

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA FERTILIDADE
E DA RESERVA OVARIANA COM O USO DE
ANTAGONISTAS DO GnRH EM RATAS
SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA COM
CICLOFOSFAMIDA**

Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos

Belo Horizonte

2008

CLÁUDIA NAVARRO CARVALHO DUARTE LEMOS

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA FERTILIDADE
E DA RESERVA OVARIANA COM O USO DE
ANTAGONISTAS DO GnRH EM RATAS
SUBMETIDAS À QUIMIOTERAPIA COM
CICLOFOSFAMIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Saúde da Mulher.

Orientador: Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG

2008

À memória de meu pai, João Bosco, pelo amor com que me educou.

À minha mãe, Rita de Cássia, pelo carinho e exemplo de integridade.

Ao meu irmão, Eduardo, exemplo constante de ética e seriedade.

Ao José Carlos, pela cumplicidade, incentivo e compreensão.

Ao Zezinho, razão de todas as minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos, orientador desta tese, meu reconhecimento pelo papel fundamental em minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela co-orientação neste estudo e pelos ensinamentos acadêmicos durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bambirra, pela ajuda no estudo histológico desta pesquisa.

Aos acadêmicos Guilherme Nogueira Pena e Laila Cristina Silveira, pela disponibilidade, competência e seriedade e cuja ajuda foi imprescindível na realização do estudo experimental.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos, Hospital das Clínicas, UFMG: Prof^ª. Dra. Márcia Mendonça Carneiro, Dr^ª. Inês Katerina Cavallo, Dr. Francisco de Assis Pereira, Dr. Fábio Peixoto, Dr^ª. Márcia Cristina França Ferreira, Dr. Rubens Tavares, Dr^ª. Estefânia Magalhães; Dr^ª. Carolina Passos, Dr^ª. Ana Luiza Lunardi, Dr^ª. Flávia Oliveira, Dr^ª. Simone Néri, bioquímico Marco Aurélio Fernandes, bióloga Verônica Lobach, enfermeira Edna, secretárias Juliana e Eliane, ex-residentes e todos aqueles cujo convívio e apoio durante estes anos tornaram prazerosos os momentos de trabalho.

À bióloga Maria das Graças Rocha Santana de Camargos, pela amizade, companheirismo e exemplo de ética e profissionalismo.

Aos Profs. Agnaldo Lopes da Silva Filho, Cláudia Ramos de Carvalho Ferreira, e Débora Randazzo Barbosa de Magalhães, pelas pertinentes sugestões no Exame de Qualificação.

Às minhas colaboradoras, Licinha, Edilene, Bete e Flora, sem a ajuda das quais eu não poderia ter me dedicado ao meu crescimento profissional.

À Clínica Hematológica, na pessoa do Dr. Ricardo Vilas Freire, pelo fornecimento da ciclofosfamida (Genuxal®) utilizada neste estudo.

À Sero Indústria Farmacêutica, pela colaboração na literatura científica e fornecimento do GnRHant, cetrotrelis (Cetrotide®), utilizado neste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu desenvolvimento profissional.

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

O desenvolvimento de terapias cada vez mais eficazes para as neoplasias malignas tem permitido a sobrevivência das portadoras dessas doenças. Entretanto, essas terapias podem levar a consequências indesejáveis, como a perda da função reprodutiva. A literatura tem demonstrado que pacientes pré-púberes são mais resistentes a essa perda, sugerindo que os quimioterápicos atuam principalmente em células germinativas em crescimento. O objetivo deste trabalho foi investigar se a manutenção dessas células em estado de repouso, com o uso de antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHant), promoveria proteção ovariana adequada, com conseqüente preservação da fertilidade. Para isto, realizou-se um estudo prospectivo, controlado, , no biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, no período de março a setembro de 2007. Utilizou-se 42 ratas *wistar* que foram divididas em quatro grupos: grupo I: nove ratas - receberam injeção de placebo (P) + placebo (P + P); grupo II: 12 ratas - receberam injeção de placebo + ciclofosfamida (CFA) para avaliar o efeito da CFA na fertilidade e na função ovariana (P + CFA); grupo III: 12 ratas - receberam injeção de GnRHant + CFA para avaliar o efeito protetor do GnRHant na fertilidade e na função ovariana das ratas submetidas à CFA (GnRHant + CFA); grupo IV - nove ratas: receberam injeção de GnRHant para avaliar-se o efeito do GnRHant na fertilidade e na função ovariana (GnRHant + P). Após o uso das medicações, estudou-se o ciclo estral das ratas e as mesmas foram expostas ao cruzamento, investigando-se o número de filhotes em cada grupo. Posteriormente, as ratas foram sacrificadas e os ovários foram preparados para estudo histológico. Calculou-se a área do corte axial de cada ovário e contou-se o número de folículos primordiais – primários, pré-antrais, antrais e corpos lúteos. Todas as ratas, com exceção de uma do grupo II (P + CFA), apresentaram ciclo estral regular. A análise estatística mostrou que o grupo que recebeu GnRHant previamente à CFA (GnRHant + CFA) teve número de filhotes significativamente mais alto ($7 \pm 1,31$) que o do grupo tratado apenas com CFA ($p < 0,05$), mas ainda inferior ao do grupo-controle ($p > 0,05$). O grupo que recebeu apenas GnRHant não diferiu do controle. Em relação à área do corte ovariano, esses valores não apresentaram diferença estatística. A análise do número de folículos não encontrou diferença estatística entre os grupos estudados ao se avaliar cada tipo de folículo isoladamente, mas o grupo tratado apenas com GnRHant (GnRHant + P) apresentou número total de folículos estatisticamente mais alto que o grupo-controle ($17,11 \pm 22$), com $p < 0,05$. Estes dados sugerem que o uso do GnRHant cetrorelix proporciona proteção da fertilidade em ratas submetidas à quimioterapia com ciclofosfamida.

Palavras-chave: Preservação da fertilidade. Quimioterapia. Gonadotoxicidade. Antagonista do GnRH. Falência ovariana prematura.

ABSTRACT

Improvements in the success of cancer treatments have resulted in a significant increase in life expectancy. However, these therapies can have some undesirable consequences, as the loss of gonadal function what can result in Premature Ovarian Failure. It has been shown that pre-puberty patients are more resistant to this loss, suggesting that the chemotherapies act mainly in the growing gonadal cells. The purpose of this study was to demonstrate that the maintenance of these cells in rest state with the use of antagonists of GnRH, would promote an adequate ovarian protection, and consequently preserve the fertility. It was a prospective study with Wistar rats divided into four groups: Group I: nine rats that received injection of placebo (P) plus placebo (P + P); group II: twelve rats that received injection of placebo (P) + cyclophosphamide (CFA) to evaluate effects of the CFA in the fertility and the ovarian function (P + CFA); group III: twelve rats that received injection of GnRH antagonist cetorelix + CFA to evaluate the protective effect of the antagonist GnRH in the fertility and in ovarian function of the rats submitted to CFA (GnRHant + CFA); group IV: nine rats that received injection of GnRH antagonist (GnRHant) - cetorelix to evaluate the effect of the GnRHant in the fertility and in ovarian function (GnRHant + P). After the use of the medications, the estral cycle was studied. The rats were matched, and the number of baby rats was evaluated in each group. After the birth, the rats were sacrificed and the ovaries were prepared for histological study. The area of the axial cut was calculated in each ovary and the number of follicles was counted. All of them, apart from one rat of Group II (P + CFA), presented regular estral cycle. The statistics analysis showed that the group that received GnRHant previously to the CFA (GnRHant + CFA) had a significantly bigger number of baby rats ($7 \pm 1,31$) than the group that received only CFA ($p < 0,05$), but still less than the control group ($p > 0,05$). The group that received only GnRHant did not differ from controls one. In relation to the ovarian cut area, these values did not present statistical difference. The analysis of the number of follicles did not find difference statistic, when each type of follicle was evaluated separately, but the group treated only with GnRHant (GnRHant + P) presented a bigger number than the control group ($17, 11 \pm 22$), what was statistically significant ($p < 0,05$). This data suggests that the use of the GnRHant: cetorelix, before the chemotherapy with cyclophosphamide, can present a fertility protection.

Key-words: Fertility preservation. Chemotherapy. Gonad toxicity. GnRH-antagonist. Premature ovarian failure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Hormônio antimulleriano
ANOVA	Análise de variância
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CAA	Cloroacetaldeído
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA	Ciclofosfamida
CL	Corpo lúteo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Estradiol
FA	Folículo antral
FOP	Falência ovariana prematura
FPA	Folículo pré-antral
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRH _a	Análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRH ant	Antagonista do hormônio liberador de gonadotrofinas
HE	Hematoxilina-eosina
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
NaCl	Cloreto de sódio
P	Placebo
QT	Quimioterapia
N	Nitrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
μm	Micrômetro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 - Estrutura da ciclofosfamida (CFA).....	17
Figura 2 - Metabolismo da ciclofosfamida (CFA).....	19
Figura 3 - Estrutura do cetorelix.....	30
Figura 4 - Metabolismo do cetorelix.....	32
Figura 5 - Mecanismo de inibição da ação da ciclofosfamida pelo GnRHant.....	33
Figura 6 - Biotério da Faculdade de Medicina UFMG.....	37
Figura 7 - Gaiolas utilizadas no experimento.....	38
Figura 8 - Rata <i>wistar</i>	38
Figura 9 - Lavado vaginal de ratas.....	40
Figura 10 - Cronologia do estudo experimental.....	44
Figura 11 - Corte ovariano de rata <i>wistar</i> após o tratamento.....	60

Gráficos

Gráfico 1 - Comparação do número médio de filhotes entre os grupos de tratamento.....	49
Gráfico 2 - Comparação da área média do corte ovariano entre os grupos de tratamento.....	51
Gráfico 3 - Comparação do número médio de folículos primordiais e primários entre os grupos de tratamento.....	53
Gráfico 4 - Comparação do número médio de folículos pré-antrais entre os grupos de tratamento.....	54
Gráfico 5 - Comparação do número médio de folículos antrais entre os grupos de tratamento.....	56
Gráfico 6 - Comparação do número médio de corpos lúteos entre os grupos de tratamento.....	58
Gráfico 7 - Comparação da média do número total de folículos entre os grupos de tratamento.....	59

Quadros

Quadro 1 - Opções de preservação de fertilidade em pacientes que se submeterão à

QT.....	34
Quadro 2 - Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo P + P.....	46
Quadro 3 - Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo P + CFA.....	46
Quadro 4 - Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo GnRHant + CFA.....	47
Quadro 5 - Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo GnRHant + P.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de ratas que apresentaram ciclo estral após o tratamento.....	45
Tabela 2 - Número de filhotes em cada grupo de tratamento.....	48
Tabela 3 - Área dos cortes ovarianos.....	50
Tabela 4 - Número de folículos primordiais e primários em cada grupo de tratamento.....	52
Tabela 5 - Número de folículos pré-antrais em cada grupo de tratamento.....	53
Tabela 6 - Número de folículos antrais em cada grupo de tratamento.....	55
Tabela 7 - Número de corpos lúteos em cada grupo de tratamento.....	57
Tabela 8 - Número total de folículos em cada grupo de tratamento.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Sobrevida em pacientes com neoplasias malignas.....	15
1.2 Ciclofosfamida e sua ação na fertilidade.....	17
1.2.1 Ciclofosfamida.....	17
1.2.1.1 Absorção.....	18
1.2.1.2 Distribuição.....	18
1.2.1.3 Transporte.....	18
1.2.1.4 Metabolismo.....	18
1.2.1.5 Excreção.....	19
1.2.1.6 Mecanismo de ação.....	19
1.2.1.7 Toxicidade.....	21
1.2.2 Ação na fertilidade.....	21
1.3 Preservação da fertilidade em pacientes submetidas à QT.....	24
1.3.1 Antagonista do GnRH (cetorelix).....	30
1.3.1.1 Absorção.....	31
1.3.1.2 Distribuição.....	31
1.3.1.3 Metabolismo.....	31
1.3.1.4 Mecanismo de ação.....	32
1.3.1.5 Excreção.....	33
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivo específico.....	36
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 Animais.....	37
3.1.1 Confirmação do ciclo estral.....	39
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Medicação.....	41
3.2.1.1 Placebo.....	41

3.2.1.2 Ciclofosfamida.....	41
3.2.1.3 Antagonista do GnRH (cetorelix).....	41
3.2.1.4 Esquemas de administração.....	41
3.2.2 Confirmação do ciclo estral após o tratamento.....	42
3.2.3 Cruzamento.....	42
3.2.4 Eutanásia e preparo das peças cirúrgicas.....	42
3.2.5 Estudo morfológico dos ovários.....	43
3.3 Análise estatística.....	43
3.3.1 Cálculo amostral.....	43
3.4 Análise dos resultados.....	43
 4 RESULTADOS.....	 45
4.1 Confirmação do ciclo estral.....	45
4.2 Número de filhos.....	48
4.3 Área dos cortes ovarianos.....	49
4.4 Número de folículos e corpos lúteos.....	51
4.4.1 Folículos primordiais e primários.....	51
4.4.2 Folículos pré-antrais.....	53
4.4.3 Folículos antrais.....	54
4.4.4 Corpos lúteos.....	56
4.4.5 Número total de folículos.....	58
 5 DISCUSSÃO.....	 61
 6 CONCLUSÕES.....	 68
 REFERÊNCIAS.....	 69
 ANEXO.....	 77

1 INTRODUÇÃO

Os avanços no tratamento do câncer têm permitido taxas de sobrevida cada vez mais elevadas (ANDERSON *et al.*, 2006; BLUMENFELD, 2001; CARTER *et al.*, 2005; GREEMBERG; URBACH, 2006; HEATH; STERN 2006; MALTARIS *et al.*, 2007). Atualmente, após cinco anos do diagnóstico, essa taxa excede 70% em relação a crianças e adolescentes (DECHERNEY *et al.*, 2005), aproxima-se de 80% naqueles tratados para leucemia linfoblástica aguda e ultrapassa 90% no grupo tratado por linfoma de Hodgkin (LINET *et al.*, 1999; THOMSON; WALLACE, 2002). Com esses progressos, entretanto, os sobreviventes estão expostos às conseqüências da quimioterapia (QT) e/ou radioterapia. A elevada taxa de sobrevida tem gerado grande interesse na qualidade de vida desses pacientes. Hoje tem sido dada mais atenção a esta questão, considerando-se a qualidade de vida física, psicológica, social e espiritual desses sobreviventes (KIM *et al.*, 2001; MAUNSELL *et al.*, 2006; PENTHEROUDAKIS; PAVLIDIS, 2007). Uma qualidade de vida satisfatória deve incluir a capacidade de constituir e criar uma família (MALTARIS *et al.*, 2006; SPEECHLEY *et al.*, 2006).

A perda de função reprodutiva é uma das conseqüências mais importantes da QT e afeta tanto o sexo masculino como o feminino (BINES; OLESKE; COBLEIGH, 1996; BLUMENFELD; HAIM, 1997; GHOSH *et al.*, 2001; GREENBERG; URBACH, 2006; IHA *et al.*, 2001; MARHHOM; COHEN, 2006; OKTAY *et al.*, 2007; SKLAR *et al.*, 2006; SÖNMEZER; OKTAY, 2006; WALLACE; ANDERSON; BAIRD, 2004). A falência ovariana prematura (FOP) ou a perda da função ovariana durante ou logo após o tratamento ocorre em elevado número de mulheres submetidas à QT, principalmente quando realizadas com agentes alquilantes como a ciclofosfamida (CFA). Esses agentes produzem dano ao tecido gonadal, agindo quimicamente com o ácido desoxirribonucléico (DNA) desses tecidos, provocando queda na fertilidade e diminuição da reserva folicular. Mulheres pré-púberes são menos sensíveis aos efeitos deletérios da QT sobre as gônadas (ABSLOM *et al.*, 2006; RIVKEES; CRAWFORD, 1988; WALLACE *et al.*, 1993), provavelmente porque os danos são maiores nas células germinativas em maturação (MALTARIS *et al.*, 2006; TILLY, 1998). Baseado nesta premissa, o uso de medicação capaz de suprimir o funcionamento gonadal mantendo as células germinativas em estado

de repouso poderia promover proteção à fertilidade. O uso de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) parece proporcionar proteção ovariana satisfatória.

Estudos em animais demonstraram efeito positivo dos agonistas do GnRH nessa proteção (ATAYA *et al.*, 1985; 1995; GLODE; ROBINSON; GOUDE, 1981). Entretanto, o uso dos agonistas promove um efeito estimulatório gonadal inicial, retardando a supressão ovariana que ocorrerá após o período de regulação para baixo (aproximadamente 14 dias após a administração). Portanto, seria necessário período mínimo de 14 dias entre o início do uso dos agonistas e o início da QT. Este adiamento para o início do tratamento poderia ser crucial para o mesmo. Os antagonistas do GnRH promovem supressão ovariana imediata, tendo, portanto, papel promissor na proteção ovariana prévia à QT.

