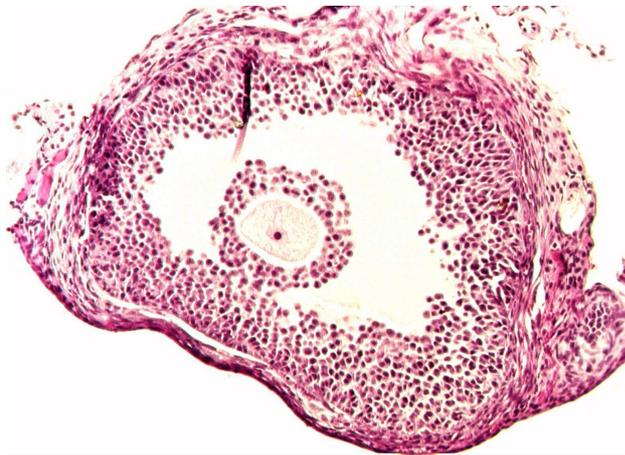


FIGURA 8 – Folículo antral



FIGURA 9 – Corpus lúteos

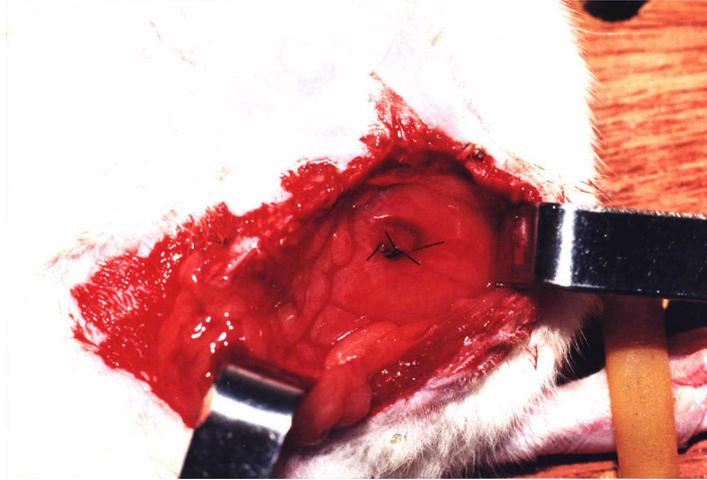


FIGURA 10 – Transplante ovariano após 40 dias

## 06 – DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou a viabilidade funcional hormonal do transplante ovariano autólogo para o peritônio de ratas, após o congelamento e descongelamento, através de citologia vaginal seriada e estudo histológico dos ovários transplantados.

A preservação do tecido ovariano, para posterior utilização em ciclos de reprodução assistida ou como técnica alternativa para reposição hormonal, representa um enorme avanço para manutenção da capacidade reprodutiva e/ou endócrina de mulheres submetidas a tratamentos, que têm como efeitos adversos a castração, seja ela química ou mecânica.

Nesse estudo, optamos por utilizar ratas com o mesmo peso e a mesma idade, com objetivo de evitar as possíveis interferências desses, no resultado final. Esse fato foi confirmado quando realizamos o cálculos de regressão logística, mostrando que essas variáveis não interferiram na presença ou não de ciclo estral regular.

É importante ressaltar aqui que as ratas da mesma ninhada foram aleatorizadas para os três grupos a fim de evitar interferência da habilidade do cirurgião, uma vez que a curva de tempo de aprendizado poderia ser fator de viés nos resultados.

Todas as ratas do grupo transplantado e não transplantado foram marcadas, permitindo, ao realizar o transplante, ter a certeza de que os fragmentos de tecido ovariano estavam sendo reimplantados na mesma rata da qual este foi retirado. Desse modo, não há dúvidas a respeito de o transplante ter sido mesmo autólogo.

Utilizamos a superfície peritoneal para o reimplante dos fragmentos de ovários descongelados pela facilidade do procedimento e a vascularização ali presente (Barros et al., 2001). Outras alternativas razoáveis para o sítio de implantação do ovário ou de tecido ovariano seriam: tecido subcutâneo, bursa ovariana e cápsula renal. A facilidade na monitorização do crescimento e da punção folicular foram as justificativas para vários autores utilizarem o tecido subcutâneo e obterem sucesso (Weissman et al., 1999; Van den Broecke et al., 2004; Hernandez-Fonseca et al., 2004; Kim et al., 2005), sendo que Lee et al. (2005) mostraram preservação de folículos em 73% de fragmento de ovário fresco e em 62% nos de congelado transplantado. Callejo et al. (2002) realizaram estudo no qual avaliaram diferença no número total de folículos após transplante para a superfície peritoneal e o subcutâneo de ratas e não observaram diferença significativa entre esses dois sítios. Pesquisas a respeito do transplante para a cápsula renal foram realizadas também por diversos autores com a justificativa de ser um local com intensa vascularização e que mantém os fragmentos no local desejado e com chance de gravidez espontânea (Gosden et al., 1994; Newton et al., 1996; Hernandez-Fonseca et al., 2004). Yang et al. (2006) mostraram recuperação de todos os fragmentos de tecido transplantados para a cápsula renal e sinais de desenvolvimento folicular em 100% dos ovários.

