

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

JACIRA RIBEIRO CAMPOS

**O tempo de criopreservação não aumenta o dano no tecido
ovariano congelado para fins de preservação de fertilidade**

RIBEIRÃO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JACIRA RIBEIRO CAMPOS

**O tempo de criopreservação não aumenta o dano no
tecido ovariano congelado para fins de preservação
de fertilidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

RIBEIRÃO PRETO

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Campos, Jacira Ribeiro

O tempo de criopreservação não aumenta o dano no tecido ovariano congelado para fins de preservação de fertilidade, 2010.

107 p. il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sá

1. Criopreservação. 2. Tecido ovariano. 3. Viabilidade.

4. Densidade folicular. 5. Cultivo de tecido.

Dedicatória

A minha mãe, **Eliane Maria Ribeiro Campos**, meu alicerce inabalável na fé e
esperança, o meu maior exemplo de coragem, perseverança e luta. O amor
maior.

A meu pai, **Cleber de Oliveira Campos**, exemplo de disciplina, otimismo e
força de vontade.

A minha irmã, **Araceli Ribeiro Campos**, metade que me completa.

A minha orientadora, **Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva**, por ter sido, antes de tudo, uma verdadeira Mãe, acolhedora e amiga. Que com muita paciência soube acalmar meu coração tão apertado, com medo de um futuro desconhecido e promissor. Obrigada pelo carinho, conhecimento cedido e confiança depositada no meu trabalho.

Agradecimientos

A Deus pelas oportunidades colocadas em meu caminho e pela força para levantar e seguir em frente após cada tropeço que levei.

A todos os meus familiares que sempre apoiaram a minha luta, que estiveram ao meu lado vibrando em todas as conquistas e apoiando nas derrotas, mostrando sempre o lado positivo das situações.

Ao e a Comissão de Pós-graduação em Biologia da Reprodução da FMRP-USP pela oportunidade de desenvolver meu mestrado neste setor.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia desta faculdade, pelos ensinamentos e grande apoio prestado.

Ao Laboratório de Oncopatologia da FMRP-USP, pela parceria formada, em especial ao Prof. Dr. Sérgio B. Garcia e a funcionária Rose, pela paciência e estimável ajuda com o material que lhe foi confiado.

A banca examinadora, pela disponibilidade em participar deste momento importante do meu desenvolvimento profissional.

Um agradecimento especial a amiga Suelen Bezerra, por estar sempre disposta a ajudar e ouvir minhas lamentações sobre as infinitas burocracias que são necessárias para vencer mais esse desafio.

A todos que trabalham no Setor de Reprodução Humana e aos funcionários do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, agradeço as oportunidades proporcionadas ao meu crescimento profissional.

Agradeço em especial a Albina, Cidinha, Marilda, Marisa, Cristina Picinato, Roberta, Débora e Cristiana Ribas por tornarem meus dias mais alegres e produtivos na companhia de vocês.

A equipe do centro cirúrgico e aos residentes, pela colaboração ímpar com a pesquisa.

Ao Bruno Ramalho, pela amizade e confiança depositada em mim para delinear seu sonho de trabalho.

Ao Dr. Júlio César Rosa e Silva, pela amizade e inigualável colaboração cedida para a realização deste projeto.

A Dra. Alessandra Vireque, pelo companheirismo, amizade, preciosos ensinamentos e troca de conhecimentos fundamentais para meu crescimento profissional.

A Luciana Resende, pelo grande apoio no início da realização desse sonho

A Jhenifer, Lú Dib, Michele (Fia), Carolina (Xuxu), Lúcia (Irmã), “Daias” (Bulgarelli e Pedroso), Helena (Fiota), Gabriela, Jú Meola, Flávia e Daniel Dentillo, pela amizade individual e verdadeira e pelo companheirismo inquestionável nessa caminhada. Cada riso e cada lágrima foram fundamentais para o meu sustento emocional.

A Aline Granada, Lígia Bertolino, Tânia Becker e Gislaine Folha, por me acolherem com tanto carinho em casa, pela maravilhosa convivência do dia a dia e pela preciosa troca de experiência de vida. Vocês foram fundamentais.

Às mulheres que participaram deste estudo como voluntárias, pela colaboração e pela confiança depositada.

Ao CNPq e a FAEPA pelo apoio financeiro imprescindível na confecção desta pesquisa.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

“pelo trabalho do Aprendiz se conhece o Mestre... O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.”

Drummond

CAMPOS, JR. “O tempo de criopreservação não aumenta o dano no tecido ovariano congelado para fins de preservação de fertilidade”. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: O câncer invasivo é diagnosticado em mais de 600.000 pessoas /ano nos Estados Unidos, 269.800 dos acometidos são mulheres e 8% apresentam idade abaixo de 40 anos ^[1], com taxas progressivamente maiores de sobrevida. Estima-se que uma em cada 250 jovens adultas é sobrevivente do câncer infantil, mas com alguns efeitos colaterais ^[2, 3]. Um dos principais problemas, especialmente para as jovens pacientes, é que a terapia destrói uma proporção significativa da população folicular, o que pode resultar em infertilidade permanente ^[3, 4, 5]. Sendo estas pacientes tão jovens, o tempo que o tecido permanecerá congelado é bastante longo e não está bem claro se o tempo de congelamento amostra interfere na qualidade do tecido preservado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o tempo de congelamento da amostra interfere na população folicular, na viabilidade do tecido após o descongelamento e na capacidade funcional do tecido para a esteroidogênese.

Material e Métodos: foram incluídas na casuística 17 pacientes, em idade reprodutiva, submetidas à laqueadura laparoscópica, durante a qual foi realizada uma biopsia ovariana de cerca de 2 x 2 cm, a qual foi subdividida em 3 fragmentos. Um foi processado à fresco e os outros dois embebidas em meio contendo crioprotetor e congelados para posterior descongelamento e análise. Foi utilizada a técnica de congelamento lento. Os fragmentos foram divididos em três para análise nas amostras a fresco (GF), e descongeladas após 30 (G30) e 180 (G180) dias. Cada fragmento foi subdividido em três: 1) para fixação com formaldeído e inclusão em parafina, seguido de cortes seriados com espessura de 4 μ e a cada 3 cortes, o material foi corado com HE (hematoxilina/eosina) e analisado com microscópio com aumento de 400 vezes para contagem de folículos. O número total de folículos/mm³ foi calculado usando-se a seguinte fórmula: $Nt=(No \times St \times t)$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm², St é o total de cortes em 1 mm³ do ovário e t é a espessura do corte. 2) Digestão química com colagenase e aplicação técnica DEAD-

LIVE (fluorescência por calceína AM e brometo de ethidium) para avaliação da viabilidade folicular, dada por %de foliculos viáveis. 3) Cultivo de tecido ovariano em meio quimicamente definido para avaliação da capacidade esteroidogênica do tecido através da dosagem de estradiol e progesterona no meio de cultivo nos tempos 0, 48, 96 e 144h.