1.1 Sobrevida em pacientes com neoplasias malignas

O Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*) nos Estados Unidos cita que entre 1987 e 1999 houve aumento de 0,3% ao ano na incidência de câncer em mulheres. Apesar desse aumento, a mortalidade por câncer em mulheres diminuiu 0,6% ao ano no mesmo período (MARHHOM; COHEN, 2006). Dados do governo americano revelam que, em 2005, 1.372.910 pessoas possuíam diagnóstico de câncer. Destas, aproximadamente 4%, ou 55.000, encontravam-se abaixo de 35 anos de idade (www.seer.cancer.gov). Oktay (2006) relata que, nos Estados Unidos, estima-se que anualmente 13 mulheres em cada 100.000 irão desenvolver câncer. Aproximadamente um em 1.000 adultos atualmente é sobrevivente de câncer (DECHERNEY *et al.*, 2005) e, em 2010, uma em 250 mulheres será sobrevivente de câncer (MALTARIS *et al.*, 2006; MARRHOM; COHEN, 2006). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, em 2008 serão diagnosticados 74.620 novos casos de câncer em mulheres, levando à incidência de 325 casos por 100.000. A taxa de mortalidade no sexo feminino no período de 1995 a 1999 encontrava-se em 56,88 por 100.000 mulheres.

Alguns autores descrevem taxa de sobrevida próxima de 90% para portadores de linfoma de Hodgkin (LINET *et al.*, 1999; MAGRATH, 1997; OKTAY *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, mais de 90% das neoplasias malignas de mama são diagnosticadas em estágio inicial, alcançando taxa de sobrevida acima de 80% em cinco anos (JEMAL *et al.*, 2006). Na Austrália e Nova Zelândia, cerca de 750 crianças e adolescentes recebem

anualmente o diagnóstico de câncer, sendo que atualmente o esperado é que em torno de 75% delas sejam sobreviventes em longo prazo. Uma pesquisa realizada em centros de oncologia pediátrica nesses países mostrou que todos esses centros oferecem criopreservação de sêmen e, apesar de ser experimental, a preservação do tecido ovariano é oferecida em 83% deles. Dois entre 13 desses centros utilizam os análogos do GnRH para proteção da fertilidade em meninas pós-púberes, apesar de não apresentarem protocolos para este uso (HEATH; STERN, 2006).

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

Durante a 4ª Conferência Internacional em Medicina do Câncer em Adolescentes e Jovens (*4th International Conference on Teenage and Young Adult Cancer Medicine*), ocorrida em Londres em março de 2006, especialistas dissertaram sobre a importância de se discutir com os jovens que se submeterão à QT as possíveis consequências do tratamento na sua fertilidade futura e oferecer-lhes as opções cabíveis para manutenção da fertilidade. Adam Glaser afirmou que em uma pesquisa realizada com 271 jovens pacientes portadores de câncer, apenas 34% tinham sido alertados sobre os possíveis danos na fertilidade, sendo que, destes, apenas 27% receberam essa informação antes do início da QT.

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

1.2 Ciclofosfamida e sua ação na fertilidade

1.2.1 Ciclofosfamida

A ciclofosfamida (CFA) (2-[bis-(2-cloroetil) amino]-tetrahydro-2H-1,3,2-oxafosforine-2-óxido) é um agente DNA-alquilante amplamente utilizado no tratamento das neoplasias malignas. Os agentes alquilantes são assim chamados devido à sua habilidade em adicionar grupos alquila a vários grupos eletronegativos sob determinadas condições celulares. No início da década de 1940, sua atividade antitumoral foi demonstrada em murinos e, logo após, ela foi introduzida na quimioterapia clínica. Recentemente, a CFA em baixas doses tem ganhado crescente interesse como agente antiangiogênico ou imunoestimulador em combinação com outras imunoterapias no tratamento do câncer. Além disso, essa droga tem sido utilizada como imunossupressora em combinação com outros imunossupressores no tratamento de algumas doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide. Ela é administrada como pró-droga e requer a ativação pela hidroxilação catalisada pelo citocromo P450 (CYP), resultando em mostardas nitrogenadas citotóxicas capazes de reagir com DNA molecular levando à morte celular e no subproduto acroleína. A CFA é inativada pela N-decloroetilização, resultando em metabólitos N-decloroetilados e o subproduto cloroacetaldeído (CAA). O CAA pode causar neurotoxicidade e nefrotoxicidade e a acroleína induz urotoxicidade (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

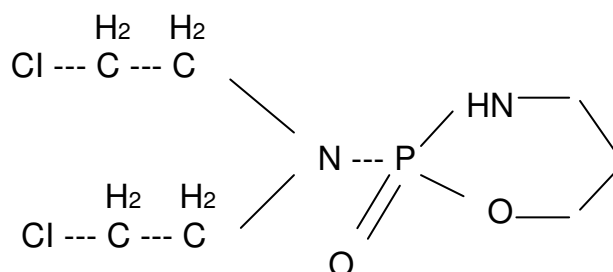


FIGURA 1 - Estrutura da ciclofosfamida (CFA).

Fonte: Adaptado de Zhang, Tian e Zhou (2006).

1.2.1.1 Absorção

A CFA é solúvel em água, salina ou álcool e pode ser administrada via oral ou intravenosa. Em estudos animais, ela pode ser administrada por via intraperitoneal e seu metabolismo se assemelha ao da via intravenosa. O pico de concentração aparece uma hora após a administração oral, com a bioviabilidade em torno de 85 a 100% (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

1.2.1.2 Distribuição

Após a administração venosa ou intraperitoneal, a CFA é rapidamente distribuída no organismo, ligando-se em torno de 20% às proteínas plasmáticas, não sendo estruturalmente modificada pelo plasma sanguíneo. O volume de distribuição está elevado em pacientes obesos, o que leva ao aumento na meia-vida de eliminação (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

1.2.1.3 Transporte

A CFA é altamente hidrofílica e não se difunde prontamente pela barreira lipídica celular. Seus metabólitos 4-OH-CFA e acroleína parecem se difundir prontamente pela membrana celular, por meio da difusão passiva. Entretanto, não se pode afastar a possibilidade do transporte ativo da CFA e seus metabólitos (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

1.2.1.4 Metabolismo

Como uma pró-droga, a CFA é metabolizada no fígado, sendo convertida nas mostardas alquilantes que são seus metabólitos ativos (FIG. 2).

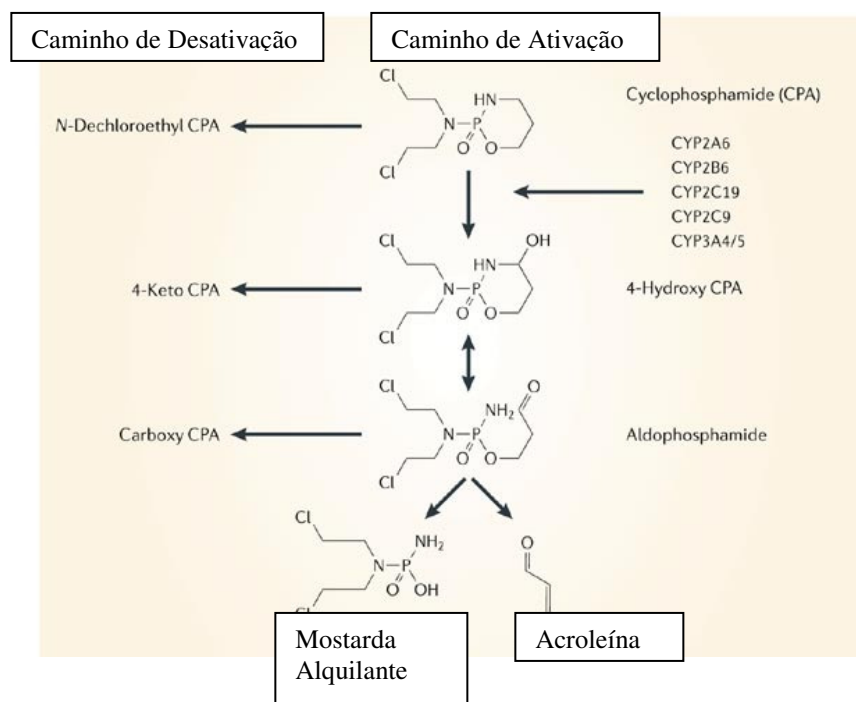


FIGURA 2 - Metabolismo da ciclofosfamida (CFA).

Fonte: Adaptado de Zhang, Tian e Zhou (2006) e Nature Cancer (2006).

1.2.1.5 Excreção

A CFA é excretada primariamente (70%) na urina na forma de seus metabólitos e, em menor extensão, nas fezes. Cerca de 10 a 20% são excretados na forma original pela urina e 4% pela bile (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

1.2.1.6 Mecanismo de ação

A CFA é biologicamente inativa e já é bem documentado que não apresenta ação antineoplásica ou teratogênica sem ser convertida pelas monoxigenases do citocromo P450 em metabólitos alquilantes ativos. As mostardas nitrogenadas alquilantes geradas são capazes de reagir com o átomo nitrogênio-7 de bases purinas no DNA, especialmente quando são estimuladas por guaninas adjacentes. Em pH neutro ou alcalino, as mostardas nitrogenadas são convertidas em íon carbônico quimicamente reativo. O íon carbônico reage com o nitrogênio do resíduo da guanina no DNA, formando uma ligação covalente.

O segundo braço da mostarda fosforamida pode reagir com uma segunda guanina em um DNA oposto, formando uma ligação cruzada. Apesar do bom entendimento da natureza das reações químicas dos agentes alquilantes e moléculas de DNA, os mecanismos da morte das células tumorais ainda não estão totalmente conhecidos. Provavelmente, a CFA destrói as células tumorais pelo apoptose (morte celular programada), iniciada pelo dano do DNA, modulação do ciclo celular e outros efeitos antiproliferativos (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

Os agentes alquilantes atuam por três diferentes mecanismos: a ligação dos grupos alquilas às bases de DNA; resultando na fragmentação do DNA por enzimas reparadoras na tentativa de repor as bases alquiladas, prevenindo assim a síntese de DNA e a transcrição do ácido ribonucleico (RNA) do DNA afetado; dano ao DNA via formação de pontes entre os átomos de DNA, o que impede a separação do DNA para a síntese e transcrição e, através da indução de nucleotídeos despareados levando a mutações.

Acredita-se que o principal mecanismo que resulta na morte celular seja a inibição da replicação do DNA, visto que as pontes interligadas não permitem a separação das duas hélices da sua cadeia. O apoptose induzido pela droga sempre é mediado pelo caminho mitocondrial, levando à ativação do iniciador caspase-9 que, por sua vez, ativa os efetores caspase-3 e caspase-7. Como a CFA pode danificar o DNA durante qualquer fase do ciclo celular e sua toxicidade independe do ciclo celular, ela não é considerada ciclo-fase específica (CHASLE; HOW, 2003; REICHMAN; GREEN, 1994).

Além dos metabólitos finais alquilantes, a acroleína e a CAA também se relacionam à citotoxicidade da CFA.

Recentemente, há evidências da ação da CFA no sistema imune, tanto na imunidade humoral como na celular, o que resulta em efeitos benéficos quando usada como droga imunossupressora. Além disto, a CFA elimina os genitores endoteliais circulantes, que são marcadores da angiogênese tumoral. Estes achados confirmam a racionalidade do uso da droga como agente imunossupressor no tratamento de doenças auto-imunes ou no tratamento do câncer.

1.2.1.7 Toxicidade

Em pacientes com câncer, a CFA é primariamente ativada por CYP3A4, CPY2C9 e CPY2B6 no fígado, seguida pelo transporte hematológico dos metabólitos ativados ao tecido tumoral via circulação sanguínea. Entretanto, estes metabólitos também podem atingir os tecidos normais, provocando toxicidade no hospedeiro. O limite para a dose tóxica é a toxicidade cardíaca pelo dano mitocondrial, causando pericardite exsudativa, miocardite, depressão do miocárdio, arritmias cardíacas e insuficiência cardíaca congestiva. Além da toxicidade cardíaca, podem ser encontradas em pacientes recebendo altas doses de CFA: cistite hemorrágica, retenção hídrica e hiponatremia.

1.2.2 Ação na fertilidade

Os agentes alquilantes como a CFA podem levar à falência ovariana, promovendo menopausa prematura ou, em menor grau, comprometendo a fertilidade. Além do comprometimento da fertilidade, pacientes que desenvolvem menopausa prematura apresentam risco elevado de efeitos adversos relacionados com o estado hipoestrogênico, como sintomas vasomotores, hipotrofia genital, osteoporose, doenças cardiovasculares e disfunção psicossocial (CATER *et al.*, 2005; CHASLE; HOW, 2003; SKLAR *et al.*, 2006). Ganz *et al.* (2003), em estudo de coorte o qual avaliou a qualidade de vida de 577 sobreviventes de câncer de mama, encontraram correlação entre FOP e baixa qualidade de vida, principalmente em pacientes mais jovens.

O risco de comprometimento da fertilidade pela terapia do câncer depende de múltiplos fatores, como o tipo de câncer, fertilidade antes do tratamento, sexo e idade do paciente, tipo e dose da medicação utilizada e o tempo de tratamento (ABSOLOM *et al.*, 2006; ASRM, 2005; BATH *et al.*, 2003; CHASLE; HOW, 2003; HOWELL; SHALET, 1998; IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; JOOHI *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2006; MARHHOM; COHEN, 2006; MEIROW; NUGENT, 2001; MITWALLY, 2007; MOORE; THERIAULT, 2007; OKTAY; SÖNMEZER, 2007; PETREK *et al.*, 2006; SONMEZER; OKTAY, 2006). Em mulheres, a fertilidade pode ser comprometida por qualquer tratamento que diminua o número de folículos primordiais, afete o equilíbrio hormonal ou interfira no funcionamento ovariano, tubário ou uterino. Em tratamentos quimioterápicos,

o principal mecanismo relacionado com a queda na fertilidade é a diminuição da reserva ovariana (MACKIE; RADFORD; SHALET, 1996).

Chiarelli, Marret e Darlington (1999) relataram queda da fertilidade em torno de 18% ao estudarem jovens que haviam sido submetidas à QT. Blumenfeld *et al.* (1999) referem taxas de amenorréia entre 48 e 77% em mulheres submetidas à QT com CFA. Enquanto a FOP ocorre em menos de 1% da população geral, vários autores têm descrito altos índices em mulheres submetidas à QT (MALTARIS *et al.*, 2006). Absolom *et al.* (2006) encontraram taxas de 22,6% de FOP após QT, sendo 45% em pacientes após a menarca e 16,4% quando o tratamento havia ocorrido antes da menarca. Uma em cada sete sobreviventes de câncer deve vir a desenvolver FOP (LARSEN *et al.*, 2003). Chemaitilly *et al.* (2006) referenciaram 6,35% de FOP em 3.390 sobreviventes que se submeteram a tratamento para câncer, com incidência mais elevada entre as que tiveram seu diagnóstico após os 12 anos de idade.

Sklar *et al.* (2006), em estudo retrospectivo envolvendo 126 sobreviventes de câncer, afirmaram que a chance destas pacientes desenvolverem FOP era 14 vezes maior quando comparadas com a população em geral. Pacientes tratadas com CFA apresentaram risco quatro a 9,3 vezes mais alto de desenvolverem menopausa prematura do que o grupo-controle (SÖNMEZER; OKTAY, 2006). Bines, Oleske e Cobleigh (1996) destacam porcentagem média de amenorréia após QT com CFA de 68%, com variação entre 21 e 100%. Em pacientes abaixo de 40 anos, esta média se encontra entre 21 e 71%, enquanto que em pacientes acima dessa idade a média está entre 49 e 100%. Mais da metade de mulheres com menos de 35 anos de idade reassumirá o ciclo menstrual após o término da QT. Após os 35 anos, a baixa reserva folicular aumenta a chance de amenorréia depois da QT (ABSLOM *et al.*, 2006; IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008). Isto ocorre porque, como mulheres jovens têm número de folículos primordiais mais alto, é menos provável que elas percam toda sua reserva ovariana durante a QT. Entretanto, como elas perderam grande proporção dessa reserva, elas ainda estão sujeitas a desenvolver FOP (MARHHOM; OHEN, 2006; SÖNMEZER; OKTAY, 2006; WHITHEAD *et al.*, 1983).