Utilizamos o DMSO para o congelamento, devido a nossa maior experiência com esse crioprotetor (Geber et al., 2002). Mais ainda, Newton et al. (1996) compararam a eficácia de diversos crioprotetores (DMSO, Propileno-glicol, Etileno-glicol, Glicerol) avaliando a viabilidade de fragmentos de tecido ovariano que foram congelados através de protocolo lento e transplantados para ratas imunodeficientes. Apenas 10% do número total de folículos viáveis foi observado em fragmentos congelados utilizando-se Glicerol. Para o DMSO esse número foi de 74%, para o Propileno-glicol de 44% e para o Etileno-glicol de

84%. Considerando o número de fragmentos congelados e descongelados submetidos à análise histológica e que apresentavam pelo menos um folículo primordial, as porcentagens foram as seguintes: 96%, 92%, 84% e 35% para, respectivamente DMSO, Etileno-glicol, Propileno-glicol, Glicerol.

O posterior transplante do tecido ovariano criopreservado é outro fator fundamental para a aplicação da técnica de congelamento ovariano. A simplicidade do procedimento e sua viabilidade técnica são os principais aspectos a serem considerados, uma vez que não adiantará se preservar o tecido ovariano se não houver condições de reimplantá-lo. O uso da técnica de transplante sem reanastomose vascular para a superfície peritoneal já foi comprovadamente demonstrado como viável por nosso grupo (Barros et al., 2001) e apresenta as vantagens de ser um procedimento simples, que evita a utilização das complexas técnicas e do material de microcirurgia.

Quando procedemos ao estudo histológico dos ovários transplantados após criopreservação, não observamos alterações isquêmicas ou inflamatórias e todos os ovários apresentaram folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação, isto é, folículos primordiais, antrais e corpo lúteo. Verificou-se uma grande quantidade de vasos sanguíneos, em todos os cortes de todos os implantes, traduzindo a intensa revascularização dos tecidos. Segundo Dissen et al. (1994), é necessário um intervalo de aproximadamente 7 dias para que ocorra a revascularização total do implante e conseqüente retomada da produção hormonal. Em nosso estudo, aguardamos um período de 15 dias entre o transplante e o início da coleta de citologia para que não houvesse dúvida com relação à funcionalidade no implante. Já em relação ao crescimento folicular, Freeman (1994) relata que este dura entre 8 e 14 dias e que a duração máxima do corpo

lúteo é de 19 dias. Assim, a presença de folículos nos seus estágios avançados de desenvolvimento, incluindo os grandes folículos antrais, e o encontro de corpos lúteos nos implantes, após um intervalo mínimo de 20 dias, descartam a possibilidade de que estes elementos estivessem presentes desde o momento da primeira cirurgia, já que o estudo histológico foi realizado 40 dias após a segunda cirurgia. Callejo et. al., 2002, só iniciaram a coleta de sangue para dosagem de FSH e LH após 7 dias da realização do transplante. Lee et al. (2005) aguardaram 2 semanas para proceder à retirada dos fragmentos de ovário para posterior análise. Yang et. al. (2006) só iniciaram a estimulação ovariana com FSH após 3 semanas do transplante.

Realizamos a citologia vaginal para avaliação da função hormonal ovariana ao invés da dosagem direta dos hormônios, por tratar-se de procedimento mais simples e com ótima correlação com a função endócrina ovariana. Goldman et al. (1969) e Butcher et al. (1974) mostraram boa correlação da citologia vaginal com os níveis hormonais de esteróides ovarianos, gonadotrofinas e prolactina, durante o ciclo estral da rata. Mais recentemente, Marcondes et al. (2002) confirmaram a facilidade na realização desse lavado, na leitura das lâminas e a ótima correlação com a função endócrina ovariana. A função ovariana foi posteriormente confirmada pela análise histológica dos implantes.

Não realizamos cálculo amostral, visto que o estudo é experimental descritivo. Desse modo, nosso objetivo era apenas avaliar quais seriam as condições do transplante e a ocorrência de sucesso ou não, sem nos preocuparmos inicialmente com taxas de sucesso.

Com relação à análise do ciclo hormonal estral nas ratas estudadas, pudemos verificar que, como esperado, no grupo ooforectomizado, todas as ratas apresentaram um padrão

persistente de atrofia na citologia vaginal. No segundo grupo, que foi submetido apenas à laparotomia, todas as ratas apresentaram citologia vaginal típica de secreção hormonal cíclica (estro), mostrando que o procedimento cirúrgico por si só não leva a alterações importantes na secreção hormonal.