Resultados: A idade média das pacientes incluídas foi de $29,0 \pm 2,78$ anos, com paridade média de $2,94 \pm 0,24$ filhos. A densidade folicular média foi $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ e $296,8 \pm 269,0$ foliculos/mm³, para os tecidos frescos e descongelados com 30 e 180 dias, respectivamente, não havendo diferença entre eles ($p=0,46$). A viabilidade folicular foi maior no tecido fresco (GF=93,4% de foliculos viáveis) quando comparado com os tecidos criopreservados (G30=70,8%; $p<0,001$ e G180=78,4%; $p<0,001$), embora não tenha havido diferença na viabilidade entre as amostras descongeladas ($p>0,05$). Com relação à capacidade esteroidogênica do tecido não houve redução na produção de estradiol e progesterona após a criopreservação (Estradiol: GF= 2026 ± 1782 pg/ml, G30= 1272 ± 1081 pg/ml e G180= $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; Progesterona: GF= $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, G30= $0,26 \pm 0,08$ ng/ml e G180= $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$).

Conclusões: O processo de congelamento lento de ovário, embora comprometa parcialmente o tecido, permite conservar cerca de 80% de viabilidade folicular e preserva a capacidade esteroidogênica tecidual similar ao tecido fresco. Ainda que a pequena casuística limite conclusões mais definitivas com relação à função do tecido, o fato de comprovar a produção hormonal no meio encoraja a implementação desta técnica na preservação da fertilidade feminina, já que ensaios clínicos para esta finalidade são eticamente complicados e os estudos atualmente apresentados com série de casos apresentam pequenas amostras ou relatos isolados de caso. Além disso, nos casos de reimplante, indícios de falência do enxerto provavelmente se devem mais à isquemia do que à criopreservação propriamente dita.

Palavras-chave: tecido ovariano, criopreservação, viabilidade, densidade folicular, cultivo de tecido.

Abstract

CAMPOS, JR. “**The time of cryopreservation do not increase the damage in frozen ovarian tissue for fertility preservation**”. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introduction: According to the American Cancer Society (2009) 600.000 cases of invasive cancer are diagnosed every year; 269.800 of these patients are women and 8% of them are in reproductive age, moreover the survival rates are still increasing. The estimation is that nowadays one in every 250 young women is a childhood cancer survivor, although with some side effects. One of the main problems, especially for young patients, is that the applied techniques are usually, resulting in permanent infertility. With this purpose many alternatives for fertility preservation have been proposed, among them ovarian cryopreservation is one of the most studied. Considering the time this tissue is going to be kept frozen, one may concern about the quality of the preserved tissue and if the time of preservation may increase the damaged caused in this process. With the objective of evaluate the time effect on ovarian tissue cryopreservation this study analyzed fresh and frozen-thawed samples according to its follicular density, follicular viability and evaluate de time effect on ovarian tissue cryopreservation by analyzing the *in vitro* steroidogenic capacity of fresh and frozen-thawed samples, comparing thawing after 30 and 180 days after the freezing procedure.

Material and Methods: Seventeen patients in reproductive age were included. All of them were elective for laparoscopic tubal ligation during which an ovarian biopsy of 2x2cm was performed. This fragment was then divided in three parts, one processed in fresh (FG) and two of them were embedded in cryoprotectant solution followed by slow freezing procedure for posterior analyzes after thawing with 30 (G30) and 180 days (G180). Each fragment was then subdivided in two parts: 1) for formaldehyde fixation and paraffin embedment, followed by 4 μm slices cut, where one in every 3 slices were stained with hematoxilin/eosin dye for follicular count in order to identify the follicular density. The follicular density was calculated by the formula $Nt=(No \times St \times t)$, where Nt is the total number of follicles, No is the number of follicles count for each 1 mm^2 , St is the total number of slices in 1 mm^3 of ovary and t is the slice thickness; 2) Chemical digestion

with collagenasa to perform the DEAD-LIVE technique (a fluorescent method where calcein and ethidium bromide are used to identify dead or live cells) in order to evaluate follicular viability demonstrated by the % of viable follicles; and 3) 4 fragments of 2x2mm were immersed in 1ml of a chemically defined medium (alfa-MEM, supplemented PVP-40, insulin, IGF-1, transferrine, sodium selenit and antibiotics), with no hormones supplementation. These tissue were cultured at 37°C and 5%CO₂ for six days (144h). Seventy percent of all the medium were collected after 48, 96 and 144h and stored in -20°C for posterior estradiol and progesterone measurements, the volume taken was then replaced to complete 1ml of medium. The aim of this process was to test the steroidogenesis capacity of the tissue before and after cryopreservation.

Results: The mean age of the included patients was $29,0 \pm 2,78$ years, and mean parity was $2,94 \pm 0,24$ children. The mean Follicular density was $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ and $296,8 \pm 269,0$ follicles/mm³ for fresh, 30 and 180 days frozen-thawed tissue, respectively, with no differences between the three groups ($p=0,46$). Follicular viability was higher in fresh tissue (FG=93,4% of viable follicles) than in frozen-thawed one (G30=70,8%; $p<0,001$ and G180=78,4%; $p<0,001$), although there was no difference in viability among G30 and G180 ($p>0,05$). In relation to the steroidogenic capacity of the tissue no reduction was observed in estradiol and progesterone production after cryopreservation procedure independently of the time of conservation (Estradiol: FG= 2026 ± 1782 pg/ml, G30= 1272 ± 1081 pg/ml and G180= $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; Progesterone: FG= $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, G30= $0,26 \pm 0,08$ ng/ml and G180= $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$).

Conclusions: The slow freezing procedures for ovarian cryopreservation allow the maintenance of 70% of the follicular pool viability, and the time of conservation in low temperature do not seems to compromise the sample. The ovary cryopreserved maintain the steroidogenic capacity independently of the time of conservation in low temperature. Thus the damage probably happens exclusively during the freezing and thawing procedures and not while frozen.

Keywords: ovarian tissue, cryopreservation, viability, follicular density, tissue culture.

Figura 1A. Etapas da biópsia ovariana por cirurgia laparoscópica	51
Figura 1B. Tecido ovariano em processo de remoção de tecido medular.....	51
Figura 1C. Fragmentos do tecido cortical ovariano, subdividido e embebido em meio de transporte (M199), pré-processamento para formol, digestão, cultivo e congelamento	51
Figura 1D. Placa de cultivo de tecido ovariano contendo 4 fragmentos de 2x2mm cada.....	51
Figura 1E. Corte histológico para medição da área da amostra.....	51
Figura 1F. Fragmento de tecido ovariano cortado em diminutos fragmentos pré-digestão....	51
Figura 1G. Folículos primordiais e primários isolados após procedimento de digestão química com colagenase.....	51
Figura 2. Cortes histológicos de tecido ovariano fresco (A) e congelado/descongelados de 30 dias (B) e 180 dias (C), da mesma paciente, corados com HE para avaliação da densidade folicular.....	57
Figura 3. Densidade folicular (folículos/mm ³) do tecido ovariano fresco e congelado-descongelados, após 30 e 180 dias	58
Figura 4. Comparação da viabilidade folicular média entre os tempos 0, 30 e 180 dias	58
Figura 5. Comparação da concentração de estradiol nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.....	59
Figura 6. Comparação da concentração de progesterona nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.....	60