A existência de ciclos menstruais irregulares ou amenorréia não confere necessariamente esterilidade permanente, visto que o efeito deletério ovariano pode ser transitório (BATH *et al.*, 2003; DECHERNEY *et al.*, 2005; LANTINGA *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2003; OTKAY, 2006; SÖNMEZER; OKTAY, 2006). Por outro lado, ciclos menstruais regulares não indicam necessariamente fertilidade normal (BATH *et al.*, 2003; MARHHOM; OHEN, 2006; MOORE; THERIAULT, 2007; OKTAY *et al.*, 2007;

PAPADAKIS *et al.*, 1999; IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008). Larsen *et al.* (2003), ao avaliarem 100 pacientes jovens sobreviventes de câncer e que haviam sido submetidas à QT, verificaram alterações ultra-sonográficas (volume ovariano e contagem de folículos antrais) e hormonais (dosagem de FSH, estradiol - E, inibina A e inibina B) sugestivas de dano gonadal, mesmo naquelas jovens com ciclo menstrual normal.

Lantinga *et al.* (2006) registraram 18,7% de pacientes com FSH elevado em 93 mulheres abaixo de 33 anos, com ciclos menstruais normais, que haviam sido submetidas à QT. A falência ovariana geralmente é diagnosticada após pelo menos duas dosagens de hormônio folículo-estimulante (FSH) acima de 20 mLU/mL. Entretanto, sabe-se que mulheres que apresentam FSH acima de 12 mLU/mL já sofrerão queda na fertilidade.

A maioria dos trabalhos na literatura investiga a ação da QT no ciclo menstrual ou nas dosagens hormonais, com poucas publicações avaliando diretamente a fertilidade. Como a alteração do ciclo menstrual ou a amenorréia podem ser transitórias, estudos que analisam apenas a ciclicidade podem não refletir com segurança a ação na fertilidade. Cerca de seis meses após o fim do tratamento, novo grupo folicular será recrutado, podendo haver retorno da função ovariana e do ciclo menstrual. Como o retorno à ciclicidade menstrual não traduz efetiva preservação da fertilidade, pacientes submetidas à QT devem ser encorajadas a não postergarem a gravidez por muitos anos (IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; MARHHOM; COHEN, 2006). A literatura não tem demonstrado elevação no risco de abortamento ou malformações em pacientes que engravidam longo tempo após a QT (CHASLE; HOW, 2003, IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; HOWELL; SHALET, 1998; REICHMAN; GREEN, 1994).

A combinação entre diferentes agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer tornou mais difícil a avaliação dos efeitos individuais de cada droga. Pesquisa com animais estudando cada droga separadamente facilitou o entendimento dos mecanismos tóxicos de cada uma. Pesquisas com ratas demonstraram que a administração de ciclofosfamida é capaz de levar à diminuição no volume uterino, número total de folículos e células da granulosa (ATAYA; VALERIOTE; RAMAHI-ATAYA, 1989; MULLER; COLE, 1970; PLOWCHALKB; MATTISON, 1992). A maioria dos estudos mostra diminuição no número total de folículos. Enquanto alguns autores encontraram diminuição principalmente dos folículos primordiais, outros mostraram diminuição mais significativa de folículos maiores que 30 µm (BOKSER; *et al.*, 1991; LETTERIE, 2004).

Não se sabe com certeza se a CFA afeta diretamente os corpos lúteos, mas os estudos experimentais sugerem que o número de corpos lúteos está diminuído,

provavelmente devido à diminuição prévia no número de folículos em desenvolvimento (PLOWCHALKB; MATTISON, 1992). A administração repetida da droga, às vezes diariamente, mais que a administração contínua, aumenta o dano celular. Como ela afeta principalmente as células em divisão, dentro da unidade ovariana as células da granulosa são as mais atingidas por serem aquelas que apresentam maior ritmo de divisão. O dano às células da granulosa leva à diminuição da produção estrogênica e aumento das gonadotrofinas, por mecanismo de retrocontrole. Esse FSH elevado acelera o recrutamento folicular e encurta as fases da divisão celular. Isto perpetua um ciclo vicioso no qual a CFA destrói os folículos pelo rápido ataque às células da granulosa, reduzindo sua produção estrogênica, o que leva a aumento na secreção de FSH que, por sua vez, atua aumentando o recrutamento de folículos sensíveis à CFA. Portanto, o recrutamento e a atresia foliculares são acelerados, resultando em depleção folicular prematura com número de folículos em desenvolvimento mais baixo e número de folículos atrésicos mais alto (ATAYA; VALERIOTE; RAMAHI-ATAYA, 1989; LETTERIE, 2004).

Jarrel *et al.* (1987) e Bokser, Szende e Schally (1990) enfatizam que em ratas submetidas ao tratamento com CFA a diminuição da reserva folicular acontece antes do aumento dos níveis de gonadotrofinas, sugerindo que a ação inicial da droga ocorre a partir da inibição direta da secreção de FSH pela hipófise. Em relação ao ciclo estral de ratas, a CFA prolonga a sua duração, com aumento das fases de metestro e diestro e diminuição do estro e proestro (GHOSH *et al.*, 2001).

1.3 Preservação da fertilidade em pacientes submetidas à QT

A determinação do impacto da QT na função reprodutiva é importante antes de se pensar na preservação desta. Como citado anteriormente, esse impacto tem sido investigado a partir da história menstrual, do uso de marcadores bioquímicos como o hormônio antimulleriano (AMH), inibinas, E e FSH e da avaliação ultra-sonográfica do volume ovariano e contagem de folículos antrais (ANDERSON *et al.*, 2006; BATH *et al.*, 2003; BLUMENFELD, 2001; LANTINGA *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2003).

Em 2006, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology - ASCO*) publicou as recomendações para a preservação da fertilidade em pacientes com câncer. Nessas recomendações inclui-se o resultado de uma busca na literatura por artigos relacionados ao tema. A pesquisa bibliográfica foi realizada entre

1987 e 2005 utilizando-se as bases de dados *MEDLINE*, *PreMEDLINE*, *Cochrane Library*, *National Cancer Institute database* e *National Library of Medicine's clinical trials*. O Painel de especialistas selecionou 405 artigos. Não foi possível a realização de metanálises devido ao baixo número de pacientes e heterogeneidade entre os artigos. A revisão da literatura descobriu poucas pesquisas randomizadas ou que apresentem número suficiente de pacientes. A maioria dos dados era de estudos de coorte, série ou relato de casos ou pequenos estudos clínicos não-randomizados. O Painel encorajou o desenvolvimento de estudos adicionais bem desenhados, mas reconheceu que estudos terapêuticos controlados, randomizados ou duplo-cegos em humanos possivelmente não podem ser realizados nesta área.

As opções de preservação da fertilidade em mulheres dependem da idade da paciente, tipo de tratamento, diagnóstico, possibilidade de envolvimento ovariano, se ela tem ou não um parceiro, o tempo disponível antes de se iniciar a QT e o potencial de metástase ovariana (ASRM, 2005; LEE *et al.*, 2006; OKTAY; SÖNMEZER, 2007).

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

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

Os análogos de GnRH promovem supressão ovariana satisfatória a partir da inibição hipofisária da secreção de gonadotrofinas (BLUMENFELD, 2007). Esses medicamentos se dividem em dois grupos: os de ação agonista e os de ação antagonista.

Sabe-se que os agonistas do GnRH inibem a liberação de FSH, hormônio luteinizante (LH) e esteróides sexuais pela dessensibilização dos gonadotrofos, regulação para baixo dos receptores de GnRH e redução do RNA mensageiro nos receptores hipofisários. Isto resulta em menor produção de esteróides e menos diferenciação de células da teca e da granulosa. A ação antigonadotrófica destas drogas pode ser interrompida pelo desligamento do agonista do GnRH previamente ligado ao seu receptor e pode ser reiniciada pela reocupação dos receptores com aquele. Apesar de haver intenso debate sobre a existência ou não de receptores de GnRH nos ovários, essas drogas parecem possuir ação direta nos ovários, ligando-se a receptores específicos no mesmo. Entretanto, o exato mecanismo de ação dos análogos de GnRH ainda é discutido (IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; MALTARIS *et al.*, 2006).

Em relação à possível proteção gonadal em pacientes submetidas à QT, isto ocorre provavelmente devido à sua capacidade de interrupção do estímulo gonadotrófico para os ovários, levando à diminuição do número de mitoses dentro da gônada e, logo, à parada de crescimento. Evidências mostram que o ovário das pacientes pré-púberes são menos sensíveis à ação da QT, talvez porque as células em maturação estariam mais propensas a sofrerem esse dano. Vale lembrar que a CFA atua principalmente no DNA de células em multiplicação e, como o análogo promove repouso no DNA, ele faz de maneira indireta a proteção das unidades funcionais da gônada (BLUMENFELD; ECKMAN, 2005).

Na mulher adulta, os folículos primordiais são responsáveis por 90% da reserva folicular. Esses folículos encontram-se em estado de repouso com o oócito em prófase da primeira divisão meiótica. O crescimento inicial dos folículos primordiais parece ser independente da ação do FSH. Assim que se inicia o desenvolvimento dos folículos secundários, pelo aumento das células da granulosa, estas adquirem receptores para o FSH (EPPIG; WIGGLESWORTH; PENDOLA, 2002; ERICKSON, 2003; HIRSHFIELD, 1991). É possível que a supressão da secreção do FSH preserve esses folículos que iniciaram o crescimento. Estes, entretanto, constituem menos de 10% da reserva ovariana e, uma vez iniciado o crescimento, eles já estariam determinados ao desenvolvimento ou atresia. Parece que o co-tratamento com análogos durante a QT ofereceria proteção ovariana, por retardar o destino desses folículos (MARHHOM; COHEN, 2006).

Recentemente, demonstrou-se que o análogo de GnRH oferece proteção contra o apoptose induzido pela doxorrubicina, sugerindo, mais uma vez, a ação protetora do mesmo nos ovários (GRUNDKER *et al.*, 2000).

Glode, Robinson e Gould (1981) foram os primeiros a testar a proteção gonadal em murinos, verificando aparente proteção ao dano testicular. Outros estudos com roedores confirmaram esses achados (ATAYA *et al.*, 1985; BOKSER; SZENDE; SCHALLY, 1990). Na literatura consultada encontrou-se apenas uma publicação que mostrou ineficácia da proteção ovariana com o uso de agonistas em camundongos fêmeas (LETTERIE, 2004).

Apesar de vários trabalhos experimentais mostrarem efeito positivo na proteção ovariana em ratas, questionou-se o valor desse tratamento em mulheres devido às diferenças entre a foliculogênese em roedores e mamíferos. Entretanto, Ataya *et al.* (1995) encontraram resultados positivos na proteção ovariana em macacas *Rhesus* em QT com ciclofosfamida.

Blumenfeld *et al.* (1996) avaliaram a preservação da função menstrual com o uso de agonista do GnRH em um grupo de 18 pacientes submetidas à QT. Compararam retrospectivamente com um grupo-controle submetido ao mesmo esquema de tratamento. Os resultados mostraram retorno à ciclicidade menstrual em 93% das pacientes que receberam o análogo do GnRH, em contraste com 39% no grupo-controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Pereyra-Pacheco *et al.* (2001) em uma avaliação em 26 pacientes.

Blumenfeld *et al.* (2002) publicaram um estudo clínico, prospectivo, no qual avaliaram o retorno da ciclicidade menstrual e níveis de inibina A e inibina B em mulheres submetidas à QT, com o uso concomitante de triptorelina (GnRH agonista). Os resultados revelaram que a concentração de inibina A, inibina B, FSH e estradiol podem ser úteis como fator prognóstico para predizer o retorno da função ovariana e que o grupo que recebeu o agonista apresentou proteção ovariana em relação ao grupo-controle. Outra pesquisa realizada com 12 pacientes em QT descreveu proteção da função ovariana com acetato de leuprolide (GnRH agonista)- (RECCHIA *et al.*, 2002). Entretanto, o número de pacientes era baixo e alguns esquemas de QT utilizados não continham drogas alquilantes, que sabidamente são as principais responsáveis pelo dano ovariano.

Fox *et al.* (*apud* LEE *et al.*, 2006), em estudo não controlado e com baixo número de pacientes, encontraram retorno à ciclicidade menstrual com os agonistas.

A eficácia na preservação da ciclicidade menstrual foi verificada por Potolog-Nahari, Fishman e Cohen (2007) em uma investigação com nove jovens submetidas à QT e uso concomitante de agonista e antagonista de GnRH. Além do número de pacientes ser baixo, essa pesquisa não tinha grupo-controle.

Um estudo prospectivo, não-randomizado, tendo como controle os dados de estudos publicados anteriormente mostrou retorno à ciclicidade menstrual em 63 de 65 (96,9%) pacientes que utilizaram agonista de GnRH antes e durante o uso de QT. No grupo em que o agonista não foi utilizado, o retorno à ciclicidade ocorreu em 63% dos casos. As pacientes foram acompanhadas por período médio de oito anos e gravidez espontânea ocorreu em 26 pacientes do grupo avaliado contra 20 do grupo-controle, resultado sem significância estatística (BLUMENFELD *et al.*, 2008).

Waxman *et al.* (1987) não encontraram proteção ovariana – avaliada pelo retorno à ciclicidade menstrual – com o uso de agonista do GnRH em um grupo de 18 pacientes submetidas à QT.

A experiência de Imai, Furui e Yakamoto (2008) com o uso de agonistas de GnRH na proteção ovariana de pacientes submetidas à QT, em um trabalho prospectivo com 12 mulheres, revelou efeito positivo nessa proteção.

A maioria das publicações sobre o uso dos agonistas é composta de estudos retrospectivos, relatos de casos ou séries e com baixo número de pacientes e avalia principalmente o retorno da função menstrual e não o da fertilidade. Um estudo clínico prospectivo randomizado está sendo desenvolvido pelo *Southeast Oncology Group* (USA) analisando a prevenção da falência ovariana com o uso de GnRH agonistas, em mulheres com câncer de mama receptor hormonal negativo, em uso de QT. Outra pesquisa randomizada, fase II, coordenada pelo *German Hodgkin's Lymphoma Study Group*, está em andamento investigando a preservação da fertilidade em mulheres tratadas com QT.

Até o momento não existem evidências suficientes sobre a eficácia e segurança do uso de agonistas em pacientes em QT, principalmente em mulheres portadoras de câncer hormônio-dependente (GERBER *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006; OKTAY *et al.*, 2007; SÖNMEZER; OKTAY, 2006; WILDIERS *et al.*, 2006). A segurança desse tratamento tem sido questionada em pacientes com câncer hormônio-dependente, uma vez que ele seria capaz de aumentar os níveis estrogênicos, o que seria indesejável nessas pacientes.

Wildiers *et al.* (2006) descrevem que os resultados do estudo *Text*, no qual se avaliou o uso de GnRH agonistas e tamoxifen *versus* o uso de GnRH agonistas e

exemestane para promover amenorréia em pacientes com câncer de mama hormônio-dependente, poderiam indiretamente sugerir segurança com o uso dos agonistas nessas pacientes. Entretanto, questiona-se se esses dados poderiam ser extrapolados para a combinação GnRHa e CFA. Moore e Theriault (2007) alertam que as outras opções disponíveis no momento para preservação da fertilidade, como a criopreservação de ovócitos ou embriões, necessitam de estimulação hormonal, o que também poderia não ser seguro para essas pacientes. Além disto, provavelmente alto número de mulheres aceitaria se expor a esse baixo e não comprovado risco em prol da conservação da fertilidade. O estudo PROMISE (*Prevention of menopause induced by chemotherapy. A study in early breast cancer patients*), que acompanha pacientes com câncer receptor hormonal positivo e receptor hormonal negativo que foram randomizadas para o uso ou não de análogos após a QT, poderá trazer dados conclusivos sobre a segurança do uso do análogo nessas mulheres (DEL MASTRO; CATZEDDU; VENTURINI, 2006; DEL MASTRO; VENTURINI, 2006; MALTARIS *et al.*, 2006).

Devido à falta de comprovação clínica dos benefícios desses agentes, a ASRM não recomenda seu uso para prevenção do dano reprodutivo em pacientes submetidas à QT (ASRM, 2005). A ASCO, por sua vez, apesar de advertir sobre a falta de dados concretos sobre a segurança desse tratamento em suas diretrizes (LEE *et al.*, 2006), preconiza essa possibilidade como promissora e conclui que dois estudos clínicos fase III em andamento poderão dar evidências definitivas sobre o uso dos agonistas do GnRH na preservação ovariana (*National Cancer Institute: Clinical trials: SWOG S0230 e GIM-6*).

Pacey (2007) sugere o uso dos análogos do GnRH como uma das perspectivas clínicas futuras para preservação da função reprodutiva em pacientes com indicação de QT. Apesar de ainda não haver consenso sobre a questão, Marhhom e Cohen (2006) concluem que os estudos atuais encorajam o desenvolvimento de trabalhos nesse campo.