A eficácia do transplante de tecido ovariano congelado, em nosso estudo, foi comprovada pela presença de 91% de ratas com ciclo estral regular e 100% de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, ao exame histológico. Em apenas 2 ratas não identificamos ciclo estral regular, mesmo com evidências de desenvolvimento folicular à histologia. Diversas hipóteses podem ser levantadas para explicar a ausência de ciclos regulares em duas ratas, levando à produção hormonal irregular: isquemia transitória do tecido durante transporte; ausência de neovascularização suficiente para suprir o tecido transplantado; reação endócrino metabólica prolongada no pós operatório; e até mesmo o fato das ratas do grupo transplantado terem sido submetidas a dois procedimentos cirúrgicos, o que pode ter aumentado a necessidade metabólica nesse grupo devido ao stress, levando a aumento da necessidade de suprimento sanguíneo. Esses fatos podem ter ocorrido no intervalo entre o transplante e o início da coleta de material e, provavelmente, normalizado-se no período entre a coleta da citologia e o estudo histológico.

Segundo Soleimani et al. (2008), pode haver apoptose da célula folicular logo após o transplante, levando à perda de folículos primordiais. Isso pode ocorrer devido a isquemia transitória presente até a formação de neovascularização nos implantes. O tempo para que essa neovascularização se inicie foi estimado por Dissen et al. (1994) em 48 horas. Outro fator que pode influir na sobrevivência dos folículos é sua taxa metabólica que depende

inicialmente do seu grau de desenvolvimento e do estresse causado pelo procedimento (Gosden et al., 1994).

A taxa de sucesso de ciclos estrais regulares observada após o transplante de fragmentos de tecido ovariano, em nosso estudo, foi semelhante ou maior do que a observada na literatura, que varia dependendo, principalmente, do animal estudado e do local de implantação, sendo que a grande maioria dos estudos, independente das variáveis descritas acima, mostra sucesso.

Harp et al. (1994) descreveram 75% de retorno à ciclicidade em camundongos submetidos ao reimplante de tecido ovariano após descongelamento. Candy et al. já no ano seguinte (1995), mostraram sobrevivência de todos os fragmentos de tecido ovariano criopreservado de camundongos transplantados. Posteriormente, Cox et al. (1996) descreveram 100% de sucesso. Guanasena et al. (1997) obtiveram gestações em todas as 12 fêmeas de camundongos submetidas a transplante autólogo de ovário fresco e em 8 das 11 fêmeas submetidas a transplante autólogo de ovário após congelamento. Os transplantes foram realizados para a própria bursa ovariana, sem reanastomose vascular. Candy et al. (2000) mostraram restauração da fertilidade em 12 de 13 camundongos que receberam transplante de ovário fresco e em 10 de 12 que receberam-no congelado. Liu et al. (2000) realizaram transplante de fragmentos de vinte e seis ovários congelados e descongelados para a cápsula renal e mostraram que houve desenvolvimento folicular adequado. Também Liu et al. (2001) relataram gravidez após ICSI seguindo a mesma linha de pesquisa. Novamente Liu et al. (2002) realizando o mesmo procedimento, mostraram normalização da citologia vaginal após 11 dias. Wang et al. (2002b) relataram níveis de FSH, progesterona e estrogênio semelhantes nos grupos submetidos a transplante de tecido ovariano

descongelado e controle. Salehnia (2002) demonstrou a presença de folículos nos vários estágios de desenvolvimento, após realizar congelamento, descongelamento e transplante em 24 camundongos. Lee et al. (2005) obtiveram sucesso no transplante de tecido ovariano fresco (73%) e congelado (62%) de ratas para subcutâneo, com posterior captação oocitária, FIV e desenvolvimento de blastocistos. Yang et al. (2006) mostraram sinais de desenvolvimento folicular em 100% dos ovários criopreservados transplantados para a cápsula renal de camundongos. Migishima et al. (2006) relataram retorno da fertilidade em camundongos submetidos à radioterapia e posterior transplante de tecido ovariano criopreservado. Soleimani et al. (2008) realizaram transplante de tecido ovariano criopreservado para cápsula renal e músculo e viram desenvolvimento folicular em todos os implantes, além de terem obtido doze embriões através de ICSI, que resultaram em três nascidos vivos.

Em ratas, Sugimoto et al. (2000) demonstraram desenvolvimento folicular através de histologia, após transplantarem fragmentos de ovários para a cápsula renal, em todos os nove animais estudados. Também em 2000, Kagabu & Umezu realizaram transplante de ovários de ratas congelados para a cavidade uterina e mostraram, à histologia, sobrevivência folicular de apenas 11%. Já Yin et al. (2003), relataram gravidez em ratas após transplante de tecido ovariano congelado e descongelado com sobrevivência de 4 dos 7 (57%) fragmentos criopreservados.