Tabela 1. Soluções empregadas no congelamento	47
Tabela 2. Densidade Folicular/mm ³	80
Tabela 3. Viabilidade folicular avaliada pela técnica Dead-Live nos tempos 0, 30 e 180 dias após descongelamento.	80
Tabela 4. Dosagens E2 (pg/ml) e P4 (ng/ml)	81

Lista de Abreviaturas

GF: grupo fresco

G30: grupo descongelado após 30 dias

G180: grupo descongelado após 180 dias

HE: hematoxilina/eosina

FOP: falência ovariana precoce

DNA: ácido dexoxirribonucléico

TRA: técnica de reprodução assistida

DMSO: dimetil-sulfóxido

PROH: 1-2-Propanediol

MIV: maturação *in vitro*

α -MEM: minimum essential medium

PVP-40: polivinilpirrolidona

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina

M199: medium 199

P4: progesterona

E2: 17 β -estradiol

CG: células da granulosa

SH10%: albumina humana a 10%

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Criopreservação	32
1.2. A restauração da fertilidade	35
1.2.1. Isolamento folicular e maturação <i>in vitro</i> (MIV)	35
1.2.2. Reimplante	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivos principais	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1. Desenho do Estudo	44
4.2. Critérios de inclusão e exclusão	44
4.2.1. Critérios de inclusão	44
4.2.2. Critérios de Exclusão	45
4.3. Métodos	45
4.3.1. Descrição da técnica de tratamento das amostras	45
4.3.2. Criopreservação das amostras	47
4.3.3. Metodologias de avaliação da qualidade tecidual	49
4.4. Análise estatística	54
5. RESULTADOS	55
6. DISCUSSÃO	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	79
ARTIGO CIENTÍFICO	85

1. Introdução

O câncer invasivo é diagnosticado em mais de 600.000 pessoas nos Estados Unidos a cada ano, 269.800 dos acometidos são mulheres e 8% apresentam idade abaixo de 40 anos ^[1]. Com a utilização de modernos protocolos para tratamento de câncer, 80% dos doentes irão sobreviver. Foi estimado que, nos próximos anos, uma em cada 250 jovens adultas será sobrevivente do câncer infantil, mas com alguns efeitos colaterais ^[2, 3]. Um dos principais problemas, especialmente para as jovens pacientes, é que a terapia destrói uma proporção significativa da população folicular, o que pode resultar em infertilidade permanente ^[3, 4, 5]. Embora o tratamento e a sobrevivência sejam o foco principal dos profissionais de saúde e também dos doentes com câncer, é conveniente considerar a sua qualidade de vida após o tratamento, incluindo a possibilidade de ter filhos ^[6, 7].

A ação citotóxica da radiação ionizante e dos quimioterápicos, com grande frequência, leva à ocorrência de falência ovariana precoce (FOP), que implica sérias conseqüências a longo prazo, como redução da massa óssea levando a osteoporose, aumento na incidência de doenças cardiovasculares, ocorrência precoce de sintomas climatéricos e infertilidade ^[8]. A ausência temporária ou permanente das funções endócrina e reprodutiva dos ovários depende, principalmente, da idade da paciente no momento do tratamento gonadotóxico e das doses administradas ^[9, 10]. O risco de infertilidade varia de acordo com o tratamento, a quimioterapia induzida por esquemas de tratamento individual baseada em agentes alquilantes e platina possui o maior potencial de dano ao sistema reprodutivo ^[7, 11, 12]. Uma variedade de tratamentos de câncer pode causar infertilidade nos pacientes que se destinam a cura. Alguns protocolos de quimioterapia podem causar insuficiência prematura do ovário ou insuficiência ovariana aguda que ocorre durante ou logo após o tratamento do câncer, ou menopausa prematura seguida de uma janela de função normal após a terapia.

Para as pacientes que recebem quimioterapia para tratamento da Doença de Hodgkin, a ocorrência de FOP é observada em 69% dos casos até 29 anos de idade e em 96% das

pacientes com 30 ou mais anos ^[8]. Já para mulheres submetidas a radioterapia com doses maiores que 300 cGy, a incidência de FOP pode ser superior a 60%, sendo que a exposição a 4 Gy de irradiação pélvica é a dose letal para oócitos, e 97% das mulheres que recebem de 5 a 10,5 Gy vão posteriormente apresentar falência ovariana. A combinação de quimioterapia e radioterapia é particularmente devastadora. No entanto, estudos em mulheres que conceberam anos após o seu tratamento quimioterápico não encontraram aumento significativo em malformações congênitas ou neoplasias malignas na prole ^[5, 13, 14, 15].

A cada dia mais pacientes estão sobrevivendo ao câncer, graças ao diagnóstico precoce e tratamento adequado. Embora adultos sobreviventes tendam a ter maior interesse na preservação e fertilidade reprodutiva, é fundamental ter em mente que outras opções devem ser disponibilizadas aos jovens pacientes com câncer. Os profissionais de saúde devem estar preparados para discutir sobre fertilidade com os pacientes, independentemente da sua idade ou estado civil no momento do início da terapia, para que eles compreendam as possíveis conseqüências do tratamento do câncer e conheçam as alternativas disponíveis para preservação da fertilidade ^[16].

Outros grupos de paciente podem ser candidatos a preservação de fertilidade, incluindo mulheres com endometriose, e os pacientes tratados com agentes quimioterápicos para doenças não malignas como as auto-imunes e colágeno-vasculares. Pessoas com deficiências de reparação do DNA também são mais suscetíveis à gonadotoxicidade ^[16, 17]. Podem incluir ainda a incompatibilidade de idade da maternidade e do exercício dos planos de carreira, ou simplesmente ainda não ter encontrado um parceiro adequado para iniciar uma família ^[18, 19].

A evolução contínua das técnicas de reprodução assistida (TRA) permite que se considerem várias estratégias de tentativa de manutenção da função reprodutiva em pacientes egressas de tratamentos de doenças neoplásicas, dentre as quais se incluem manipulação

hormonal, transposição dos ovários, criopreservação de embriões, gametas e de tecido cortical ovariano.

O único método estabelecido até o momento e rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução assistida é a criopreservação de embriões, mas essa opção requer estimulação ovariana, coleta de oócitos e o emprego das TRA, o que pode levar entre 2 a 5 semanas. Assim, o atraso no início do tratamento quimioterápico para o armazenamento de embriões não é factível para algumas pacientes e pode ser até mesmo, um fator de piora no prognóstico em alguns tipos de câncer. O congelamento de embriões também não se aplica a pacientes sem um parceiro fixo, com quem deseje constituir prole futura, como é o caso das adolescentes. Uma alternativa seria a utilização de amostras provenientes de banco de sêmen, entretanto este tipo de abordagem esbarra em questões religiosas, morais e éticas [3, 11, 20, 21].