Analisando as evidências disponíveis no momento, Moore e Theriault (2007) referem que ainda são necessários estudos bem desenhados para se delinear melhor a indicação dos análogos do GnRH na proteção ovariana.

O uso dos agonistas promove efeito estimulatório gonadal inicial, retardando, assim, a supressão ovariana que ocorrerá após o período de regulação para baixo (aproximadamente 14 dias após a administração). Portanto, seria necessário um período mínimo de 14 dias entre o início do uso dos agonistas e o início da QT. Esse tempo de espera poderia ser crucial para o tratamento das neoplasias (BLUMENFELD, 2002).

Os antagonistas de GnRH, por sua vez, atuam promovendo supressão ovariana imediata por intermédio do bloqueio competitivo dos receptores de GnRH em nível hipotalâmico. Kovacs *et al.* (2001) sugerem que eles são capazes também de diminuir o número desses receptores de GnRH, levando a efeito de regulação para baixo, semelhante aos agonistas. Por terem ação imediata, os antagonistas podem ser utilizados imediatamente antes do uso do QT. Com isto, não se precisaria aguardar o período de 14 dias, necessários quando se usam os agonistas de GnRH, antes de se iniciar a QT. Esses medicamentos apresentam, portanto, papel promissor na proteção ovariana prévia à quimioterapia (BLUMENFELD, 2002).

1.3.1 Antagonista do GnRH (cetorelix)

O acetato de cetorelix ((D-Nal;(D-4-cloro [ring-U-C] Phe);D-Pal;D-Cit;D-Ala-NH₂)LH-RH) é um antagonista do GnRH que suprime a função ovariana pela inibição competitiva do LHRH em seu receptor hipofisário. Além de reduzir o número de receptores do GnRH, a droga também diminui a transcrição do RNA mensageiro, levando à dessensibilização dos gonadotrofos hipofisários (PINSKI *et al.*, 1996, SCHWAHN *et al.*, 1999). A FIG. 3 mostra a estrutura do cetorelix.

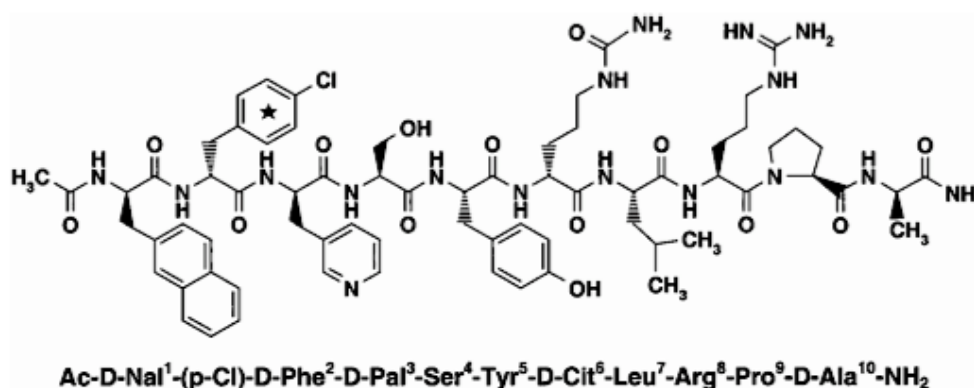


FIGURA 3 - Estrutura do cetorelix.

Fonte: Schwahn, Nagaraja e Derendorf (2000).

1.3.1.1 Absorção

Estudos em ratas demonstraram que o cetorelix é rapidamente absorvido e a concentração máxima da droga é atingida cerca de duas horas após a injeção, sendo que doses farmacologicamente ativas já são encontradas uma hora após a injeção (DIEDRICH *et al.*, 1994; SCHWAHN; NAGARAJA; DERENDORF, 2000).

1.3.1.2 Distribuição

Apenas pequena porcentagem da droga se liga aos eritrócitos. Cerca de 90% da mesma circula ligada a proteínas plasmáticas (SCHWAHN; NAGARAJA; DERENDORF, 2000).

Devido à sua já conhecida ligação aos receptores de GnRH, a concentração hipofisária do cetorelix é cerca de 10 a 20 vezes maior quando comparada com outras áreas cerebrais. Pela mesma razão, a concentração no tecido ovariano também é elevada. A concentração sérica da droga se mostrou menor quando comparada com a concentração hipofisária ou ovariana (SCHWAHN; NAGARAJA; DERENDORF, 2000).

1.3.1.3 Metabolismo

Além do cetorelix, a bile de ratas contém quatro metabólitos relacionados à peptidase. Outros metabólitos formados pela conjugação ou oxidação não são encontrados. A representação esquemática do metabolismo do cetorelix se encontra na FIG. 4.

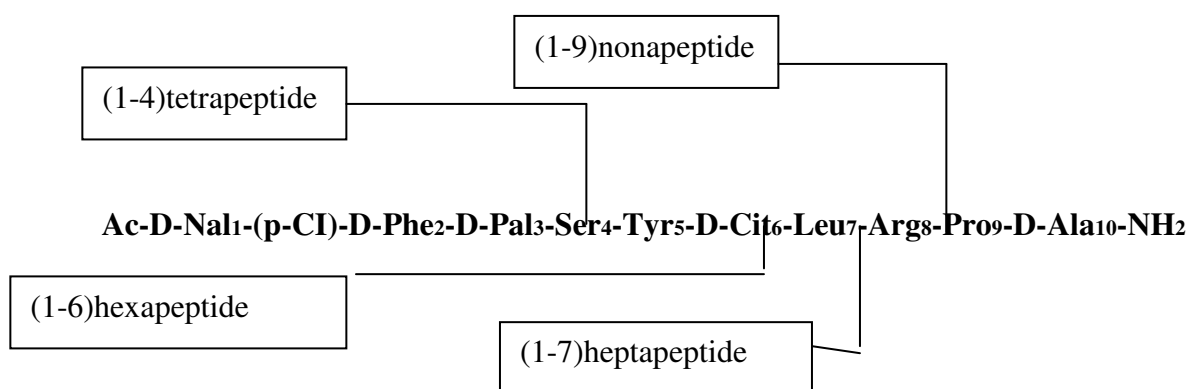


FIGURA 4 - Metabolismo do cetorelix.

Fonte: Schwahn, Nagaraja e Derendorf (2000).

1.3.1.4 Mecanismo de ação

O principal mecanismo de ação do cetorelix baseia-se na ocupação competitiva dos receptores de LH-RH. Entretanto, estudos recentes demonstraram que a administração da droga a ratas promove também regulação para baixo dos receptores hipofisários de LH-RH e diminuição nos níveis de RNA mensageiro, de maneira tempo-dependente (HALMOS; SCHALLY, 2002; KOVACS; SCHALLY, 2001). O grau de supressão na expressão gênica dos receptores hipofisários de LH-RH parece se correlacionar com níveis hipofisários (KOVACS *et al.*, 2001). Estes achados sugeriram que os antagonistas de GnRH promovem a regulação para baixo dos receptores de LH-RH pela ação contrária ao efeito estimulatório do LH-RH endógeno (HALMOS *et al.*, 1996; KOVACS *et al.*, 2001). A administração de cetorelix por 10 dias ou mais leva à forte supressão da expressão gênica dos receptores de GnRH, sem o efeito prévio estimulatório observado com o uso de agonistas de GnRH (KOVACS *et al.*, 2001).

Bokser *et al.* (1991) acompanharam a recuperação da função gonadal de ratas após o uso de antagonista de GnRH e demonstraram que a supressão ovariana provocada pela droga é totalmente reversível. O número de folículos maduros e de corpos lúteos foi significativamente mais baixo no grupo de estudo. Após 42 dias, todas as ratas tratadas recuperaram a ciclicidade estral, confirmado por citologia vaginal. O peso, tamanho e a população folicular ovariana também se igualaram nos dois grupos.

1.3.1.5 Excreção

A excreção da droga ocorre principalmente por via biliar. A excreção fecal verifica-se nas primeiras 48 horas e a urinária representa 25% e ocorre principalmente nas 24 primeiras horas após a injeção (SCHWAHN; NAGARAJA; DERENDORF, 2000).

Meirow *et al.* (2004) avaliaram a ação prévia do cetrorelix em camundongos fêmeas submetidas à QT com CFA. Demonstraram que o uso do cetrorelix diminuiu a redução no número de folículos primordiais provocada pela CFA.

Acompanhando histologicamente os ovários de camundongos fêmeas que receberam CFA, Danforth, Arbogast e Friedman (2005) ressaltaram que cinco desses animais receberam antagonista de GnRH, cinco receberam agonista e cinco receberam apenas CFA. O grupo que recebeu CFA + antagonista apresentou número de folículos primordiais mais baixo quando comparados com o controle ou grupo de agonistas. A proteção ovariana foi avaliada apenas pelo número de folículos primordiais. Não se avaliou a ciclicidade estral ou fertilidade dos animais após os tratamentos.

A FIG. 5 mostra o possível mecanismo de proteção ovariana com o agonista de GnRH em pacientes submetidas à QT com CFA.

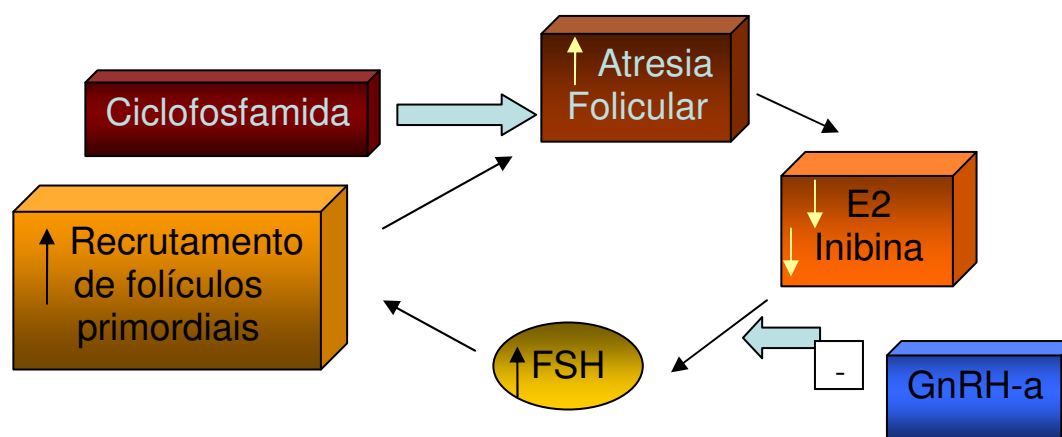


FIGURA 5 - Mecanismo de inibição da ação da ciclofosfamida pelo GnRH-a.

Fonte: Adaptado de “Análogos do GnRH: Fundamentos Terapêuticos” Serono Slide Show.

O QUADRO 1 sumariza as opções de preservação de fertilidade e as considerações sobre cada uma delas, segundo diretrizes da *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* - (LEE *et al.*, 2006), da *American Society for Reproductive Medicine (ASRM)*, adaptado de Imai, Furui e Yakamoto (2008)

QUADRO 1

Opções de preservação de fertilidade em pacientes que se submeterão à QT

Uso de análogos de GnRH

Considerações:

- Protege os ovários da ação tóxica da CFA.
- Uso antes e concomitante à QT.
- Alguns estudos randomizados e séries de casos.
- Custo mais baixo quando comparado às outras opções.
- Sem comprovação da segurança em neoplasias hormônio-dependente.

Criopreservação de oócitos fertilizados

Considerações:

- Única técnica estabelecida para preservação da fertilidade.
- Coleta, fertilização e congelamento de embriões.
- Necessita de parceiro sexual.
- Alto custo.
- Pode não apresentar segurança em pacientes com neoplasias hormônio-dependente devido à necessidade de se promover estimulação ovariana previamente à coleta ovular.
- Deve-se definir previamente qual o destino dos embriões em caso de morte da paciente ou outras contingências.

Criopreservação de oócitos não-fertilizados

Considerações:

- Coleta e congelamento de oócitos não-fertilizados.
- As taxas de sobrevivência e fertilização dos oócitos ainda não estão bem estabelecidas.
- Baixo número de relatos de casos.
- Alto custo.
- Pode não apresentar segurança em pacientes com neoplasias hormônio-dependente devido à necessidade de se promover estimulação ovariana previamente à coleta ovular.
- Só deve ser oferecido à paciente em caráter de pesquisa.

Criopreservação de tecido ovariano e posterior transposição

Considerações:

- O córtex ovariano é rico em folículos primários e primordiais.
 - Estratégia em potencial para preservação de tecido ovariano em pacientes com risco elevado de FOP.
 - Poucos relatos de casos.
 - Alto custo.
 - Risco de disseminação de células malignas.
 - Só deve ser oferecido à paciente em caráter de pesquisa.
-

Baseado na importância da ação da QT na saúde reprodutiva e nos mecanismos possíveis para diminuir tal dano, este trabalho se propõe a avaliar possível proteção ovariana a partir do uso prévio de um antagonista de GnRH – cetrorelix, em ratas submetidas ao uso de ciclofosfamida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a preservação da fertilidade, morfologia e reserva ovariana em ratas *wistar* com uso do antagonista do GnRH – cetorelix, contra os danos causados pelo quimioterápico ciclofosfamida.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o efeito protetor do antagonista do GnRH cetorelix na fertilidade das ratas submetidas à QT com CFA, avaliada pelo número de filhotes.
- Estabelecer o efeito do antagonista do GnRH cetorelix na morfologia ovariana em ratas submetidas à QT com CFA, avaliada pela área do corte ovariano e número de folículos.

3 METODOLOGIA

Este é um estudo experimental, prospectivo, controlado.

3.1 Animais

Foram selecionadas 42 ratas *wistar*, sexo feminino, peso médio de 350 g, idade média de 60 dias, obtidas do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Como as ratas eram fenotipicamente idênticas, não foi realizada randomização. Antes do início do experimento, elas foram submetidas à confirmação do ciclo estral por meio da citologia vaginal, sendo incluídas no estudo aquelas com ciclo estral de quatro a cinco dias.

O estudo experimental foi realizado na sala do Laboratório de Reprodução Humana do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG (FIG. 6), obedecendo-se aos princípios éticos para o uso de animais de experimentação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da UFMG, após a aprovação do projeto pelo mesmo (ANEXO A).



FIGURA 6 - Biotério da Faculdade de Medicina UFMG.

Os animais foram acomodados em gaiolas de plástico de 70 x 40 x 20 cm, modelo ALE.MIL. 01.05 marca Alesco (FIG. 7), em número máximo de cinco animais por caixa. A temperatura ambiental foi mantida em torno de 24 (+/- 2)°C, com ciclo de luz de 12 horas e ventilação controlada. O descarte dos dejetos, assim como a limpeza e a desinfecção ambiental seguiram as normas do Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG. A ingestão de água e ração industrial ocorreu *ad libidum*.



FIGURA 7 - Gaiolas utilizadas no experimento.



FIGURA 8 - Rata *wistar*.

As ratas (FIG. 8) foram divididas em quatro grupos:

- **Grupo I:** nove ratas - receberam injeção de placebo + placebo (P + P).
- **Grupo II:** 12 ratas - receberam injeção de placebo + CFA. Avaliar efeito da CFA na fertilidade e na morfologia ovariana (P + CFA).
- **Grupo III:** 12 ratas - receberam injeção de GnRH antagonista (cetorelix) + CFA. Avaliar efeito protetor do GnRH antagonista na fertilidade e na função ovariana das ratas submetidas à CFA (GnRHant + CFA).
- **Grupo IV:** nove ratas - receberam injeção de GnRH antagonista (cetorelix) + placebo. Avaliar efeito do GnRHant na fertilidade e na função ovariana (GnRHant + P).

3.1.1 Confirmação do ciclo estral

O ciclo reprodutivo das ratas é denominado ciclo estral e é caracterizado pelas fases proestro, estro, metestro e diestro. Esses animais constituem um bom modelo para o estudo de alterações reprodutivas, por possuírem ciclo estral curto, com cerca de quatro a cinco dias de duração. A ovulação ocorre do início do proestro ao final do estro. Desde a instalação da maturidade sexual até a idade de 12 meses, a média de duração do ciclo da rata é de quatro dias (MANDL, 1951; YOSHINAKA; HAWKINS; STOCKER, 1969).

Nos estudos sobre o sistema reprodutivo, a citologia do esfregaço vaginal é utilizada para a determinação de cada fase do ciclo estral. A caracterização de cada fase baseia-se na proporção entre os três tipos de células: epiteliais, cornificadas e leucócitos.

As células epiteliais são redondas e nucleadas; as cornificadas são irregulares e o núcleo está ausente; e os leucócitos são pequenas células arredondadas. O proestro dura, em média, 12 horas e se caracteriza pela predominância de células epiteliais. O estro também apresenta duração aproximada de 12 horas, com predominância primariamente de células cornificadas. Durante o metestro, que tem duração aproximada de 21 horas, encontram-se células epiteliais, cornificadas e leucócitos. O diestro tem duração em torno de 57 horas e apresenta predominância de leucócitos (EVANS; LONG, 1921; MANDL, 1951). O ciclo estral é sensível à luz e a iluminação constante resulta em persistência do estro e ovários policísticos (SHARP; REGINA, 1998).