Gosden et al. (1994) obtiveram duas gestações normais em 6 ovelhas, uma a partir de transplante autólogo de tecido ovariano fresco e outra após congelamento. Salle et al. (1998) mostraram desenvolvimento normal de folículos em fragmentos corticais de ovário de 6 ovelhas transplantados para o hilo ovariano contralateral após congelamento.

Folículos primordiais até os estágios antrais foram encontrados na análise histológica em todos os casos. Baird et al. (1999) descreveram apenas 7% de perda de folículos após congelamento e transplante autólogo em 8 ovelhas. Aubard et al. (1999) observaram desenvolvimento folicular em 6 ovelhas que tiveram ovários congelados reimplantados. Salle et al. (2003) descreveram 4 gestações em ovelhas que receberam ovários descongelados. Também em 2003, Bedaiwy et al. relataram preservação, em curto prazo, de tecido ovariano criopreservado transplantado em 100% dos casos e níveis de FSH semelhantes ao período pré re-implantação. Almodin et al. (2004) realizaram criopreservação de tecido ovariano e o transplantaram após irradiação, obtendo gravidez espontânea nas duas ovelhas. Arav et al. (2005) realizaram transplante de ovário inteiro criopreservado com anastomose vascular para o hilo ovariano contra-lateral e relataram atividade progestogênica, após 24-36 meses do reimplante, em 3 animais. Foi realizado, em duas, coleta oocitária e FIV, com posterior desenvolvimento de embrião de 8 células. Em 2006, Imhof et al. relataram uma gravidez espontânea após transplante de ovário inteiro com anastomose vascular em ovelhas.

Em humanos, os primeiros a descrever reimplante de fragmento ovariano descongelado foram Oktay & Karlikaya (2000) que relataram caso com crescimento folicular e ovulação, após uso de hCG e Oktay et al. (2000) que relataram sinais de desenvolvimento folicular e produção hormonal, 4 meses após o transplante. Posteriormente, Oktay et al. (2001b) relataram novo caso de ovulação após reimplante de fragmentos congelados, novamente para o tecido subcutâneo. Radford et al. (2001) também observaram ovulação em uma paciente com reimplante de ovário descongelado. Callejo et al., em 2001, descreveram restabelecimento da função ovariana, 3-4 meses após transplante de tecido ovariano para a parede abdominal. Oktay et al. (2004) obtiveram embrião de 4 células, a partir de oócito

aspirado de ovário reimplantado em tecido subcutâneo, 6 anos após a mulher ter sido submetida à quimioterapia. Tryde-Schmidt et al. (2004) relataram o caso de uma paciente com câncer que teve fragmentos de ovário transplantados ortotopicamente, após apresentar falência ovariana secundária à quimioterapia. No seguimento, houve aumento dos níveis de estradiol, decréscimo das gonadotrofinas, 3 episódios menstruais e captação de um oócito em metáfase 2 (M2) após estimulação. Kim et al. (2004) confirmaram restauração de função hormonal, após reimplante de ovários descongelados em duas pacientes, em tecido subcutâneo. Ainda em 2004, Donnez et al. descreveram gravidez espontânea, após reimplante de tecido ovariano descongelado sobre ovário remanescente. Schmidt et al. (2005) publicaram seu acompanhamento de 22 pacientes pós quimioterapia e transplante de tecido ovariano criopreservado, mostrando que 59% dessas mulheres ainda menstruavam e 45% apresentavam função endócrina preservada, após 18 meses do transplante. Wolner-Hassen et al. (2005) relataram caso em que houve desenvolvimento de 2 folículos em fragmento de ovário descongelado e transplantado para o antebraço. Houve manutenção da função por um período de 7 meses. Oktay & Oktem (2005) descreveram o caso de duas pacientes submetidas à quimioterapia e posterior transplante de tecido ovariano criopreservado para o subcutâneo do braço. As duas voltaram a apresentar desenvolvimento folicular, sendo que uma foi submetida a ICSI e a outra teve duas gravidezes espontâneas e um nascimento. Ainda em 2005, Meirrow et al. descreveram FIV e posterior gravidez após reimplante de tecido ovariano criopreservado para o ovário remanescente. Demeestere et al. e Rosendahl et al., em 2006, publicaram relatos de gravidezes espontâneas e após FIV, em mulheres submetidas a transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado para o ovário remanescente. Donnez et al. (2006) relataram retorno da função ovariana, demonstrada objetivamente através de ciclos ovulatórios, apesar de aumento expressivo de FSH em cada um desses ciclos, em uma mulher

submetida a transplante de tecido ovariano congelado/descongelado para uma janela peritoneal próxima ao ovário. Anderson et al. (2007) (*in* Demeestere et al., 2007) relataram o terceiro caso de nascimento a partir de transplante ovariano autólogo e ICSI. Segundo Demeestere et al. (2007), já foram descritos mais de 25 casos de transplante ortotópico e/ou heterotópico em humanos de tecido ovariano criopreservado e apenas 4 nascimentos a partir dessa técnica, sendo duas gestações obtidas através de fertilização assistida e as outras duas a partir de ciclos naturais, sendo o quarto descrito no próprio estudo.