Além disso, a estimulação não deve ser feita em mulheres que apresentam tumores hormônio dependentes, como o câncer de mama, apesar de terem surgido novos protocolos de estimulação com o uso do Tamoxifeno e de inibidores da aromatase (Letrozole), mostrando resultados animadores [22]. Embora a captação de oócitos possa ser realizada sem estimulação ovariana (ciclo natural), o rendimento final de produção embrionária em ciclos não estimulados é extremamente baixo [23] e, portanto, não recomendado para as pacientes com câncer [22]. Outro contraponto a ser considerado diz respeito às implicações éticas do congelamento de embriões. Devemos lembrar que por tratar-se o câncer de uma doença com potencial de desfecho desfavorável e óbito da paciente, há necessidade de se esclarecer ao casal que não há possibilidade ética e legal de descarte destes embriões em caso de óbito de um dos cônjuges. No entanto, mesmo que o tratamento oncológico seja bem sucedido, a transferência destes embriões para o útero somente deverá acontecer após alguns anos de remissão da doença, e independentemente da situação do relacionamento deste casal após

estes anos os embriões existem e necessitam de um destino, seja ele o útero materno ou a doação para pesquisa.

Alguns questionamentos éticos devem ser levantados quando da decisão do casal: diante da morte da parceira qual o direito do parceiro (pai) sobre estes embriões? E neste caso, haveria possibilidade de se transferir estes embriões para uma nova parceira deste pai biológico? Como se contextualiza a família da mãe biológica, falecida? A legislação brasileira não apresenta respostas para estas perguntas, não existe nem mesmo lei que aborde qual o destino do embrião congelado. Todas as condutas atuais se baseiam no bom senso da equipe que assiste a paciente, em uma boa orientação do casal e nas recomendações do Conselho Federal de Medicina.

Diante de todas estas questões, seguidas da difusão das técnicas de congelamento ovariano para preservação de fertilidade, tornou-se imprescindível avaliar a qualidade do tecido recuperado após a criopreservação.

A criopreservação de tecido ovariano fundamenta-se no princípio de que folículos inativos (primordiais) resistem melhor a criotoxicidade do que folículos em processo de maturação ^[24, 25], pois apresentam metabolismo reduzido, ausência de zona pelúcida e maior facilidade de penetração dos crioprotetores devido ao menor tamanho folicular ^[26]. Além disso, folículos primordiais têm maior potencial de reparo a danos nas organelas e outras estruturas sofridos durante a fase prolongada de congelamento na criopreservação.

Os danos celulares funcionais causados pela criopreservação podem, entretanto, ser irreversíveis se as temperaturas caírem abaixo dos níveis ideais. Variações térmicas muito abruptas podem interferir no transporte de água através da membrana celular e propiciar a formação de cristais de gelo e depósitos de sais no interior da célula ^[27]. Também as diferenças de pressão osmótica entre os meios intra e o extracelular podem levar a mudança de volume no oócito com conseqüente dano à membrana plasmática e às organelas ^[28, 29].

Outro fator que pode propiciar dano celular é a presença de fusos meióticos nas células foliculares; foi demonstrado que pequenas variações de temperatura podem danificar os microtúbulos que compõem o fuso, podendo cursar com perdas cromossômicas e aneuploidias durante o término da primeira divisão meiótica no processo de maturação subsequente ^[30]. Além disso, também tem sido demonstrado que o congelamento pode danificar o citoesqueleto das células ou oócitos, com prejuízo no tráfego de moléculas e organelas no processo de divisão celular ^[31]. A fase de reexpansão (descongelamento) do tecido também pode ser deletéria se o meio externo não for adequado ^[32].

O congelamento de tecido ovariano é atualmente proposto com o intuito principal de manter a função ovariana preservada, tanto do ponto de vista de fertilidade como de produção hormonal, o que não se alcança com os demais métodos. Além disso, essa opção surge no contexto atual para servir a grupos específicos de pacientes para as quais as demais técnicas não são recomendáveis, como: (1) pacientes pré-púberes, cujas gônadas ainda não estão sob controle do eixo hipotálamo-hipófise; (2) mulheres que não tenham parceiro e não desejam embriões oriundos da fertilização com sêmen de doador; (3) pacientes portadoras de neoplasias estrogênio-dependentes, como o câncer de mama; e (4) mulheres portadoras de neoplasias malignas que necessitam de abordagem imediata, para as quais o retardo no início do tratamento pelo tempo necessário para indução da ovulação poderia levar a mudanças no prognóstico da paciente. Particularmente sob esse aspecto, a coleta do tecido cortical ovariano para criopreservação oferece a vantagem de poder ser realizada em qualquer momento do ciclo menstrual da paciente, e possibilitar a aquisição de centenas de milhares de folículos primordiais ^[33, 34]. É relevante comentar sobre as desvantagens encontradas quanto à criopreservação de tecido cortical ovariano, sendo estas, (1) submeter à paciente a procedimentos cirúrgicos para colheita de tecido ovariano; e (2) possibilidade de reintroduzir células malignas no caso de posterior reimplante do tecido ^[34].

Os procedimentos de criopreservação devem garantir viabilidade folicular e integridade dos tecidos em contato célula a célula [35, 36, 37]. Em ovários de adultos mamíferos, os folículos estão presentes em vários estádios de desenvolvimento. Folículos primordiais podem ser considerados a "forma de armazenamento" do oócito no ovário, sendo uma valiosa fonte de oócitos que poderia ser utilizado para fins de fertilidade [38, 39, 40]. Embora muitos autores acreditem no congelamento de tecido ovariano como uma técnica de preservação de fertilidade promissora, danos no núcleo e DNA folicular humano e ovino após o congelamento e descongelamento tem sido relatado com imunohistoquímica e hibridização fluorescente in situ [15, 41, 42].

O processo de congelamento e descongelamento dos ovários pode causar danos teciduais, possivelmente pela formação de gelo intracelular e a toxicidade dos crioprotetores. A análise histológica deste tecido indicou que uma proporção de folículos é danificada durante o processo de congelamento e descongelamento em rato, sagüi e tecido ovariano humano [15, 43, 44].

1.1. Criopreservação

A criopreservação consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C . Os únicos estados físicos existentes abaixo de aproximadamente -130°C são o cristalino e o vítreo e, em ambos, a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrem muito lentamente ou são paralisadas completamente [45]. Portanto, à temperatura do nitrogênio líquido, a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por longos períodos de tempo, com manutenção

da estabilidade do material genético. A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende de sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação, resfriamento e reaquecimento ^[46].

Os agentes crioprotetores são substâncias que protegem as células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. Em geral, esses agentes podem agir (1) penetrando nas células (crioprotetores intracelulares) e substituindo as moléculas de água da célula, (2) reduzindo o ponto de congelamento, (3) protegendo membranas celulares (crioprotetores extracelulares) por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos, (4) aumentando a viscosidade do meio, ou (5) diminuindo a concentração de eletrólitos durante criopreservação, diminuindo, assim, o risco de danos osmóticos. Contudo, agentes crioprotetores podem ser tóxicos, bem como podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células ^[47].