A FIG. 9 mostra as diferentes células encontradas no lavado vaginal da rata.

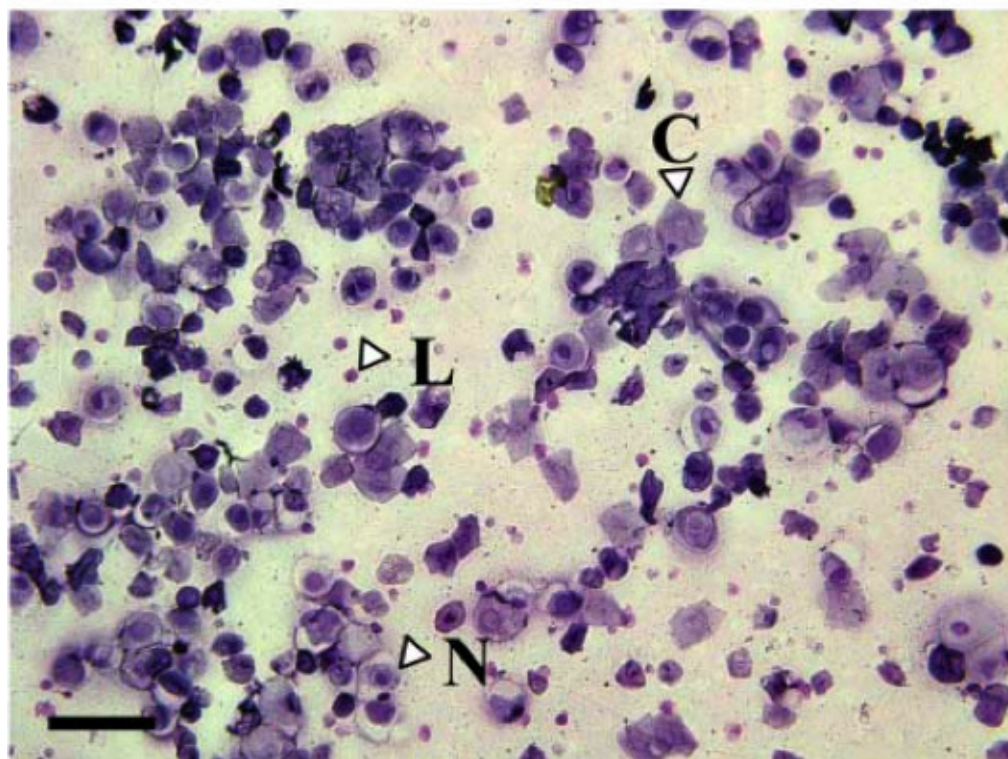


FIGURA 9 - Lavado vaginal de ratas.

L- leucócitos; C- cornificadas; N- nucleadas ou epiteliais.

O ciclo estral da rata reflete bem a atividade ovariana, que é regulada pelo eixo hipofisário-hipotalâmico, sendo, portanto um parâmetro útil e conveniente para monitorar a atividade reprodutiva durante todo o ciclo de vida (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

Neste estudo, as amostras vaginais foram obtidas entre sete e nove horas da manhã, com uma pequena pipeta plástica e solução salina. As gotas contendo o lavado vaginal foram examinadas em um microscópio com aumento de 10 vezes e classificadas de acordo com a citologia.

O aparecimento de células cornificadas foi utilizado para a determinação do padrão de ciclo estral. A recorrência de fase com células cornificadas precedida por uma fase com células nucleadas foi vista como evidência de ciclo estral. A duração do ciclo foi determinada pelo número de dias consecutivos desde o primeiro dia de visualização de células cornificadas até o dia anterior da próxima fase de células cornificadas. Todas as ratas incluídas no estudo tiveram sua ciclicidade confirmada.

3.2 Método

3.2.1 Medicação

3.2.1.1 Placebo

A substância utilizada como placebo foi solução salina.

3.2.1.2 Ciclofosfamida

A administração desse medicamento foi realizada com injeção intraperitoneal na dose de 6 mg/kg, diluída em cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, na concentração de 1 mg/mL. Essa dose baseia-se em dados da literatura, que demonstrou mortalidade em torno de 24% e queda na fecundidade de 71% (LETTERIE, 2004; MONTZ; WOLFF; GAMBONE, 1991).

3.2.1.3 Antagonista do GnRH (cetorelix)

A administração de GnRH antagonista foi realizada com injeção intraperitoneal de 0,1 mg/kg de acetato de cetorelix, diluída em água destilada com manitol a 5%. Dados da literatura mostram que a concentração sérica máxima da droga é atingida após duas horas da administração e essa dosagem promove inibição do pico de LH já uma hora após. A droga foi administrada uma hora antes da ciclofosfamida.

3.2.1.4 Esquemas de administração

A administração das drogas foi feita de maneira asséptica, via intraperitoneal, na região abdominal inferior próxima da base da pata posterior direita, no período da manhã, em três ciclos consecutivos de cinco dias seguidos de dois dias de intervalo, totalizando três semanas de tratamento, segundo os seguintes esquemas:

- Grupo I: injeção de placebo. Após uma hora, nova injeção de placebo.

- Grupo II: injeção de placebo. Após uma hora, injeção de CFA.
- Grupo III: injeção de GnRH antagonista (cetrorelix). Após uma hora, injeção de ciclofosfamida.
- Grupo IV: injeção de GnRH antagonista (cetrorelix). Após uma hora, injeção de placebo.

As doses foram reajustadas semanalmente de acordo com o peso dos animais.

3.2.2 Confirmação do ciclo estral após o tratamento

Um dia após o término da administração das medicações, as ratas foram submetidas a novo estudo do ciclo estral por meio da citologia vaginal, por oito dias, para confirmação e documentação do retorno à fertilidade.

3.2.3 Cruzamento

Após a nova confirmação do ciclo estral, as ratas foram expostas ao cruzamento com ratos *wistar* adultos. A confirmação do cruzamento foi feita pela presença de espermatozóides na análise microscópica do lavado vaginal. Este era considerado o dia 1 da gravidez. Após 21 dias – período de gestação da rata – os filhotes foram contados.

3.2.4 Eutanásia e preparo das peças cirúrgicas

Após o nascimento dos filhotes, as ratas foram sacrificadas com 35 mg de tiopental sódico por via intraperitoneal. Após a observação da parada cardiorrespiratória, elas foram submetidas à ooforectomia bilateral. Os ovários foram dissecados e conservados em solução de formol 4%. Os ovários de cada rata foram processados para histologia em blocos de parafina, seccionados (2 μ m) tendo como referência o hilo e corados em hematoxilina-eosina (HE). Foram realizados quatro cortes por ovário.

3.2.5 Estudo morfológico dos ovários

As lâminas dos cortes ovarianos foram avaliadas por microscopia. Selecionou-se o maior corte ovariano de cada rata, calculou-se a área desse corte (Programa *Image Pro-plus* 6.0) e contaram-se os folículos ovarianos e corpos lúteos presentes em cada corte.

3.3 Análise estatística

3.3.1 Cálculo amostral

O cálculo do número de animais foi feito utilizando-se o programa VCN Sistema de Cálculo Numérico, versão 1. 9. 0.

O número de animais em cada grupo baseou-se no número de filhotes e foi calculado considerando-se poder estatístico de 80%, precisão de 95% ($p < 0,05$). Esse número deveria ser no mínimo nove, para detectar-se diferença mínima de quatro animais entre os grupos. Com base na mortalidade nos grupos submetidos à quimioterapia, elevou-se para 12 o número de animais nestes grupos.

3.4 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram avaliados utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (PRISM) versão 4.0.

Inicialmente, aplicou-se o teste de normalidade para investigar-se a distribuição dos valores encontrados nos parâmetros avaliados (número de filhotes, número de folículos primordiais, número de folículos secundários ou pré-antrais, número de folículos antrais e número de corpos lúteos). Como todos os grupos de parâmetros avaliados apresentaram distribuição normal, decidiu-se pela aplicação da análise de variância (ANOVA). Utilizou-se a ANOVA a um critério de classificação ou *One way* ANOVA. Nesse modelo, a variação global é dividida em duas frações: a primeira é a variação entre as médias dos vários grupos, quando comparadas com a média geral de todos os indivíduos do experimento; e representa o efeito dos diferentes tratamentos: variação entre grupos. A outra é a variação observada entre as unidades experimentais de um mesmo grupo em

relação à média desse grupo: variação intragrupos. Aplicou-se o teste de *Newman-Keuls*, considerando-se significativos os valores de $p < 0,05$.

O experimento iniciou-se em cinco de março de 2007. A FIG. 10 mostra a cronologia.

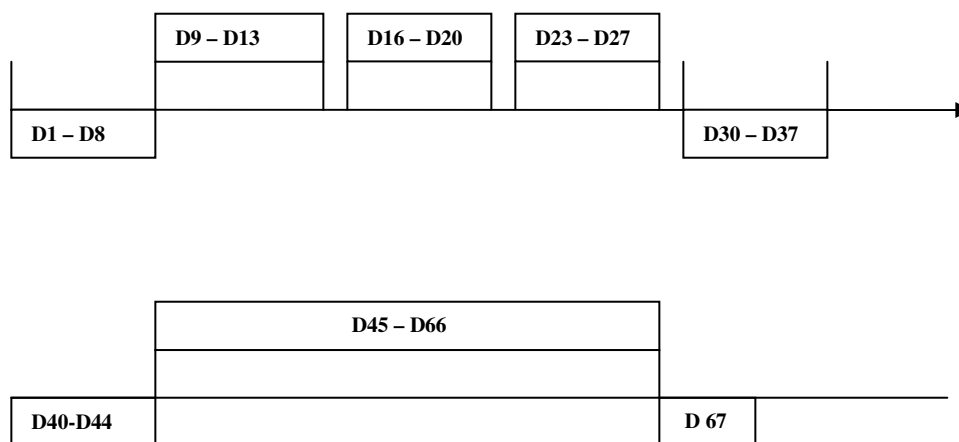


FIGURA 10: Cronologia do estudo experimental.

D1 – D8: Estudo do ciclo estral pela citologia vaginal.

D9 - D13; D16 - D20; D23 – D27: Administração da medicação.

D14-D15; D21-D22; D28 – 29: Período sem medicação

D30 – D37 Estudo do ciclo estral pela citologia vaginal.

D40 – D44: Cruzamento.

D45 - D66: Gestação.

D67: Eutanásia.

4 RESULTADOS

No início do experimento, foram incluídos 42 animais divididos em quatro grupos, conforme descrito na sessão metodologia. Após o término das injeções, morreram duas ratas no grupo P + CFA. O número de animais mortos estava dentro da faixa esperada para a dose de CFA utilizada e essa possível perda já havia sido considerada no cálculo amostral.

4.1 Confirmação do ciclo estral

Um dia após o término das injeções, iniciou-se a pesquisa da ciclicidade estral por meio da citologia vaginal. Todas as ratas dos grupos P + P, GnRHant + P e GnRHant + CFA voltaram a ciclar regularmente. Uma rata no grupo P + CFA (8%) não voltou a ciclar após a medicação, mas a comparação estatística entre os grupos não mostrou diferença, conforme registrado na TAB. 1:

TABELA 1

Número de ratas que apresentaram ciclo estral após o tratamento

	Nº ratas/grupo	Nº ratas ciclaram	Porcentagem*
P + P	9	9	100
P + CFA	12	11	92
GnRHant+CFA	12	12	100
GnRHant+P	9	9	100
Total	42	41	99%

* P>0,05.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

QUADRO 2

Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo P + P

ANIMAL	DIA1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1	D	P	E / M	D	D
2	D	D / P	E	M	D
3	P	E / M	D	D	P
4	P	E / M	D	D	D/P
5	E	M	D	D / P	E
6	D / E	M	D	D	D
7	D	D / P	E	M	D
8	M	D	D	P / E	M
9	P	E / M	D	D / P	E

P= proestro; E=estro; M=metestro; D=Diestro.

QUADRO 3

Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo P + CFA

ANIMAL	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1	D	P	E / M	M / D	D
2	D	M	D	D / M	M / D
3	D	D	D	M	M
4	E	M	M / D	D	D
5	M	D	D	D	D
6	D	P / E	M	D	D
7	D / P	E / M	D	D	D / P
8	P	M	M / D	D	D / P
9	D / P	D	D	D	D
10	E	M	M	D	D

P= proestro; E=estro; M=metestro; D=Diestro.

QUADRO 4

Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo GnRHant + CFA

ANIMAL	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1	D	D	M	D	D
2	D	D	D / P / E	M	D
3	D / P	E	M	D	D
4	M / D	D	D	P	E
5	E	M	D	D	D / P
6	P	P	M	D	D
7	P / E	E	M	D	D
8	M / D	D / E	D	E	M
9	D	E	M	D	D
10	D	D / P	D	D	D
11	E / M	M / D	D	D	P
12	P	E	M	D	D

P= proestro; E=estro; M=metestro; D=Diestro.

QUADRO 5

Ciclo estral das ratas após o tratamento no grupo GnRHant + P

ANIMAL	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
1	E / M	M	D	P	E
2	D	E	M	M / D	D
3	E	D	M	D	D
4	P	E / M	D	D / P	E / M
5	P	E	D	M / D	D / P
6	P	E	M / D	D	M
7	E	D	D / P	M	D
8	P / E	P	E	M / D	D
9	P / E	E	D / P	P	M

P= proestro; E=estro; M=metestro; D=Diestro.

4.2 Número de filhotes

A partir de 21 dias após o cruzamento, registrou-se o número de filhotes de cada animal, conforme dados da TAB. 2.

TABELA 2
Número de filhotes em cada grupo

Animal	P + P	P + CFA	GnRH _a + CFA	GnRH _a + P
1	14	8	6	10
2	13	0	6	12
3	10	0	0	10
4	12	7	0	10
5	14	0	9	10
6	8	0	10	7
7	13	4	11	11
8	8	0	10	13
9	11	-	10	8
10	-	0	0	-
11	-	-	11	-
12	-	11	11	-
Média	11,4	3,0	7,0	10,11
Total	103	30	84	91

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRH_a= cetorelix.

Foi realizado o teste de normalidade com os resultados obtidos e, após a constatação de que os mesmos apresentavam distribuição gaussiana aproximada, realizou-se o estudo estatístico pela análise da variância a um critério de avaliação (ANOVA *One Way*).

O grupo-controle (P + P) teve, em média, 11,4 +/- 0,78 filhotes. O grupo que recebeu apenas CFA (P + CFA) apresentou redução expressiva (79%) no número de filhotes (3 +/- 1,33, p<0,01 pelo teste de *Newman-Keuls*). O grupo que recebeu GnRH_a previamente à CFA (GnRH_a + CFA) teve número de filhotes significativamente mais

alto ($7 \pm 1,31$) que o do grupo tratado apenas com CFA ($p < 0,05$), mas ainda inferior ao do grupo-controle ($p > 0,05$). O grupo que recebeu apenas GnRHant não diferiu do controle ($10,11 \pm 1,83$).

O GRÁF. 1 mostra a comparação do número médio de filhotes entre os grupos.

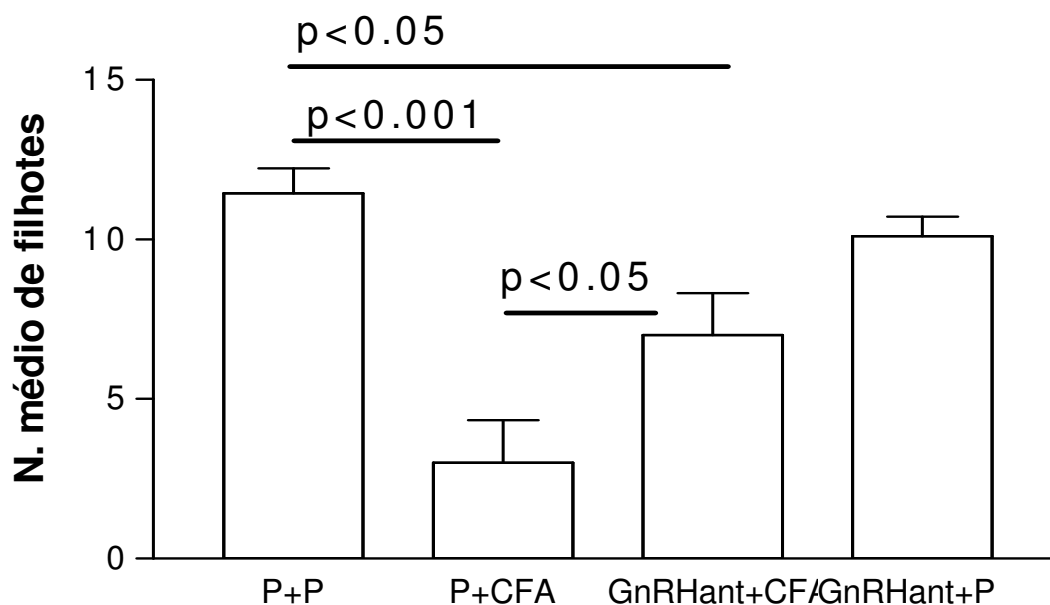


GRÁFICO 1 - Comparação do número médio de filhotes entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de filhotes.