Apesar desses relatos de gravidezes em humanos, ainda permanecem dúvidas a respeito da origem desses oócitos, já que, em todos os casos, havia ovário residual que poderia ter reassumido sua função (Oktay, 2006b). Diversos estudos (Schimmer et al., 1998; Kasteren & Schoemaker, 1999) têm mostrado que, apesar de pequena, existe a chance de recuperação da função endócrina ovariana após químio e radioterapia com posterior gravidez. Sanders et. al. (1996) acompanharam 708 mulheres tratadas com altas doses de quimioterápicos e irradiação ionizante para tratamento de anemia aplásica e leucemias e observaram a normalização da função ovariana em 10 e gravidez espontânea em 32. Oktay & Oktem (2005) relataram o caso de uma paciente que, após ser submetida à quimioterapia, apresentou falência ovariana. Após transplante de tecido ovariano para o braço, o ovário voltou a apresentar função normal, levando, inclusive, ao nascimento de uma criança.

Ao extrapolarmos o uso dessa técnica para humanos, especificamente para mulheres portadoras de tumores malignos, não podemos nos esquecer do risco de transmissão de células malignas, através do tecido utilizado, com possibilidade de recidiva da doença, após o transplante.

Shaw et al. (1996) mostraram a transmissão de linfoma, em 7 de 7 fêmeas de camundongos, após transplante de tecido ovariano fresco e em 6 de 7 destes animais, que receberam transplante após congelamento. Entretanto, Kim et al. (2001) relataram que tecido ovariano retirado de pacientes com linfoma de alto grau é seguro para o transplante. Essa segurança foi testada através do xeno-transplante de tecido ovariano humano de pacientes com câncer para ratas imunodeficientes, sendo que nenhum dos animais transplantados desenvolveu a doença. No grupo controle, todos os ratos que receberam fatias de linfonodo contendo células de linfoma não Hodgkin desenvolveram linfoma de células B.

Ainda assim, com o objetivo de minimizar o risco de criopreservar tecido ovariano com metástase, deve-se sempre proceder à avaliação histológica em múltiplos fragmentos de tecido. Nos casos de leucemia ou linfoma, marcadores cromossômicos ou tumorais devem ser estudados através de imunohistoquímica, citometria de fluxo ou outros métodos moleculares e/ou genéticos para procurar por células cancerosas (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology, 2006).

Nosso estudo demonstrou que ovários congelados e posteriormente descongelados e transplantados para o peritônio sem anastomose vascular em ratas preservam a função endócrina. Estes achados podem auxiliar no desenvolvimento de protocolos de transplante autólogo de ovários humanos para mulheres com risco aumentado de falência ovariana, incluindo aí pacientes submetidas a tratamento radio e/ou quimioterápico, cirurgias castradoras, mulheres que desejam postergar a maternidade.

Além desse benefício, outras perspectivas futuras surgem para o uso do transplante ovariano. A sua utilização em substituição à terapia de reposição hormonal do climatério seria uma alternativa mais fisiológica. Com o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras cada vez mais potentes e com menos efeitos colaterais, para a prevenção da rejeição de tecidos não-autólogos e com o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação e de crioprotetores, poderia se pensar em um banco de tecido ovariano. Entre as pacientes que se beneficiariam da existência desse tipo de banco, estão as portadoras de disgenesia gonadal, aquelas com falência ovariana precoce e até mesmo mulheres que tiveram que atrasar o projeto maternidade.

A criopreservação de tecido ovariano ainda deve ser considerada como protocolo experimental em pacientes cuidadosamente selecionadas, considerando-se apenas a possibilidade futura do uso. Como ainda existem diversos questionamentos a respeito de quais são as melhores candidatas, qual o melhor método para a retirada do tecido, qual a melhor forma de congelamento/descongelamento, se o(s) ovário(s) deve ser criopreservado(s) inteiro(s) ou em fatias e qual o tamanho dessas fatias, qual o melhor local para o transplante e se deve ser realizada anastomose vascular ou não, preconiza-se que novos estudos científicos experimentais ainda devem ser realizados, inclusive avaliando se essa é a melhor forma de preservação da fertilidade nesse tipo de paciente.

## **7 – CONCLUSÃO**

O transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas castradas, após congelamento e descongelamento, restaura o ciclo estral desse animal e o desenvolvimento folicular adequado, havendo evidências da ocorrência de ovulação nos implantes.

## REFERÊNCIAS

AKAR, M.; OKTAY, K. Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. **Trends Endocrinol Metab**; v.16, n.8: p.374-380, 2005.

ALMODIN, C.G. et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. **Hum Reprod**; v.19, n.6: p.1287-93, 2004.