A utilização de crioprotetores reduz o dano celular durante a preservação do tecido ^[48]. Apesar dos crioprotetores serem imprescindíveis para o sucesso deste processo, pode haver citotoxicidade em casos de exposição prolongada a estes agentes, sendo que a perda de folículos primordiais com o uso de crioprotetores varia de 15 a 90% dependendo do protetor utilizado ^[49]. Os agentes crioprotetores podem ser alcoóis, aminas, açúcares e proteínas, e para que sejam efetivos devem apresentar algumas propriedades como: alta solubilidade em água para diminuir o ponto de congelamento, alta permeabilidade para minimizar o gradiente osmótico e baixa toxicidade. As soluções crioprotetoras mais comuns são as compostas das combinações: (a) Dimetil-Sulfóxido (DMSO) e soro humano; (b) Etileno-Glicol (1,5M) e soro fetal bovino; e (c) 1-2-Propanediol (PROH), Sucrose (0,1M) e Albumina sérica humana ^[6, 50, 51]. A espessura da camada cortical requer um tempo de exposição aos crioprotetores para penetrar em toda sua profundidade e isso pode acarretar danos ao tecido como conseqüências da toxicidade destas substâncias.

O congelamento lento é caracterizado pela exposição das células ou tecidos a baixas concentrações de agente crioprotetor ($\sim 1,5$ mol/l) ^[52], por um período que pode variar de 20 ^[53, 54] a 60 minutos ^[44]. Nesse método, o material é resfriado lentamente a uma velocidade de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -4 a -9°C , mantendo-se nesta temperatura por um curto período (10 a 15 min) para estabilização térmica e realização do seeding, o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular ^[55]. Em seguida, a amostra continua sendo resfriada lentamente a uma velocidade de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Uma vez que a desidratação celular é suficientemente atingida (entre -30 a -80°C), o material é estocado em nitrogênio líquido (-196°C). Esta técnica tem se mostrado como efetiva na conservação do tecido ovariano ^[9, 56, 57]. Sua utilização necessita de equipamento específico e de alto custo, mas em contra partida, os crioprotetores utilizados apresentam menor concentração, sendo menos tóxico para as células.

A vitrificação (formação de estado vítreo) foi idealizada por Luyet em 1937 ^[58]. Depois de quase 50 anos, Rall e Fahy ^[58] descreveram a vitrificação como uma alternativa ao processo de. Ao contrário do congelamento lento, a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agente crioprotetor (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), geralmente à temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo. De acordo com Stachecki e Cohen ^[59], a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem levados em consideração; o primeiro consiste no fato de que as altas concentrações de agentes crioprotetores utilizadas na exposição aumentam os efeitos tóxicos e, em segundo lugar, apesar desse efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, por ser uma congelação altamente rápida, aumenta as taxas de sobrevivência. A vitrificação tem sido utilizada com êxito em tecido ovariano com o mínimo de mudanças na morfologia tecidual ^[15, 60, 61].

Os resultados obtidos com esta técnica têm maior número de recém nascidos vivos quando comparado com o congelamento lento para a criopreservação de tecido ovariano. Norteadando a sua incorporação na clínica como alternativa, entretanto a técnica de escolha para o procedimento não é consensual entre os autores e existem vários serviços que apresentam resultados satisfatórios com o congelamento lento. Neste sentido, recentemente alguns experimentos comparando a vitrificação e o congelamento lento das amostras do tecido do ovário de mamíferos mostrou que a vitrificação também pode garantir o armazenamento de folículos viáveis após o aquecimento, porém o congelamento lento é mais eficaz ^[37].

Os esforços vertem agora na tentativa de elucidar o potencial do tecido ovariano congelado e descongelado na manutenção da capacidade reprodutiva, seja através da maturação *in vitro* de oócitos isolados ou autotransplante do tecido criopreservado ^[62].

1.2. A restauração da fertilidade

1.2.1. Isolamento folicular e maturação *in vitro* (MIV)

A maturação do oócito mamífero é um processo complexo que envolve a retomada e progressão do ciclo meiótico e a reprogramação de eventos citoplasmáticos, pré-requisitos para a fertilização monospermica e o desenvolvimento embrionário inicial ^[63]. *In vivo*, a ocorrência da maturação oocitária é caracterizada pelo alto potencial de desenvolvimento da célula pós-fertilização, contudo, em condições experimentais (maturação *in vitro* (MIV) ou por meio de técnicas de superovulação) a qualidade do oócito cai drasticamente. Esta etapa limitante na tecnologia da produção *in vitro* de embriões levou à formulação de diferentes sistemas de MIV com meios de cultura acrescidos de células ou tecidos e/ou suplementados

com fluidos biológicos na tentativa de mimetizar os eventos que ocorrem no microambiente folicular [64, 65, 66, 67, 68, 69, 70].

Atualmente, mais de 300 crianças saudáveis já nasceram de oócitos maturados *in vitro* [71]. Esta produção científica atual sobre as técnicas de MIV se refere principalmente à maturação de oócitos imaturos já em processo de desenvolvimento (vesícula germinativa), entretanto no caso do isolamento de folículos a partir do tecido ovariano os folículos são obtidos ainda em estágio primordial e primário. Para estes a literatura é bastante escassa. Neste sentido várias pesquisas têm sido realizadas para melhorar as taxas de maturação *in vitro* desses oócitos [72, 73]. Apesar de todos os esforços não há relato de nenhum caso de maturação de folículos primordiais humanos que tenham atingido estágio de maturidade suficiente para ser fertilizado [74].

1.2.2. Reimplante

Nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Em 1956, Parkes [56] mostrou a restauração da função endócrina após transplante autólogo de ovário em ratas. Devido à falta de aplicabilidade clínica, esse método de preservação da fertilidade ficou somente no campo das pesquisas por aproximadamente 30 anos, até que em 1994, Gosden *et al.* [56] obtiveram sucesso restaurando a fertilidade em ovelhas após transplante autólogo de tecido ovariano congelado/descongelado e mostraram novas perspectivas, especialmente como estratégia para preservar a função ovariana em mulheres com câncer.

O tecido ovariano congelado/descongelado pode ser transplantado de duas maneiras: transplante ortotópico – colocando o ovário ou fragmentos de ovário na fossa ovárica próximo ao ligamento infundíbulo-pélvico ou transplante heterotópico – implantando o tecido em

qualquer sítio fora de seu *locus* original. Uma gravidez espontânea pode, teoricamente, ser obtida quando do transplante ortotópico em uma paciente com trompas pérvias. No caso do heterotópico a gravidez só será possível através de procedimentos de Reprodução Assistida [75].

Essas técnicas de reimplante oferecem como principais vantagens a restauração da função reprodutiva e esteroidogênica da paciente submetida aos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos. Entretanto o fato de ter documentado na literatura casos de manutenção reprodutiva, não quer dizer que toda função ovariana está preservada. Alguns autores já conseguiram com os reimplantes ortotópico e heterotópico a restauração da função esteroidogênica, ciclos menstruais normais com gravidez espontânea, embriões viáveis por procedimentos de reprodução assistida e nascidos vivos [9, 25, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88].

Aparentemente os principais obstáculos para o sucesso da restauração da fertilidade a partir do córtex ovariano congelado/descongelado são: a realização de um novo procedimento cirúrgico para o reimplante, o possível reimplante de células malignas presentes no tecido criopreservado e aderências e dano isquêmico maciço aos folículos até o desenvolvimento da neovascularização [15, 89]. A maioria dos folículos que sobrevivem à criopreservação sofre isquemia durante o tempo necessário para neovascularização [90]. Desde então, o congelamento de tecido ovariano por técnicas de criopreservação têm sido motivo de inúmeras pesquisas e existem dados recentes mostrando recuperação completa da função gonadal após transplantes de isoenxertos em camundongos, ratos, ovelhas, primatas [6] e humanos [9], inclusive com nascimento de prole sadia. O reimplante em si, independente do congelamento prévio do tecido, parece ser bastante promissor com relação ao restabelecimento da função gonadal global, embora os relatos tenham um tempo curto de seguimento [57].