As diferenças estatisticamente significativas estão representadas entre as barras.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

4.3 Área dos cortes ovarianos

Calculou-se a área do corte ovariano de cada rata. Após a aplicação do teste de normalidade e constatação da distribuição gaussiana dos valores, realizou-se a comparação da área média entre os grupos. A área dos cortes ovarianos encontra-se na TAB. 3:

TABELA 3
Área dos cortes ovarianos (cm²)

Animal	P + P	P + C	GnRHant + C	GnRHant + P
1	4,65	5,79	4,65	4,78
2	4,23	8,31	10,24	6,77
3	7,38	3,04	4,16	2,57
4	4,38	4,76	2,39	7,08
5	3,53	5,14	4,67	5,57
6	6,66	2,88	6,03	2,76
7	4,30	4,10	3,14	1,53
8	7,33	4,49	2,81	4,51
9	6,54	-	3,16	6,20
10	-	2,22	2,13	-
11	-	-	10,65	-
12	-	3,20	0,71	-
Média	5,45	4,30	4,56	4,62

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

A área média do grupo-controle (P + P) foi de 5,45 cm², com erro-padrão de 0,50. A área média no grupo tratado apenas com CFA (P + CFA) foi de 4,30 +/- 0,56 cm², sendo, portanto, menor que a área do grupo-controle, mas esta diferença não teve significância estatística. O valor da área média no grupo GnRHant + CFA (4,56 +/- 0,89) também foi menor que no grupo-controle, mas superior ao do grupo P + CFA, achados estes também sem significância estatística. O grupo que recebeu apenas GnRHant apresentou área média de 4,62 +/- 0,66, sem diferença estatística quando comparado aos outros grupos. O GRÁF. 2 mostra a comparação entre as áreas.

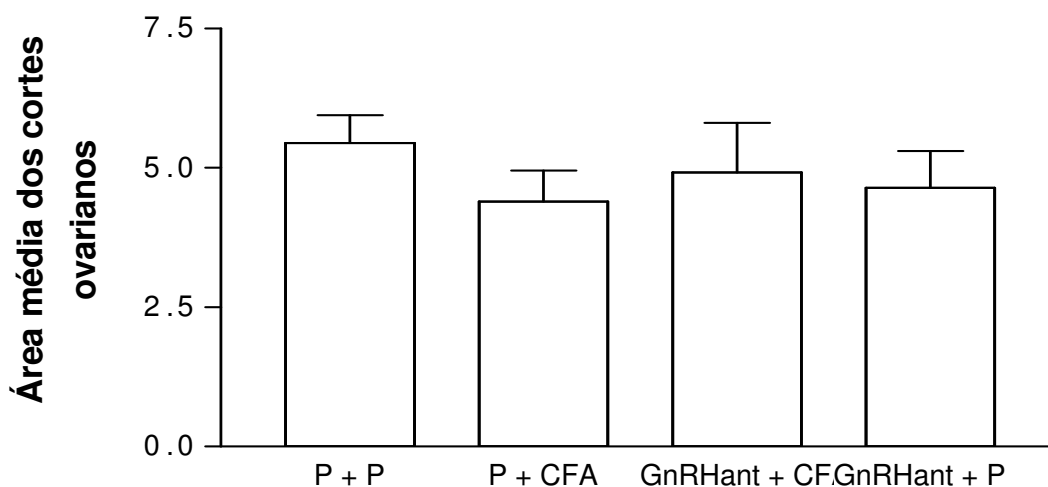


GRÁFICO 2 - Comparação da área média do corte ovariano entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de filhotes.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

4.4 Número de folículos e corpos lúteos

Foi realizada a contagem de folículos e corpos lúteos nos cortes ovarianos de cada rata. O estudo da distribuição dos dados em cada item analisado enfatizou que todos estes parâmetros seguiam a distribuição gaussiana. Realizou-se então a análise da variância a um critério de avaliação (ANOVA *One Way*).

4.4.1 Folículos primordiais e primários

O número de folículos primordiais e primários em cada grupo está representado na TAB. 4:

TABELA 4
Número de folículos primordiais e primários em cada grupo

Animal	P + P	P + CFA	GnRHant + CFA	GnRHant + P
1	5	4	3	2
2	3	5	3	3
3	3	2	2	3
4	2	2	2	5
5	5	3	3	2
6	3	1	4	4
7	6	3	6	7
8	3	2	2	4
9	1	-	4	4
10	-	3	5	-
11	-	-	4	-
12	-	4	7	-
Média	3,44	2,90	3,75	3,78
Total	31	29	42	342

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetrorelix.

O grupo-controle apresentou média de 3,44 +/- 0,53 folículos primordiais e primários. A média no grupo que recebeu apenas CFA (P + CFA) foi de 2,90 +/- 0,38, no grupo que recebeu GnRHant + CFA foi de 3,75 +/- 0,46 e no grupo que recebeu apenas GnRHant (GnRHant + P) foi de 3,78 +/- 0,52. Nenhum dos tratamentos mostrou diferença significativa no número de folículos primordiais e primários, entre eles e em relação ao grupo-controle (todos os valores de $p > 0,05$).

O GRÁF. 3 exibe a comparação do número médio de folículos primordiais e primários entre os grupos.

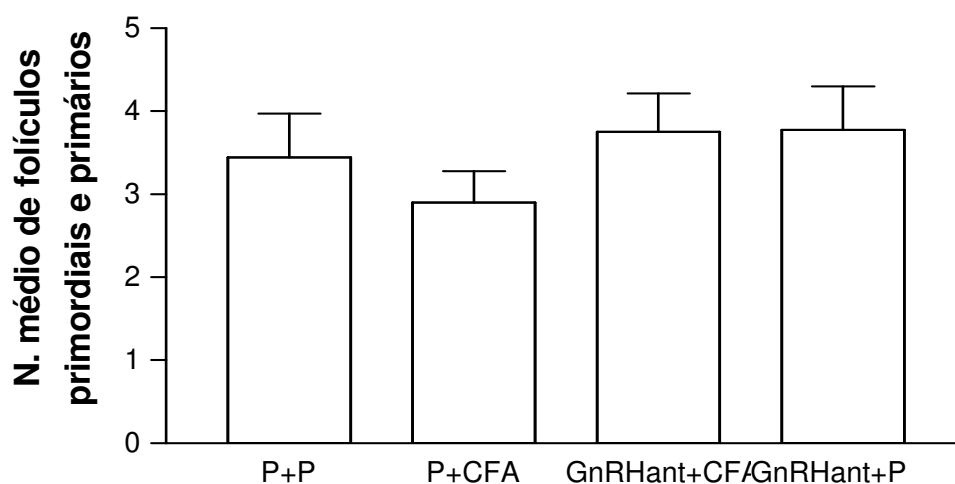


GRÁFICO 3 - Comparação do número médio de folículos primordiais e primários entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de folículos primordiais e primários.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetrorelix.

4.4.2 Folículos pré-antrais

A TAB. 5 informa o número de folículos pré-antrais em cada grupo.

TABELA 5

Número de folículos pré-antrais em cada grupo

Animal	P + P	P + CFA	GnRHant + CFA	GnRHant + P
1	3	4	4	3
2	3	4	3	3
3	3	3	2	3
4	4	3	2	5
5	3	4	2	6
6	2	5	3	5
7	3	6	5	4
8	2	1	5	5
9	4	-	3	3
10	-	5	5	-
11	-	-	7	-
12	-	2	6	-
Média	3,0	3,36	3,92	4,11
Total	27	37	47	37

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetrorelix.

Verificaram-se $3 \pm 0,24$ folículos pré-antrais, em média, no grupo-controle (P + P). O grupo tratado com CFA (P + CFA) não exibiu diferença significativa em relação ao controle ($3,36 \pm 0,54$). O grupo que recebeu GnRHant previamente à CFA (GnRHant + CFA) teve número de folículos pré-antrais ($3,92 \pm 0,48$) estatisticamente semelhante aos dos outros grupos. O número de folículos pré-antrais no grupo tratado apenas com GnRHant ($4,11 \pm 0,39$) também não apresentou diferença estatística com os outros grupos.

O GRÁF. 4 exibe a comparação do número médio de folículos pré-antrais entre os grupos.

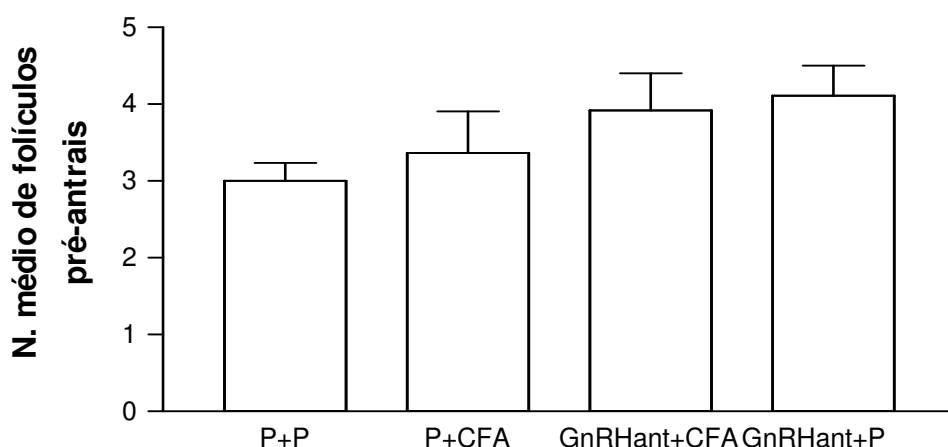


GRÁFICO 4 - Comparação do número médio de folículos pré-antrais entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de folículos pré-antrais.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

4.4.3 Folículos antrais

A TAB. 6 evidencia o número de folículos antrais por grupo estudado.

TABELA 6
Número de folículos antrais em cada grupo

Animal	P + P	P + CFA	GnRHant + CFA	GnRHant + P
1	5	7	5	8
2	3	8	7	7
3	4	4	5	5
4	6	6	4	8
5	6	4	5	8
6	4	3	6	7
7	4	6	8	4
8	4	2	8	5
9	4	-	8	6
10	-	6	5	-
11	-	-	10	-
12	-	4	8	-
Média	4,44	5,0	6,58	6,44
Total	50	50	79	58

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetrorelix.

A média de folículos antrais no grupo-controle (P + P) foi 4,44 +/- 0,34. O grupo tratado com CFA (P +/- CFA) apresentou média estatisticamente semelhante (5 +/- 0,60), assim como os grupos tratados com GnRHant e CFA (6,58 +/- 0,53) e apenas com GnRHant (6,44 +/- 0,50).

O GRÁF. 5 ressalta a comparação do número médio de folículos antrais entre os grupos.

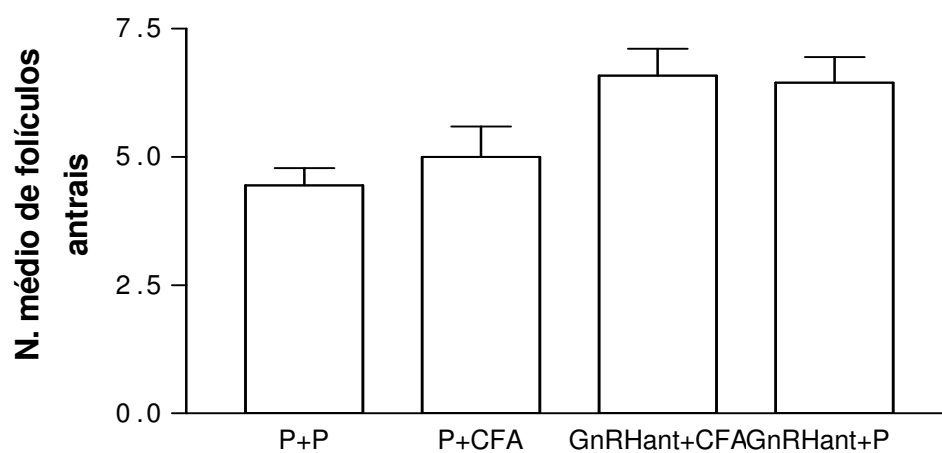


GRÁFICO 5 - Comparação do número médio de folículos antrais entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de folículos antrais.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

4.4.4 Corpos lúteos

O registro do número de corpos lúteos em cada grupo encontra-se na TAB. 7.

TABELA 7
Número de corpos lúteos em cada grupo de tratamento

Animal	P + P	P + C	GnRHant + C	GnRHant + P
1	3	3	4	4
2	5	6	6	5
3	6	5	3	3
4	3	4	3	5
5	3	2	3	5
6	4	4	6	3
7	4	2	2	3
8	6	4	3	4
9	4	-	2	5
10	-	2	2	-
11	-	-	4	-
12	-	1	3	-
Média	4,22	3,30	3,42	4,11
Total	38	33	41	37

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

A média de corpos lúteos no grupo-controle (P + P) foi de 4,22 +/- 0,40. Nenhum dos tratamentos mostrou diferença significativa em relação a esse grupo. Os números encontrados foram: grupo que recebeu apenas CFA (P + CFA): 3,30 +/- 0,50; grupo tratado com GnRHant previamente à CFA (GnRHant + CFA): média de 3,42 +/- 0,40; grupo tratado apenas com GnRHant (GnRHant + P): 4,11 +/- 0,30 corpos lúteos.

No GRÁF. 6 está a comparação do número médio de corpos lúteos entre os grupos.

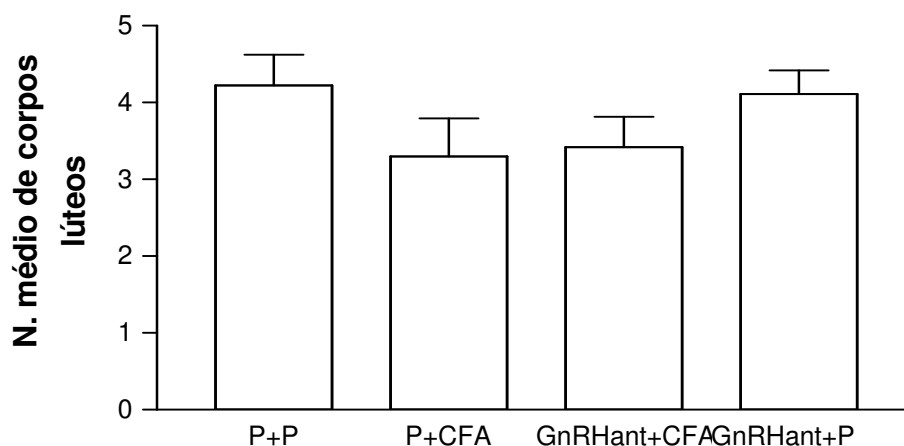


GRÁFICO 6 - Comparação do número médio de corpos lúteos entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número de corpos lúteos.

Não houve diferença estatística entre os grupos.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

4.4.5 Número total de folículos

Somou-se o número total de folículos em cada grupo (TAB. 8) e aplicou-se a análise de variância nos dados encontrados. A média do número total de folículos encontrada no grupo-controle (P + P) foi de 10,89 $\pm$ 0,70. Esta média não apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com CFA (P + CFA: 11,6 $\pm$ 1,14) e em relação ao grupo tratado com GnRHant e CFA (14,25 $\pm$ 1,26). O grupo tratado apenas com GnRHant (GnRHant + P) apresentou número total de folículos estatisticamente mais alto que o grupo-controle (17,11 $\pm$ 2,2), com $p < 0,05$ (GRÁF. 7).

TABELA 8
Número total de folículos em cada grupo de tratamento

Animal	P + P	P + C	GnRHant + C	GnRHant + P
1	13	15	12	13
2	9	17	13	13
3	10	9	9	11
4	12	11	8	26
5	14	11	10	26
6	9	9	13	23
7	13	15	19	15
8	9	5	15	14
9	9	-	15	13
10	-	14	15	-
11	-	-	21	-
12	-	10	21	-
Média	10,89	11,6	14,25	17,11
Total	98	116	171	154

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

A comparação da média do número total de folículos entre os grupos encontra-se no GRÁF. 7.