ALBERTI, L.R. et al. Implante autólogo no omento maior: estudo experimental. **RBGO**; v.24, n.3: p.187-192, 2002.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). [www.cancer.org](http://www.cancer.org) - estimated new cancer and death for 2007 and 2008, 02/2008.

ARAV, A. et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. **Hum Reprod**; v. 20, n. 12: p. 3554-3559, 2005.

AUBARD, Y. et al. Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. **Hum Reprod**; v.14, n.8: p.2149-2154, 1999.

BAIRD, D.T. et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196 C. **Endocrinology**; v.140, n.1: p.462-471, 1999.

BAIRD, D.T. et al. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and autotransplantation of cryopreserved cortical strips. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**; v.113: p.55-59, 2004.

BARROS, F.S.V. Transplante de tecido ovariano autólogo em peritônio de ratas. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

BARROS, F.V. et al. Intraperitoneal autologous ovarian transplantation. **Fertil Steril**; v. 76, n.3S: p.218, 2001.

BEDAIWY, M.A. et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. **Fertil Steril**; v.79: p.594-602, 2003.

BISHARAH, M.; TULANDI, T. Laparoscopic preservation of ovarian function: an underused procedure. **Am J Obstet Gynecol**; v.188: p.367-370, 2003.

BLATT, J. Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. **Med Pediatr Oncol**; v.33: p.29-33, 1999.

BLUMENFELD, Z. et al. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotropin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. **Hum Reprod**; v.11: p.1620-1626, 1996.

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

BLUMENFELD, Z. et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. **Fertil Steril**; v.89, n.1: p.166-173, 2008.

BORINI, A. et al. Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**; v.82: p.601-605, 2004.

BRISTOW, R.E. et al. Impact of surgeon specialty on ovarian-conserving surgery in young females with an adnexal mass. **J Adolesc Health**; v.39, n.3: p.411-416, 2006.

BUTCHER, R.L.; COLLINS, W.E.; FUGO, N.W. Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17  $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocr**; v.94: p.1704-1709, 1974.

CABRAL, A.C.V. et al. **Manual para elaboração e apresentação de dissertações e teses no curso de pós-graduação em ginecologia e obstetrícia**; Escola de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, 2001. 27 p.

CALLEJO, J. et al. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. **J Clin Endocrinol Metab**; v. 86, n.9: p.4489-4494, 2001.

CALLEJO, J. et al. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. **Fertil Steril**; v.72: p.513-517, 2002.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Hum Reprod**; v.10: p.2334-2338, 1995.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Hum Reprod**; v.15, n.6: p.1300-1304, 2000.

COOPER, M. Ethics and Laboratory animals. **Vet Rec**; v.116: p.594-595, 1985.

COX, S.L.; SHAW, J.M.; JENKIN, G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. **J Reprod Fertil**; v.107: p.315-322, 1996.

DANFORTH, D.R.; ARBOGAST, L.K.; FRIEDMAN, C.I. Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. **Fertil Steril**; v.83: p.1333-1338, 2005.

DEMEESTERE, I. et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. **Hum Reprod**; v.21, n.8: p.2010-2014, 2006.

DEMEESTERE, I. et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. **Oncologist**; v.12: p.1437-1442, 2007.

DEANESLY, R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **J Endocr**; v.11: p.197-200, 1954.

DEANESLY, R. Cyclic function in ovarian grafts. **J Endocr**; v. 13: p.211-220, 1956.

DISSEN, G.A. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. **Endocrinology**; v. 134: p.1146-1154, 1994.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**; v.364: p.1405–1410, 2004.

DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**; v.12, n.5: p.519-535, 2006.

FRANÇA, J.L. et al. **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. 7a ed. Rev. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2004. 242 p.

FREEMAN, M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL E.; NEIL, J. D. **The Physiology of Reproduction**, ed. Raven Press, New York, 1994.

FRIEDER, S.; GIUDUCE, L.C.; LAMB, E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertil Steril**; v.49: p.743– 764, 1988.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reprod Biomed Online**; v.9: p.680–691, 2004.

GEBER, S.; SALES, L.; SAMPAIO, M.A.C. Laboratory techniques for human embryos. **Reprod Biomed Online**; v.5, n.2: p.211-218, 2002.

GODING, J.R.; McCracken, J.A.; BAIRD, D.T. The study of ovarian function in the ewe by means of a vascular autotransplantation technique. **J Endocr**; v. 39: p. 37-52, 1967.

GOLDMAN, B.D. et al. Temporal relationship of progestin secretion, LH release and ovulation in rats. **Endocr**; v.85: p.1137-1144, 1969.

GOSDEN, R.G. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. **Hum Reprod**; v.9: p.597– 603, 1994.

GREEN, S.H.; SMITH, A.U.; ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in ovarian autografts after freezing and thawing. **J Endocr**; v.13: p.330-334, 1956.

GUNASENA, K.T. et al. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. **Hum Reprod**; v.12: p.101-106, 1997.