O tecido cortical ovariano pode ser colhido por laparoscopia ou laparotomia realizando-se várias biópsias ovarianas, ou podendo realizar-se a ooforectomia total ou parcial, uni ou bilateral, seguido de criopreservação do tecido ^[34]. Os protocolos mais difundidamente utilizados para congelamento de tecido ovariano envolvem as técnicas de congelamento progressivo lento (em rampa) ^[56] e direto/rápido - vitrificação em nitrogênio líquido ^[15, 91].

Muitos centros de assistência médica em medicina reprodutiva no mundo vêm ofertando o congelamento de tecido ovariano para pacientes com demanda de preservação da fertilidade. Entretanto, poucos são os que realmente comprovam a qualidade da técnica empregada. Além disso, a depender da doença, da idade da paciente, do tempo em que esta amostra deverá permanecer congelada é bastante variável, havendo assim a necessidade de se avaliar se há dano progressivo dependente do tempo de preservação.

2. Justificativa

O aumento da sobrevida após tratamentos oncológicos trouxe consigo complicações tardias destas terapias, dentre elas a falência ovariana precoce, restringindo o futuro reprodutivo destas pacientes. A criopreservação de tecido cortical ovariano é um dos métodos atualmente propostos para manutenção da fertilidade destas pacientes, com a vantagem de possibilitar a maternidade natural e de manter também a produção de hormônios sexuais, dispensando a necessidade de reposição hormonal medicamentosa. Assim, surge como técnica de grande importância na assistência com vistas à manutenção da qualidade de vida dessas mulheres.

3. Objetivos

3.1. Objetivos principais

3.1.1 Implementar a técnica de congelamento progressivo lento em rampa para criopreservação de tecido cortical ovariano no serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP).

3.1.2 Avaliar se há comprometimento progressivo do tecido criopreservado dependente do tempo em que ficou submetido a baixas temperaturas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Comparar a densidade folicular do tecido fresco com o tecido criopreservado, descongelado após 30 e 180 dias do congelamento, através da contagem do número de folículos por área em lâmina corada por hematoxilina-eosina (HE).

3.2.2 Comparar a viabilidade folicular do tecido fresco com o tecido criopreservado, descongelado após 30 e 180 dias do congelamento, por imunofluorescência, através da técnica Dead-Live.

3.2.3 Avaliar a capacidade esteroidogênica do tecido fresco com o tecido criopreservado, descongelado após 30 e 180 dias do congelamento, através da biossíntese de esteróides (estradiol e progesterona), pela técnica de cultivo primário de tecido ovariano em meio α -MEM, quimicamente definido, sem gonadotrofinas, suplementado com macromoléculas sintéticas e fatores de crescimento.

4. Casuística e Métodos

4.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, onde foram incluídas 17 pacientes férteis, do ambulatório de anticoncepção, com idade entre 20 e 35 anos a serem submetidas à laqueadura tubária eletiva, com fins de planejamento familiar, sem nenhuma patologia prévia descrita no prontuário e que confirmaram bom estado de saúde na entrevista para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo C). Essa fonte de tecido ovariano sadio vem sendo sugerida em alguns outros estudos relacionados ao congelamento de tecido ovariano [92,93, 94, 95, 96].

O estudo foi realizado no setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, especificamente no ambulatório de planejamento familiar (recrutamento de pacientes), no centro-cirúrgico (procedimento de laqueadura tubária e coleta da biópsia ovariana) e no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia (processamento, congelamento e estocagem do tecido ovariano). Além disso, a confecção das lâminas para análise histológica com HE e a leitura das mesmas foi realizado no laboratório de oncopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. E a leitura das amostras processadas pela técnica do Dead-Live em microscópio de fluorescência foi realizada no laboratório de hematologia pediátrica do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

4.2.1. Critérios de inclusão

- idade máxima de 35 anos,
- prole constituída,

- reserva ovariana preservada verificada pela presença de ciclos menstruais regulares,
- candidata a laqueadura tubária eletiva,
- concordância em assinar o TCLE.

4.2.2. Critérios de Exclusão

- patologias pélvicas ou cirurgias ovarianas prévias,
- presença de endocrinopatias,
- história de malformações fetal ou má história obstétrica
- gestante

4.3. Métodos

4.3.1. Descrição da técnica de tratamento das amostras

Foram colhidas biópsias de tecido ovariano com aproximadamente 2,0 x 2,0 cm, com tesoura laparoscópica (Figura 1A); as biópsias foram preparadas submersas em meio nutriente M199 (Medium 199 – Sigma sterile filtered with Earle’s salts, L-glutamine and NaHCO₃). Para preparo da amostra foram eliminados os restos de tecido medular, corpos lúteos e eventuais cistos hemorrágicos, por meio de raspagem com lâmina de bisturi^[97] (Figura 1B), de maneira que o tecido manteve espessura de, no máximo, 2,0 mm, preservando somente o córtex ovariano para adequada penetração do crioprotetor DMSO (Dimetil-Sulfóxido 1,5M Sigma). O tecido foi então dividido em 3 fragmentos: (1) para análise da amostra a fresco (controle), de 0,4 cm x 2,0 cm; (2) para congelamento em rampa e descongelamento após 30

dias, de 0,8 cm x 2,0 cm; (3) para congelamento em rampa e descongelamento após 180 dias, de 0,8 cm x 2,0 cm.

As biópsias colhidas foram processadas da seguinte forma:

A amostra para avaliação a fresco foi dividida em 2 fragmentos iguais, de 0,4 cm x 1,0 cm, sendo um para avaliação por hematoxilina-eosina (HE) e outro pela técnica Dead-Live. Nos sete últimos casos, dividiu-se a amostra em 3, e o terceiro fragmento foi submetido a cultivo para testar a capacidade funcional do tecido para esteroidogênese. As duas amostras congeladas foram posteriormente descongeladas após 30 ou 180 dias após o congelamento. A análise dos fragmentos descongelados recebeu o mesmo tratamento do fragmento fresco da mesma paciente.

O tecido foi transportado em solução nutriente M199 para o processamento das técnicas no laboratório (Figura 1C). O primeiro fragmento fresco foi fixado em solução de formol aldeído a 4% (MERCK) e embebido em parafina, para posterior confecção de lâminas; o segundo fragmento foi submetido à digestão em solução enzimática contendo PBS (PBS DULBECCOS W/O Ca, Mg (1X) INVITROGEN GIBCO) e Colagenase (Collagenasa Crude Type IA Cell Culture*^T, Sigma) para análise da viabilidade folicular pela técnica Dead-Live (Dead-Live Viability/Cytotoxicity Molecular Probes); e, nas pacientes 11 a 17, o terceiro fragmento fresco foi subdividido em 4 frações de 2 x 2 mm e colocados em cultivo. Estas frações tiveram seu tamanho padronizado a fim de evitar o viés do tamanho do tecido interferindo na concentração de hormônios no meio de cultivo.