$p < 0,05$

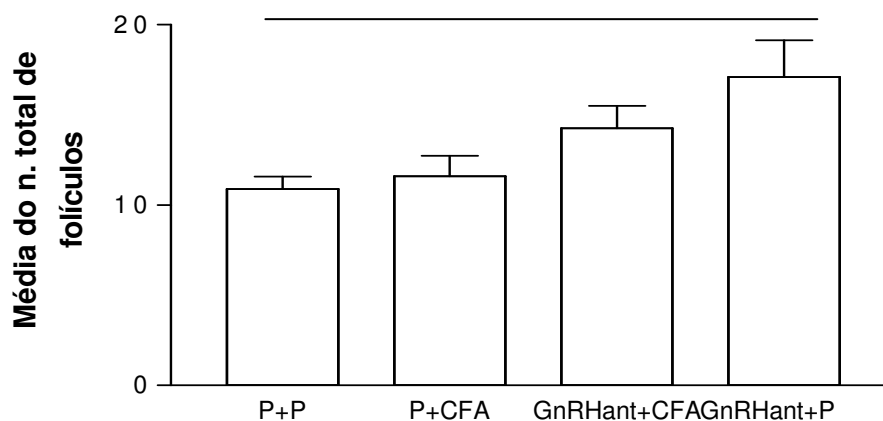


GRÁFICO 7 - Comparação da média do número total de folículos
entre os grupos de tratamento.

As barras representam a média e o erro-padrão do número total de folículos.

As diferenças estatisticamente significativas estão representadas entre as barras.

P= placebo; CFA= ciclofosfamida; GnRHant= cetorelix.

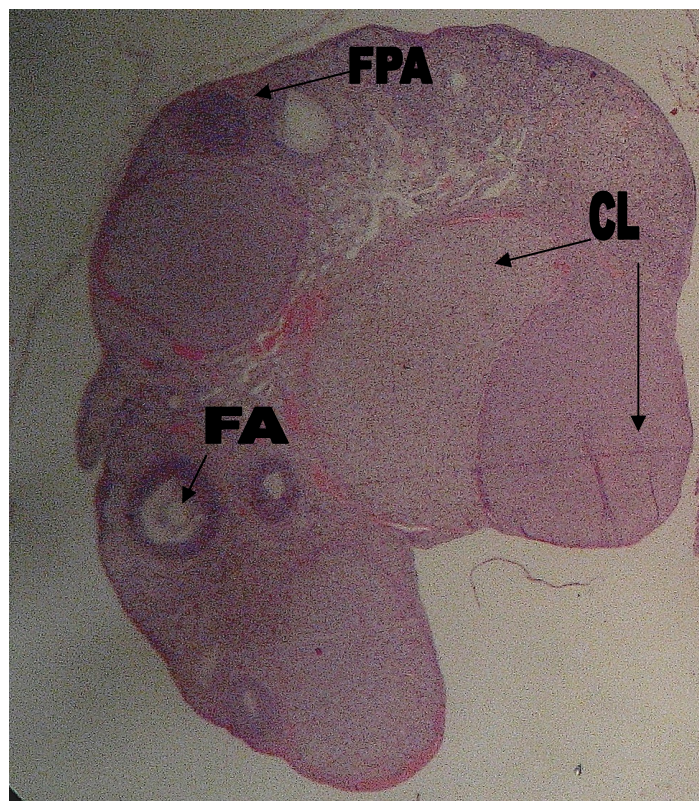


FIGURA 11- Corte ovariano de rata *wistar* após o tratamento.

FPA: Folículo pré-antral FA: Folículo antral CL: Corpo lúteo.

5 DISCUSSÃO

Os avanços no tratamento das neoplasias malignas têm permitido a sobrevivência de um número cada vez mais alto de pacientes (ANDERSON *et al.*, 2006; BLUMENFELD, 2001; CARTER *et al.*, 2005; GREENBERG; URBACH, 2006; HEATH; STERN, 2006; MALTARIS *et al.*, 2007). Uma vez curada a doença, a preocupação se volta para a solução das possíveis conseqüências desse tratamento. Para pacientes jovens, a queda na fertilidade destaca-se entre estas conseqüências (ANDERSON *et al.*, 2006; ASRM, 2005; BLUMENFELD *et al.*, 2007; CARTER *et al.*, 2005; GREENBERG; URBACH, 2006; HEATH; STERN 2006; MALTARIS *et al.*, 2007; THOMSON; CRITCHLEY; WALLACE, 2002) e, por sua possível irreversibilidade, mais importante que a cura deve ser a preocupação com sua prevenção.

A ciclofosfamida encontra-se entre as drogas quimioterápicas mais utilizadas no tratamento das neoplasias em mulheres em idade reprodutiva (GHOSH *et al.*, 2001) e pertence ao grupo dos agentes alquilantes que são reconhecidamente gonadotóxicos, tendo sido, por isto, escolhida para este experimento. Estas drogas agem diretamente no DNA do tecido gonadal levando à morte as células germinativas, com subsequente queda na função ovariana e na fertilidade (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

A literatura tem demonstrado que pacientes pré-puberes são menos sensíveis à ação da QT (ABSOLOM *et al.*, 2006; IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008; RIVKEES; CRAWFORD, 1988; WALLACE *et al.*, 1993), provavelmente porque a CFA atua preferencialmente no DNA das células em maturação que estariam mais propensas a sofrerem este dano (MALTARIS *et al.*, 2006; TILLY, 1998). Partindo desta premissa, o uso de medicamentos capazes de manter as gônadas em estado de repouso poderia diminuir o dano causado pelos quimioterápicos.

Na prática clínica, já se comprovou que o uso de análogos do GnRH promove esse repouso. Os análogos são divididos em dois grupos: as drogas agonistas e as antagonistas. Apesar dos dois grupos apresentarem o mesmo efeito final – a quiescência ovariana –, os diferentes mecanismos de ação de cada um deles fazem com que o tempo necessário para que este efeito seja atingido difira. No caso dos agonistas, o efeito inicial é um estímulo ovariano que posteriormente será seguido por inibição por retrocontrole hipofisário, sendo, portanto, necessário um período de aproximadamente 14 dias para que

se atinja a inibição ovariana final (BLUMENFELD, 2007). Por outro lado, os antagonistas promovem inibição ovariana imediata a partir do bloqueio por competição dos receptores hipofisários de GnRH (HALMOS; SCHALLY, 2002). A duração da ação dos antagonistas também é menor, visto que assim que os receptores do GnRH são desocupados, eles podem ser ocupados pelo GnRH endógeno (IMAI; FURUI; YAKAMOTO, 2008).

Uma vez definido o tratamento de uma neoplasia, o adiamento do início pode alterar o prognóstico da doença. Portanto, a escolha de uma droga que promova inibição ovariana imediata, permitindo o início imediato da QT, apresenta vantagens sobre as drogas que necessitam de mais tempo para atingirem este efeito. Por apresentar esse efeito inibitório imediato, o cetorelix foi escolhido para este experimento.

A duração e o esquema utilizado na QT dependem, entre outros fatores, das características do paciente, da droga utilizada e do tipo de neoplasia. O esquema proposto neste trabalho, de três ciclos de cinco dias com intervalo de dois dias entre cada ciclo, e a dose de QT utilizada basearam-se em experimentos anteriores com ratas, que revelaram que este procedimento e esta dose seriam capazes de causar dano gonadal e afetar a fertilidade, sem, entretanto, levar à mortalidade muito elevada (ATAYA *et al.*, 1985; BOKSER; SZENDE; SCHALLY, 1990; GHOSH *et al.*, 2001). O cálculo do tempo de tratamento também considerou a vida média das ratas, que é em torno de dois a três anos (SHARP; REGINA, 1998).

Escolheu-se a via de administração intraperitoneal para as medicações, devido à sua facilidade ao se trabalhar com ratas e devido ao fato de que a distribuição de ambas as drogas por esta via segue a mesma distribuição ocorrida com o uso intravenoso (SCHWAHN *et al.*, 1999; ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006). Uma hipótese a ser levantada seria se a administração próxima dos ovários não poderia levar à ação direta das drogas nesses órgãos. No caso da CFA, por ser uma pró-droga, a sua ação depende da metabolização hepática, não sendo possível, portanto, uma ação direta na gônada sem a absorção e passagem hepática prévia (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006). O cetorelix, por sua vez, apresenta sua ação principalmente no nível hipotalâmico, não sendo, portanto, capaz de agir diretamente nas gônadas, pela possível absorção local.

Outro questionamento seria sobre a possível interação local entre as duas drogas, visto que as mesmas foram injetadas intraperitonealmente, com intervalo de uma hora. A literatura consultada não mostrou possibilidade nesta interação (www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/c/Cetrotideinj.htm). Por ser citotóxica, a CFA pode resultar em morte animal, sendo essa letalidade dose-dependente (ATAYA; VALERIOTE;

RAMAHI-ATAYA, 1989). Pelo cálculo amostral, seria necessário que cada grupo tivesse nove ratas. Considerando a possível letalidade da CFA, os grupos que utilizaram a droga foram compostos de 12 animais. No presente estudo, morreram duas ratas no grupo submetido à QT. Como esta possibilidade de exclusão por morte já havia sido considerada, o número final de ratas em cada grupo era representativo para o trabalho proposto.

Ao se estudar a ciclicidade das ratas após a QT, confirmou-se ciclicidade estral em todas elas, exceto em uma no grupo P + CFA. Este fato, apesar de não apresentar significância estatística, pode sugerir dano gonadal pela CFA. O retorno da ciclicidade no grupo que recebeu apenas o antagonista de GnRH sugere que o efeito inibitório do mesmo foi de curta duração. Pode-se especular que a presença da ciclicidade indica que o dano ovariano não foi suficiente para causar essa alteração da função ovariana, visto que ela pode ser sugestiva de funcionamento ovariano adequado, mas isoladamente não garante a fecundidade dos animais estudados (BATH *et al.*, 2003; MARHHOM; COHEN, 2006; MOORE; THERIAULT, 2007; OKTAY *et al.*, 2007). A literatura consultada apresentou poucos trabalhos que avaliavam especificamente a ciclicidade em ratas submetidas à QT. Ghosh *et al.* (2001) relatam que a CFA pode prolongar a duração do ciclo estral, com aumento das fases de metestro e diestro e diminuição do estro e proestro.

Foi objetivo deste estudo a avaliação da fertilidade a partir do número de filhotes resultantes da gestação após o uso das medicações. O cálculo amostral levou em consideração os dados necessários para esta análise, de acordo com as taxas de mortalidade das ratas, fecundidade e filhotes nascidos vivos. A média de filhotes no grupo que recebeu apenas a ciclofosfamida (P + CFA) foi expressivamente mais baixa que a do grupo-controle (P + P) - ($p < 0,05$). Este resultado está de acordo com o esperado, pois a queda da fecundidade em animais submetidos a tratamentos com CFA já está bem elucidada na literatura (ATAYA *et al.*, 1985; 1995; GHOSH *et al.*, 2001). Estes dados também foram importantes, pois comprovaram que a dose de CFA utilizada no estudo era suficiente para causar queda na fecundidade, permitindo, portanto, a avaliação da suposta proteção oferecida pelo GnRHant. Juntamente com a taxa de mortalidade encontrada e citada anteriormente, esses resultados demonstram que a dose de CFA utilizada no estudo foi adequada, pois foi suficiente para levar à lesão gonadal e resultou em índice de morte aceitável.

O grupo que recebeu antagonista de GnRH antes da injeção de CFA teve um número de filhotes significativamente mais alto que o grupo tratado apenas com CFA ($p < 0,005$). Quando comparado ao grupo-controle, o grupo GnRHant + CFA apresentou

menor número de filhotes, mas essa diferença não teve significado estatístico ($p > 0,05$). Esta tendência era esperada, pois, apesar do GnRHant oferecer proteção da fecundidade, ele não anula totalmente a ação da CFA sobre as gônadas. Isto confirma que o uso do GnRHant antes da CFA é capaz de oferecer proteção da fecundidade avaliada pelo número de filhotes, conforme sugerido na proposição deste estudo. Esta proteção se deve provavelmente à interrupção imediata do estímulo gonadotrófico para os ovários, levando à diminuição do número de mitoses dentro da gônada e, logo, à parada de crescimento. Vale lembrar que a CFA atua no DNA de células em multiplicação e, como o antagonista promove repouso no DNA, ele faz de maneira indireta a proteção das unidades funcionais da gônada.

O estudo da morfologia ovariana constituiu objetivo específico do experimento. O cálculo da área do corte ovariano foi realizado pelo programa *Image pro plus 6.0* e a contagem dos folículos em todas as lâminas foi realizada pela própria doutoranda, o que exclui as possíveis diferenças interexaminador. Ao se analisar a área dos cortes ovarianos, não se encontrou diferença estatística entre os grupos estudados, mas houve tendência à diminuição da área nos grupos tratados com CFA, sendo que essa diminuição foi menor no grupo que recebeu também o antagonista de GnRH. Este dado pode sugerir indiretamente uma proteção gonadal pelo GnRH, pois a diminuição da área se correlaciona teoricamente com a diminuição do volume ovariano. Não se encontrou na literatura consultada trabalho que avaliasse diretamente a área dos cortes ovarianos, mas os que avaliaram o volume ovariano mostraram sua diminuição em ratas submetidas à QT com CFA (ATAYA; VALERIOTE; RAMAHI-ATAYA 1989; GHOSH *et al.*, 2001; MULLER; COLE, 1970; PLOWCHALKB; MATTISON, 1992) e proteção nessa diminuição com o uso de análogos do GnRH (BOKSER; SZENDE; SCHALLY, 1990).

Em relação ao número de folículos primários e primordiais, não se encontrou diferença estatística entre nenhum dos grupos estudados, apesar de haver tendência a número mais baixo de folículos no grupo tratado apenas com CFA (P + CFA) quando comparado com o grupo que recebeu GnRHant previamente à CFA (GnRHant + CFA). Essa tendência também foi verificada em relação ao número de folículos pré-antrais, antrais e corpos lúteos.

A análise comparativa do número total de folículos entre os grupos também destacou tendência a número mais alto de folículos no grupo tratado com GnRHant + P, quando comparado ao grupo que recebeu apenas a CFA (P + CFA). O número total de folículos no grupo que recebeu apenas GnRHant foi estatisticamente mais alto quando

comparado ao grupo-controle (P + P). Resultado semelhante foi encontrado por Bokser *et al.* (1991) ao estudarem a ação de antagonista do GnRH no ovário de roedoras.

Estudos com ratas revelaram que a administração de ciclofosfamida é capaz de levar à diminuição no volume uterino, número total de folículos e células da granulosa (ATAYA; VALERIOTE; RAMAHI-ATAYA, 1989; MULLER; COLE, 1970; PLOWCHALKB; MATTISON, 1992).

A maioria dos estudos evidencia diminuição no número total de folículos. Enquanto alguns autores encontraram diminuição principalmente dos folículos primordiais, outros mostraram diminuição mais significativa de folículos maiores que 30 μ m (BOKSER; SZENDE; SCHALLY, 1990; LETTERIE, 2004). Não se sabe com certeza se a CFA afeta diretamente os corpos lúteos, mas os estudos experimentais sugerem que o número de corpos lúteos está diminuído, provavelmente devido à diminuição prévia no número de folículos em desenvolvimento (PLOWCHALKB; MATTISON, 1992). As controvérsias existentes nas publicações sobre as alterações morfológicas ovarianas após a QT podem ser explicadas, em parte, pelas diferenças entre as doses e esquemas utilizados, época do estudo ovariano em relação ao final da quimioterapia, método utilizado para avaliar a morfologia e tamanho amostral.

Após a gestação e a lactação, a retomada dos ciclos estrais em ratas *wistar* ocorre em torno de quatro a sete dias (SHARP; REGINA, 1998). Pode-se especular que o tempo decorrido entre a gestação e a retirada dos ovários para estudo morfológico não foi suficiente para que os mesmos retomassem sua função. A sacrifcação dos animais se deu logo depois do nascimento dos filhotes, pois se desejava avaliar a morfologia ovariana logo em seguida à QT.

Talvez a melhor maneira de se estudar a influência da QT e do uso prévio de antagonista de GnRH na morfologia ovariana seja a retirada das gônadas logo após o tratamento, sem permitir uma gravidez prévia. Entretanto, o objetivo primário do estudo era o desfecho final em números de filhotes, sendo o estudo da morfologia apenas um objetivo secundário. É importante que se ressalte também que o estudo da morfologia não reflete necessariamente a função endócrina ou reprodutiva do órgão. Fica uma interrogação: os componentes encontrados nas áreas são viáveis, ou seja, são capazes de produzir folículos maduros que gerem gravidez? Valeria a pena, no futuro, coletar células, cultivá-las *in vitro* e testar sua viabilidade. Nesse mesmo raciocínio, nota-se que, embora o número de folículos e área não tenham se alterado significativamente, o número de filhotes diminuiu, mostrando mais uma vez que a viabilidade folicular é um determinante que

merece ser mais bem estudado.