HARP, R. et al. Cryopreservation of murine ovarian tissue. **Cryobiology**; v.31: p.336-343, 1994.

HERNANDEZ-FONSECA, H. et al. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. **Fertil Steril**; v.81: p.888–892, 2004.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **Reprod Biomed Online**; v.10: p.729-734, 2005.

IMHOF, M. et al. Orthotopic microvascular re-anastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and life birth. **Fertil Steril**; v.85, n.1: p.1208–1215, 2006.

INSTITUTO DO CÂNCER (INCA). [www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/) estimativa de câncer para 2008, 02/2008.

JAIN J.K.; PAULSON R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**; v.86 n.4: p.1037-1046, 2006.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**; v.56: p.106-130, 2006.

KAGABU, S.; UMEZU, M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. **Exp Anim**; v. 49: 17-21, 2000.

KASTEREN, Y.M.; SCHOEMAKER, J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. **Hum Reprod Update**; v.5: p.483–492, 1999.

KIM, S.S. et al. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. **Hum Reprod**; v.16: p.2056–2060, 2001.

KIM, S.S.; HWANG I.T.; LEE H.C. Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. **Fertil Steril**; v.82: p.930 –932, 2004.

KIM, S.S. et al. Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved ovarian tissue after xenotransplantation. **Hum Reprod**; v.20: p.2502–2508, 2005.

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

LEE, D.M. et al. Live birth after ovarian tissue transplant. **Nature**; v.428: p.137–138, 2004.

- LEE, R.K. et al. Blastocyst development after cryopreservation, and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. **J Assist Reprod Genet**; v.22, n.2: p.95-101, 2005.
- LIU, J. et al. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and *in vitro* culture. **Biol Reprod**; v.62, n.5: p.1218-1223, 2000.
- LIU, J. et al. Live offspring by *in vitro* fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biol Reprod**; v.64, n.1: p.171-178, 2001.
- LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Hum Reprod**; v.17, n. 3: p. 605-611, 2002.
- LOBO, R.A. Potential options for preservation of fertility in women. **N Engl J Med**; v. 353: p.64-73, 2005.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**; v.62: p.609-614, 2002.
- MARTINEZ-MADRID, B. et al. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. **Fertil Steril**; v.82, n.5: p.1390–1394, 2004.
- MATTLE, V. et al. Female fertility after cytotoxic therapy-protection of ovarian function during chemotherapy of malignant and non-malignant diseases. **Eur J Haematol**; v.75: p.77-82, 2005.
- MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Hum Reprod Update**; v.7, n.6: p.535-543, 2001.
- MEIROW, D. et al. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. **Hum Reprod**; v.19: p.1294 –1299, 2004.
- MEIROW, D. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **N Eng J Med**; v.353: p.318-321, 2005.
- MEIROW, D. et al. Monitoring the ovaries after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue: endocrine studies, *in vitro* fertilization cycles, and live birth. **Fertil Steril**; V. 87, n.22: p. 418.e7-418.e15, 2007.
- MIGISHIMA, F et al. Successful pregnancies after transplantation of frozen-thawed mouse ovaries into chimeric mice that received lethal-dose radiation. **Fertil Steril**; v. 86, n. 4: p. 1080-1087, 2006.
- MORITA, Y. et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. **Nat Med**; v.6: p.1109 – 1114, 2000.
- NEWTON, H. et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum Reprod**; v.11: p.1487-1491, 1996.

OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biol Reprod**; v.53, n.2: p.295-301, 1995.

OKTAY, K. et al. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Hum Reprod**; v.13: p.1133-1138, 1998.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. **N Engl J Med**; v.342: p.1919, 2000.

OKTAY, K. et al. Ovarian cryopreservation and transplantation: basic aspects. *Mol Cell Endocrinol*; v.27, n.169: p. 105-108, 2000.

OKTAY, K. et al. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips in the forearm. **JAMA**; v.286: p.1490-1493, 2001a.

OKTAY, K.; AYDIN, B.A.; KARLIKAYA, G. A technique for laparoscopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue. **Fertil Steril**; v.75: p.1212-1216, 2001b.

OKTAY, K. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**; v.363: p.837-840, 2004.

OKTAY, K.; TILLY, J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. **Lancet**; v.364: p.2091-2092, 2004.

OKTAY, K. et al. Fertility preservation in breast cancer patients: prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. **J Clin Oncol**; v.23, n.19: p.4347-4353, 2005.

OKTAY, K.; OKTEM, O. Sustained endocrine function and spontaneous pregnancies after subcutaneous transplantation of cryopreserved ovarian tissue in stem cell transplant recipients. **Fertil Steril**; v.84, s. 1, p.S68, 2005.

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

OKTAY, K. et al. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? **Hum Reprod**; v. 21, n.6: p.1345-1348, 2006b.

PARIS, F. et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. **Nat Med**; v.8: p.901-902, 2002.