Em seguida, os fragmentos reservados para o congelamento progressivo lento em rampa foi iniciado, utilizando programa específico, até 120°C negativos, seguido de imersão para armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

4.3.2. Criopreservação das amostras

Tabela 1. Soluções empregadas:

	Solução 1	Solução 2	Solução 3
Albumina humana 20%	25%	/	/
M199	75%	/	/
DMSO	/	5%	10%
Solução 1	/	95%	90%

Obs.: As soluções preparadas podem ser conservadas por, no máximo, 24h se mantidas a 4°C.

- Processamento das amostras pré-congelamento:

Antes de iniciar o preparo, foram retirados 4 ml do meio de transporte para realização de cultura (2 ml em meio de cultivo para bactérias e 2 ml para fungos); os frascos foram provenientes do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP/USP.

O preparo dos fragmentos foi realizado em placas de Petri de 100 mm, seguida de sua introdução em tubos de FALCON de 50 ml juntamente com 10 ml da solução 1 (sem crioprotetor); foram acrescentados mais 10 ml da solução 2 e incubou-se por 5 minutos à temperatura de 4°C; foram retirados os 20 ml de solução e acrescentados novos 20 ml da solução 2 no tubo de 50 ml, seguindo-se incubação por 15 minutos à temperatura de 4°C; a solução foi novamente retirada do tubo e foram colocados 25 ml da solução 3; incubou-se por mais 15 minutos à temperatura de 4°C; foram retirados 4 ml da solução para o meio de cultura (como feito anteriormente com o meio de transporte). Após este período as amostras estavam prontas para serem congeladas. Cada fragmento foi colocado em um criotubo com 1 ml de solução crioprotetora (solução 3). Os criotubos foram submetidos ao congelamento progressivo lento em rampa.

- Programa de Congelamento Progressivo Lento (em Rampa) realizado em equipamento Freeze Control – Cryobath – CL-8800 – Cryologic:

Programa – Modo de espera (início do funcionamento da máquina sem o tecido):

1. Congelamento na velocidade de $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de $10,0^{\circ}\text{C}$;
2. Congelamento na velocidade de $-4,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de $4,0^{\circ}\text{C}$;
3. Espera por 60 minutos (introdução das amostras no aparelho);

Programa de Congelamento ^[56]:

1. Congelamento na velocidade de $-2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de $-8,0^{\circ}\text{C}$;
2. Manutenção da temperatura ($-8,0^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos para realização de *seeding* manual com pinça cirúrgica pré-resfriada por imersão em Nitrogênio líquido;
3. Congelamento na velocidade de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de $-40,0^{\circ}\text{C}$;
4. Congelamento na velocidade de $-30,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de $-150,0^{\circ}\text{C}$;
5. Armazenamento em Nitrogênio líquido (-196°C).

Após 30 e 180 dias do congelamento, foram realizados o descongelamento rápido dos fragmentos 2 e 3.

- Descongelamento Rápido ^[56]

Os criotubos permaneceram em temperatura ambiente, entre $21,0^{\circ}\text{C}$ e $23,0^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos; em seguida, foram colocados em banho de imersão à temperatura de 37°C , por mais 2 minutos; uma vez descongelado, o fragmento foi retirado do criotubo e, à temperatura de 4°C , foi colocado em um tubo FALCON de 15 ml com 5 ml de solução tampão HEPES-MEM (HEPES-MEM GIBCO, INVITROGEN) para extração do crioprotetor, sendo necessários três banhos de 5 minutos. Após o descongelamento do tecido e extração do crioprotetor, o tecido

foi embebido em meio nutriente M199 até o processamento para análise de viabilidade celular, cultivo de tecido para dosagem de esteróides e contagem de folículos. Os fragmentos descongelados sofreram o mesmo processo do tecido fresco, sendo submetidos ao processamento para análise da densidade folicular, viabilidade folicular e capacidade esteroidogênica.

4.3.3. Metodologias de avaliação da qualidade tecidual

- Cultivo primário de tecido ovariano:

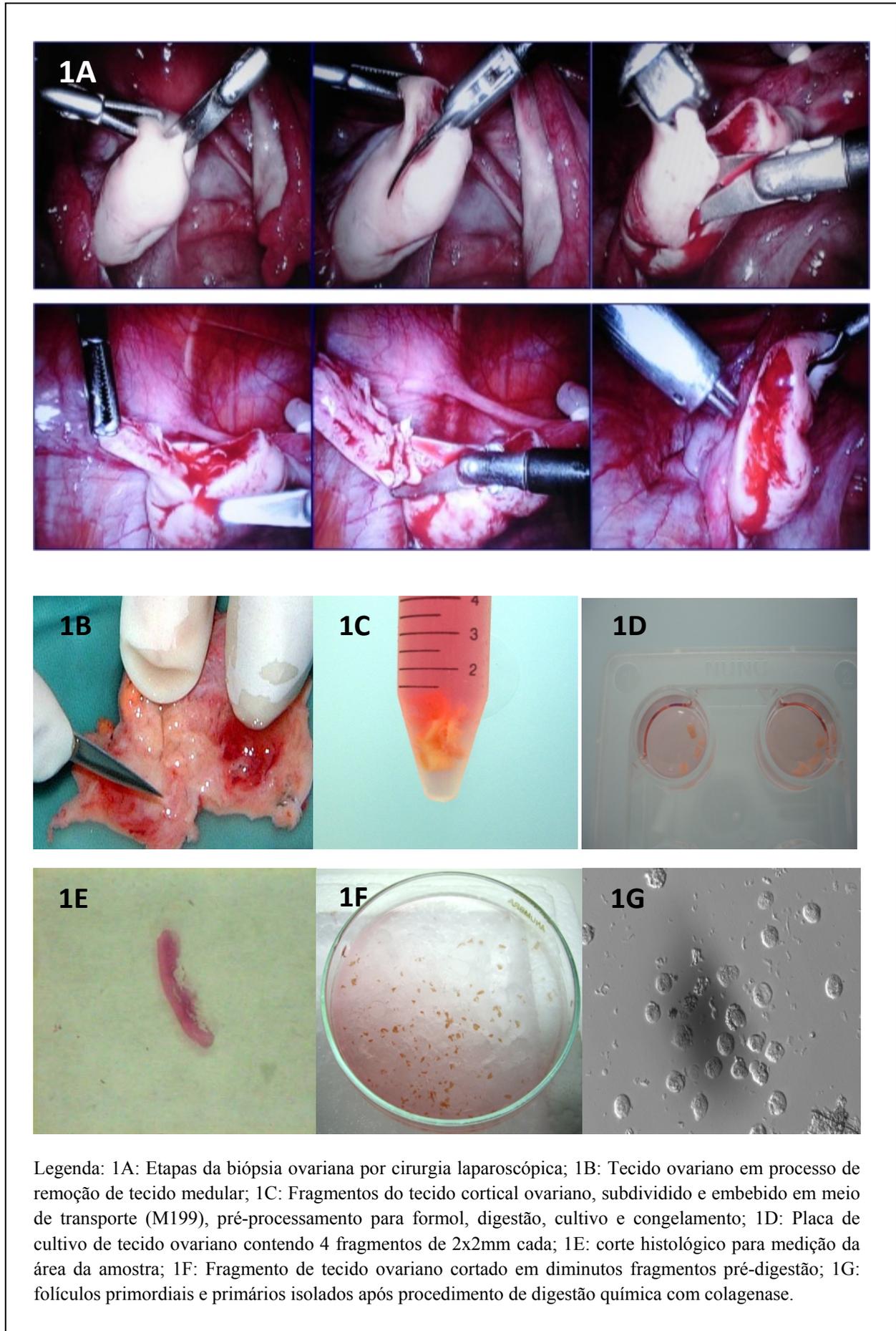
Para o cultivo de tecido ovariano foi utilizado o meio α -MEM (Minimum Essential Medium- Invitrogen), suplementado com 0,1% polivinilpirrolidona (PVP-40) (Sigma); 100 ng/ml de insulina bovina (Sigma); 10 ng/ml de IGF-1 recombinante humano (Invitrogen); 10^{-7} M de androstenediona (Sigma); 11 mM de aminoácidos não-essenciais (Gibco); 5 μ g/ml de transferrina humana (Sigma); 1,4 ng/ml de selênio de sódio (Acros Organics); 10 mM de bicarbonato de sódio (Gibco); 0,02M de hepes (Sigma) e antibióticos (10000 UI de penicilina e 10000 UI de estreptomicina) (Sigma). Foram cultivados 4 fragmentos de 2 x 2 mm/1 ml de meio de cultura em placa NUNC de 4 poços e incubados em atmosfera úmida de 5% de CO₂ e 37°C, por 144 horas (Figura 1D). Os meios de cultura foram obtidos a cada troca de 48 horas, sendo retirados antes (tempo 0 hora), após 48, 96 e 144 horas de cultivo e estocados em freezer a -20°C para as dosagens de progesterona (P4) e 17 β -estradiol (E2), as amostras de meio foram submetidas à dosagem hormonal pelo método de quimioluminescência, que combina anticorpos específicos com enzima amplificada, em um aparelho Immulite – Diagnostic Products Corporation (DPC) sistema randômico automatizado.