Os resultados encontrados neste estudo comprovaram a hipótese levantada sobre a possível proteção da fertilidade em ratas submetidas à QT com CFA, avaliada pelo número de filhotes. Existem várias pesquisas que ressaltam essa proteção com o uso dos agonistas do GnRH (ATAYA *et al.*, 1985; DANFORTH; ARBOGAST; FRIEDMAN, 2005; GLODE; ROBINSON; GOULD, 1981). A maioria dos trabalhos ainda é experimental, mas alguns estudos clínicos já estão sendo conduzidos neste campo. Apesar de alguns centros de oncologia já estarem oferecendo esta opção de proteção ovariana, entidades como a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) desencorajam o seu uso clínico devido à falta de comprovação científica (ASRM, 2005; LEE *et al.*, 2006). Entretanto, essas mesmas sociedades, embasadas nos resultados encontrados pelos estudos animais, encorajam o desenvolvimento de pesquisas nesta área e preconizam esta possibilidade como promissora. O uso dos antagonistas, por sua vez, por promoverem imediatamente o bloqueio ovariano, permitiria o início imediato da QT, o que poderia ser crucial no tratamento das neoplasias.

Na literatura estudada, foram encontrados dois trabalhos que avaliaram o uso de cetorelix para proteção ovariana em animais submetidas à QT com CFA. Os dois investigaram apenas o número de folículos primordiais em camundongos fêmeas submetidas à QT com CFA. Nenhum deles avaliou diretamente a fertilidade. Meiorow *et al.* (2004) concluíram que o uso do cetorelix diminui a redução no número de folículos primordiais provocada pela CFA, sugerindo, portanto, proteção ovariana com o uso de cetorelix. Danforth, Arbogast e Friedman (2005) encontraram resultados contrários ao avaliaram a contagem dos folículos primordiais em camundongos fêmeas submetidas a uma dose única de CFA e antagonista de GnRH. Os autores encontraram taxa mais alta de destruição de folículos primordiais no grupo que recebeu o antagonista em relação ao grupo que recebeu agonista de GnRH. Entretanto, o número de animais era baixo (apenas cinco), o esquema de QT foi em dose única e a única variável avaliada foi o número de folículos primordiais. Estes dados podem representar limitações às conclusões descritas pelos autores.

A segurança do uso do cetorelix em humanos já é consolidada e essa droga é amplamente utilizada para bloqueio ovariano em pacientes submetidas às técnicas de reprodução assistida. Essa segurança comprovada pode facilitar o desenvolvimento de estudos clínicos com o objetivo aqui proposto.

Não é necessário apenas que se desenvolvam mecanismos de proteção ovariana para pacientes que irão se submeter à QT. É crucial que estas pacientes sejam alertadas sobre os possíveis danos reprodutivos que possam vir a sofrer e as opções para preservar a fertilidade. Deve-se lembrar que ciclos menstruais irregulares ou amenorréia não conferem necessariamente esterilidade permanente (BATH *et al.*, 2003; DECHERNEY *et al.*, 2005; LANTINGA *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2003; OTKAY, 2006; SÖNMEZER; OKTAI, 2006). Em contrapartida, ciclos regulares não conferem necessariamente fertilidade normal (BATH *et al.*, 2003; MARHHOM; COHEN, 2006; MOORE; THERIAULT, 2007; OKTAY; SÖNMEZER, 2007). Como o retorno à ciclicidade menstrual não traduz efetiva preservação da fertilidade, pacientes submetidas à QT, mesmo que apresentem ciclos regulares, devem ser encorajadas a não postergarem a gravidez por muitos anos (MARHHOM; COHEN, 2006).

A manutenção da vida por intermédio da cura da doença é, sem dúvida alguma, o objetivo primário da QT, mas, uma vez alcançado o alto índice de cura atual, chegou o momento de se preocupar com a qualidade de vida dos sobreviventes. A procriação encontra-se entre os instintos primários da raça humana e a preservação dessa capacidade é primordial para que se atinja qualidade de vida satisfatória.

6 CONCLUSÕES

- O uso do antagonista de GnRH cetorelix, na dose utilizada neste estudo, mostrou efeito protetor na fertilidade das ratas submetidas à QT com CFA no esquema de três ciclos de cinco dias com dois dias de intervalo entre os mesmos, avaliada pelo número de filhotes resultantes da gestação após o uso das medicações.
- O uso do antagonista de GnRH cetorelix, na dose utilizada neste estudo, não mostrou alteração na morfologia ovariana em ratas submetidas à QT com CFA no esquema de três ciclos de cinco dias com dois dias de intervalo entre os mesmos, avaliada pela medida da área do corte ovariano e contagem dos folículos e corpos lúteos.

REFERÊNCIAS

ABSOLOM, K. *et al.* Predictors of clinic satisfaction among adult survivors of childhood câncer. **Europ J Cancer**, v.42, n.10, p.1421-1427, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. **Fertil Steril**, v.83, n.6, p.1622-8, 2005.

ANDERSON, R.A. *et al.* The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. **Hum Reprod**, v.21, n.10, p.2583-2592, 2006.

ATAYA, K.M. *et al.* A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. **Cancer Res**, v.45, p.3651-6, 1985.

ATAYA, K.M. *et al.* Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. **Biol Reprod**, v.52, p.365-372, 1995.

ATAYA, K.M.; VALERIOTE, F.A.; RAMAHI-ATAYA, A.J. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. **Cancer Res**, v.49, p.1660-4, 1989.

BATH, L.E. *et al.* Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. **Hum Reprod**, v.18, n.11, p.2368-2374, 2003.

BINES, B.J.; OLESKE, D.M.; COBLEIGH, M.A. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. **J Clin Oncol**, v.14, n.5, p.1718-1729, 1996.

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. Ovarian rescue/protection from chemotherapeutic agents. **J Soc Gynecol Investig**, 8:S60-4, 2001.

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

BLUMENFELD, Z. *et al.* Fertility after treatment for Hodgkin's disease. **Ann Onc**, v.13, p.138-147, 2002.

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.

BLUMENFELD, Z. *et al.* Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. **J Soc Gynecol Investig**, v.6, n.3, p.229-239, 1999.

BLUMENFELD, Z. *et al.* Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin- releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. **Hum Reprod**, v.11 n.8, p.1620-6, 1996.

BLUMENFELD, Z; ECKMAN, A. Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRHa. **J. Nat. Cancer Inst Monog**, n.34, p.40-42, 2005.

BLUMENFELD, Z.; HAIM, N. Prevention of gonadal damage during cytotoxic therapy. **Ann Med**, v.29, n.2, p199-206, 1997.

BOKSER, L. *et al.* Recovery of pituitary-gonadal function in male and female rats after prolonged administration of a potent antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone (SB-75). **Neuroendocrinology**, v.54, p.136-145, 1991.

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

CARTER, J. *et al.* Gynecologic cancer treatment and the impact of cancer-related infertility. **Gynecol Oncol**, v.97, p.90-5, 2005.

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

CHASLE, S.; HOW, C.C. The effect of cytotoxic chemotherapy on female fertility. **Eur J Oncol Nurs**, v.7, n.2, p.91-8, 2003.

CHEMAITILLY, W. *et al.* Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.5, p.1723-8, 2006.

CHIARELLI, A.M.; MARRETT, L.D.; DARLINGTON, G. Erly menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ont rio, Canad . **Am J Epidemiol**, v.150, n.3, p.245-254, 1999.

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, n.5, p.1333-8, 2005.

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

DEL MASTRO, L.; CATZEDEU, T.; VENTURINI, M. Infertility and pregnancy after breast cancer: Current knowledge and future perspectives. **Cancer Treat Rev**, v.32, p.417-422, 2006.

DEL MASTRO, L.; VENTURINI, M. Fertility preservation strategies for breast cancer patients. **J Clin Oncol**, v.24, p.4220-1; author reply 4221-2, 2006.

DIEDRICH, K. *et al.* Supression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist cetrorelix during ovarian stimulation. **Hum Reprod**, v.9, n.5, p.788-791, 1994.

EPPIG, J.J.; WIGLLESWORTH, K.; PENDOLA, F.L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **PNAS**, v.99, n.5, p.2890-2894, 2002.

ERICKSON, G.F. **Morphology and physiology of the ovary**. Chapter 2, 2003. Disponível em <<http://www.endotext.com>>

EVANS, H.M.; LONG, J.A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Anat Rec**, v.21, n.1, p.38-39, 1921.

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

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

GERBER, B. *et al.* Controversies in preservation of ovary function and fertility in patients with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v.108, n.1, p.1-7, 2007.

GHOSH, S. *et al.* Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on ovarian steroidogenic and folliculogenic activities in cyclophosphamide treated albino rats. **Reprod Toxicol**, v.15, p.221-5, 2001.

GLODE, L.M.; ROBINSON, J.; GOULD, S.F. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of GnRH. **Lancet**, v.317, n.8230, p.1132-1134, 1981.

GREENBERG, M.; URBACH, S. Preserving the fertility of children with cancer. **Med J Aust**, v.185, n.10, p.532-3, 2006.

GRUNDKER, C. *et al.* Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor kappaB-activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.10, p.3815-3820, 2000.

HALMOS, G. *et al.* Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist cetrorelix. **Pro Natl Acad Sci**, v.93, n.6, p.2398-2402, 1996.

HALMOS, G.; SCHALLY, A. Changes in subcellular distribution of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) after treatment with LH-RH antagonist cetrorelix. **PNAS**, v.99, n.2, p.961-965, 2002.

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

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Intern Rev Cytol**, v.124, p.43-101, 1991.

HOWELL, S.; SHALET, S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. **Endoc Metab Clin Nort Am**, v.27, n.4, p.927-943, 1998.

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

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

JARRELL, J. *et al.* Ovarian toxicity of cyclophosphamide alone and in combination with ovarian irradiation in the rat. **Cancer Res**, v.47, p.2340-2343, 1987.

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

JOOHI, N. *et al.* Spontaneous recovery of chemotherapy-induced primary ovarian failure: implications for management. **Clin Endocrin**, v.46, n.2, p.217-219, 1997.

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

KOVACS, M. *et al.* Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist of pituitary receptors for LH-RH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LH-RH. **PNAS**, v.98, n.4, p.1829-1834, 2001.

KOVACS, M.; SCHALLY, A. Comparison of mechanism of action of luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix and LH-RH agonist Triptorelin on the gene expression of pituitary LHRH receptors in rats. **PNAS**, v.98, n.21, p.12197-12202, 2001.

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

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

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

LETTERIE, G.S. Anovulation in the prevention of cytotoxic-induced follicular attrition and ovarian failure. **Hum Reprod**, v.19, n.4, p.831-7, 2004.

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

MACKIE, E.J.; RADFORD, M.; SHALET, S.M. Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's Disease. **Med Ped Oncol**, v.27, n.1, p.74-78, 1996.

MAGRATH, I. Limiting therapy for limited childhood non-Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med**, v.337, n.18, p.1304-6, 1997.

MALTARIS, T. *et al.* Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. **Asian J Androl**, v.8, n.5, p.515-533, 2006.

MALTARIS, T. *et al.* The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.130, n.2, p.148-155, 2007.

MANDL, A.M. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **J Exp Biol**, v.28, p.576-584, 1951.

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, n.4A, p.609-614, 2002.

MARHHOM, E.; COHEN, I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 62, n.1, p.58-72, 2006.

MAUNSELL, E. *et al.* Quality of life among long-term adolescent and adult survivors of childhood cancer. **J Clin Oncol**, v.24, n.16, p.2527-2535, 2006.

MEIROW, D. *et al.* The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. **Hum Reprod**, v.19, n.6, p.1294-9, 2004.

MEIROW, D.; NUGENT, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. **Hum Reprod Update**, v.7, n.6, p.535-543, 2001.

MITWALLY, M.F. Effect of cancer and cancer treatment on human reproduction. **Expert Rev Anticancer Ther**, v.7, n.6, p.811-22, 2007.

MONTZ, F.J.; WOLFF, A.J.; GAMBONE, C. Gonadal protection and fecundity rates in cyclophosphamide-treated rats. **Cancer Research**, v.51, n.8, p.2124-2127, 1991.

MOORE, H.C.F.; THERIAULT, R.L. Commentary: ovarian function does not equal fertility does not equal babies. **Oncologist**, v.12, p.1067-9, 2007.

MULLER, J.; COLE, I. Changes in mouse ovarian after prolonged treatment with cyclophosphamide. **Proc Soc Exp Biol Mol**, v.133, p.190-193, 1970.

OKTAY, K. New options expand possibilities for fertility preservation in cancer patients. **J Natl Cancer Inst**, v.98, n.19, p.1358-1360, 2006.

OKTAY, K. *et al.* Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. **Oncologist**, v.12, p.1055-1066, 2007.

OKTAY, K. *et al.* Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. **J Clin Oncol**, v.24, p.4044-6, 2006.

OKTAY, K.; SÖNMEZER, M. Fertility preservation in gynecologic cancers. **Curr Opin Oncol**, v.19, p.506-511, 2007.

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

PACEY, A.A. Fertility issues in survivors from adolescent cancer. **Cancer Treat Rev**, v.33, n.7, p.646-655, 2007.

PAPADAKIS, V. *et al.* Gonadal function in young patients successfully treated for Hodgkin's disease. **Med Pediatr Oncol**, v.32, p.366-372, 1999.

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

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

POTOLOG-NAHARI, C.; FISHMAN, A.; COHEN, I. Protection of ovarian function and fertility using a combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist during cancer treatment in young females. **Gynecol Endocrinol**, v.23, n.5, p.290-4, 2007.

PEREYRA PACHECO, B. *et al.* Use of GnRH analogs for functional protection of the ovary and preservation of fertility during cancer treatment in adolescents: a preliminary report. **Gynecol Oncol**, v.81, n.3, p.391-397, 2001.

PETREK, J. *et al.* Menstrual recovery after cancer with treatment type. **J Clin Oncol**, v.24, n.7, p.1045-1051, 2006.

PINSK, J. *et al.* Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetrorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats. **Endocrinology**, v.137, n.8, p.3430-6, 1996.

PLOWCHALK, D.R.; MATTISON, D.R. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1.Effects on ovarian structure and function. **Reprod Toxicol**, v.6, n.5, p.411-421, 1992.

RECCHIA, F. *et al.* Goserelin as ovarian protection in the adjuvant treatment of premenopausal breast cancer: a phase II pilot study. **Anticancer Drugs**, v.13, n.4, p.417-424, 2002.

REICHMAN, B.; GREEN, K. Breast cancer in young women: effect of chemotherapy on ovarian function, fertility and birth defects. **Monogr Natl Cancer Inst**, n.16, p.125-129, 1994.

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

SCHWAHN, M. *et al.* Disposition and metabolism of cetrorelix, a potent luteinizing hormone-releasing hormone, and rats and dogs. **Drug Metab Dispos**, v.28, n.1, p.10-20, 1999.

SCHWAHN, M.; NAGARAJA, N.V.; DERENDORF, H. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of cetrorelix, a novel LH-RH antagonist, and testosterone in rats and dogs. **Pharm Res**, v.17, n.3, p.328-335, 2000.

SHARP, P.; REGINA, M. **The Laboratorie Rat**. CRC Press, Boca Raton, 1998.

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

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

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

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

THOMSON, A.B.; WALLACE, W.H.B. Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. **Eur J Cancer**, v.38, p.468-477, 2002.

TILLY, J.L. Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. **Toxicol Lett**, v.102, n.3, p.497-501, 1998.

WALLACE, W.H. *et al.* Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Med Pediatr Oncol**, v.21, p.333-9, 1993.

WALLACE, W.H.; ANDERSON, R.; BAIRD, D. Preservation of fertility in young womem treated for cancer. **Lancet Oncol**, v.5, p. 269-0, 2004.

WAXMAN, J.H. *et al.* Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.19, n.2, p.159-162. 1987.

WHITEHEAD, E. *et al.* The effect of combination chemotherapy on ovarian function in women treated for Hodgkin's disease. **Cancer**, v.52, p.988-993, 1983.

WILDIERS, H. *et al.* Fertility preservation in (Breast) cancer patients: Is it Safe? **J Clin Oncol**, v.24, n.33, p.5335-6, author reply 5337-8. 2006.

YOSHINAGA, K.; HAWKINS, A.; STOCKER, J.F. Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. **Endocrinology**, v.85, p.103-112, 1969.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. **Curr Drug Ther**, v.1, n.1, p.55-84, 2006.

Site:

www.seer.cancer.gov, acessado em 08/05/08.

www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/c/Cetrotideinj.htm) acessado em 08/05/2008.

ANEXO