PARKES, A.S. Survival time of ovarian homografts in two strains of rats. **J Endocr**; v. 13: p.201-210, 1956.

PETROIANU, A.; ALBERTI, L.R.; VASCONCELLOS, L.S. Allogeneic ovarian orthotopic transplantation in rabbits without a vascular pedicle: morphological, endocrinologic, and natural pregnancy assessment. **Transplant Proc**; v.38, n.9: p.3092-3093, 2006.

PONIATOWSKI, B.C. et al. Chemotherapy induced menopause: a literature review. **Cancer Invest**; v.19: p.641-648, 2001.

RADFORD, J.A. et al. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. **Lancet**; v.357: p.1172-1175, 2001.

ROSENDAHL, M. et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. **Hum Reprod**; v.21, n.8: p.2006-2009, 2006.

SALEHNIA, M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. **Exp Anim**; v.51, n.5: p.509-12, 2002.

SALLE, B. et al. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. **Fertil Steril**; v.70: p.124-128, 1998.

SALLE, B. et al. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertil Steril**; v.80, n.1: p.172-177, 2003.

SANDERS, J.E. et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or totalbody irradiation and bone marrow transplantation. **Blood**; v.87: p.3045-3052, 1996.

SCHIMMER, A.D. et al. Ovarian function after bone marrow transplantation. **J Clin Oncol**; v.16: p.2359-2363, 1998.

SCHMIDT, K.L. et al. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. **Hum Reprod**; v.20: p.3539-3546, 2005.

SHAW, J. M. et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. **Hum Reprod**; v.11: p.1668-1673, 1996.

SHAW, J.M. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Mol Cell Endocrinol**; v. 161: p.103-110, 2000.

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: p.890-896, 2006.

SOLEIMANI, J.V. et al. Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. **Hum Reprod**; v. 23, p. 1-8, 2008

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in female patients. **Hum Reprod Update**; v.10: p.251-266, 2004.

SUGIMOTO, M. et al. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. **Theriogenology**; v.15, n.53: p.1093-1103, 2000.

THE PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE; PRACTICE COMMITTEE OF THE SOCIETY FOR ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**; v.86, n.5: p.1142-1477, 2006.

TOBIAS, J. H.; CHAMBERS, T. J.; GALLAGHER, A. The effects of ovarian transplantation on bone loss in ovariectomized rats. **J Endocr**; v.142: p.187-192, 1994.

TRYDE SCHMIDT, K.L. et al. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. **Reprod Biomed Online**; v. 8, n. 4: p. 448-453, 2004.

VAN DEN BROECKE, R. et al. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**; v.97: p.193–201, 2004.

VON EYE CORLETA, H. et al. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. **Fertil Steril**; v.70: p.16-19, 1998.

WALLACE, W.H. et al. Ovarian failure following ovarian irradiation in childhood. The radiosensitivity of human oocyte. **Br. J. Radiol**; v.62: p.995–998, 1989.

WALLACE, W.H. The radiosensitivity of the human oocyte. **Hum. Reprod**; v.18: p.117–121, 2003.

WANG, X. et al.. Fertility after intact ovary transplantation. **Nature**; v.415: p.385, 2002a.

WANG, H. et al. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. **Am J Obstet Gynecol**; v.187, n.2: p.370-4, 2002b.

WAXMAN, J. Gonadotrophin hormone releasing analogues open new doors in cancer treatment. **Br Med J**; v.295: p.1084 –1085, 1987.

WEISSMAN, A. et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. **Biol Reprod**; v.60: p.1462–1467, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (**WHO**). [www.who.int/cancer/statistics](http://www.who.int/cancer/statistics), 02/2008.

WOLNER-HANSEN, P. et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4<sup>1/2</sup> years after autologous stem cell transplantation. **Acta Obstet Gynecol Scand**; v.84: p.695–698, 2005.

WU, J.; ZHANG, L.; WANG, X. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. **Reproduction**; v.121: p.389-393, 2001.

YIN, H. et al. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. **Hum Reprod**; v. 18, n.6: p. 1165-1172, 2003.

YANG, H.Y. et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**; v.131: p.851-859, 2006.

## ANEXO A

Autorização do CETEA:



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **101/05** relativo ao projeto intitulado "*Indução da foliculogênese após transplante autólogo de ovários congelados/descongelados em peritônio de ratas*", que tem como responsável Selmo Geber, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **09.11.2005**.

Este certificado expira-se em **09.11.2010**

### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **101/05** related to the project entitled "*Folliculogenesis induction after autologous transplantation of frozen/thawed ovaries into rat peritoneum*", under the supervision Selmo Geber, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **09.11.2005**.

This certificate expires in **09.11.2010**.

Belo Horizonte, 11 de outubro de 2005

*Emília Sakurai*  
Dra. **EMÍLIA SAKURAI**

VICE-COORDENADORA DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais - Reitoria - Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 - Fax: (31) 3499-4027 - Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)-  
Email - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)