Os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 10% e, para cada esteróide, todas as amostras foram analisadas no mesmo ensaio para evitar variabilidade inter-ensaio.

- Densidade folicular:

Após fixação em formol 4% e inclusão em parafina foram realizados cortes seriados com espessura de 4 μm , e a cada 3 cortes, o material foi corado com HE e analisado ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes para a contagem do número de folículos. Foram analisados 9 cortes por paciente, sendo 3 cortes do tecido fresco, 3 cortes do descongelado de 30 dias e 3 cortes do descongelado de 180 dias. Para cálculo da área foi utilizado o sistema para morfometria do fragmento que é constituído de uma câmara analógico-digital modelo JVC TK1270, utilizando uma lente grande angular de 55 mm acoplada e este conjunto, preso a um suporte vertical permitindo assim seu posicionamento em relação ao objeto captado. As imagens obtidas são então captadas através de uma placa de captura de vídeo FG1 da Keiss Zeiss acoplada a um computador padrão IBM-PC. Desta forma a primeira fase do processo é a captação das imagens dos cortes de fragmento, onde se cuida da iluminação e foco do objeto para melhor visualização de suas estruturas (Figura 1E). Em seguida o sistema automaticamente destaca as estruturas da imagem através de ferramentas de brilho e contraste.

A Segunda fase é propriamente a morfometria das estruturas desejadas. Para isso desenvolveu-se uma macro sobre o software de processamento de imagem KS400; Karl Zeiss Versão 2.0. A macro permite ao usuário escolher a imagem previamente captada e em seguida gerar a sua calibração, que é a relação pixel (unidade de imagem) x milímetro, que permite obter os valores de medidas de estruturas já em milímetros^[98]. O número total de folículos por 1 mm^3 foi calculado usando-se a seguinte fórmula: $Nt=(No \times St \times t)$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm^2 , St é o total de cortes em 1 mm^3 do ovário e t é a espessura do corte^[99].



- Viabilidade celular:

A viabilidade celular foi estimada pela técnica Dead-Live, que permite diferenciar células vivas e mortas, marcadas, respectivamente, pela calceína e pelo homodímero de etídio, visualizadas ao microscópio de fluorescência. De acordo com os princípios da técnica, a calceína, utilizando o cálcio como co-fator, é metabolizada por células com viabilidade preservada, produzindo a emissão de fluorescência verde. O homodímero de etídio, por sua vez, somente consegue penetrar em células cuja membrana plasmática tenha perdido sua integridade, ou seja, em células inviáveis, corando-as de vermelho. Assim, utilizando-se um microscópio de fluorescência, esta técnica permite reconhecer células vivas e células mortas ou em processo de degeneração, de acordo com a cor da fluorescência emitida ^[94, 97, 100, 101].

A avaliação de viabilidade folicular ^[102], baseia-se na viabilidade do oócito e das células da granulosa. Assim, uma classificação da viabilidade proposta por estes autores considera quatro categorias de viabilidade na dependência da porcentagem de células da granulosa consideradas vivas:

- ⇒ V1: oócito e todas as células da granulosa (CG) vivas;
- ⇒ V2: dano folicular mínimo, ou seja, oócito vivo e menos de 10% de CG mortas;
- ⇒ V3: dano folicular moderado, o que equivale a 10-50% de CG mortas porém com oócito vivo;
- ⇒ V4, folículo morto ou inviável, ou seja, mais de 50% de CG mortas e/ou oócito morto.

Foram consideradas na análise final da viabilidade folicular: viáveis os V1 e V2 e inviáveis os V3 e V4.

Para a aplicação da técnica Dead-Live é necessário a desagregação total ou parcial do tecido, de maneira que seja possível identificar os folículos isoladamente. Com esta finalidade os fragmentos foram submetidos á digestão por método enzimático, com Colagenase [97, 101, 102]. Para digestão o tecido foi cortado em diminutos fragmentos até adquirir uma característica de granulado fino (Figura 1F); este tecido granulado foi então colocado em meio contendo Colagenase na concentração de 1mg/ml, diluída em PBS com cálcio e levado a banho de imersão a 37°C, por tempo entre quarenta e cinco e sessenta minutos, sendo submetida a agitação mecânica com pipeta a cada 15 minutos para desagregar eventuais formações de grumos mais densos. Após a digestão a enzima foi inativada com albumina humana a 10% (SH10%) diluído em PBS sem cálcio (PBS DULBECCOS (1X) sem Ca e Mg GIBCO, INVITROGEN), na proporção de 1:1 em relação à solução de colagenase.

A solução de digestão já inativada foi centrifugada por 10 minutos a 500 rpm e retirado o sobrenadante; o precipitado foi ressuspense na mesma solução de SH10% utilizada para inativar a enzima, completando o volume para 2 ml; a ressuspensão foi vertida em uma placa de cultivo de 60 mm, os fragmentos de tecido digeridos foram verificados quanto à ausência ou presença de folículos e os folículos isolados foram identificados e selecionados sob estereomicroscópio (Figura 1G) para imersão em gota de 50 µL de solução de calceína AM e homodímero de etídio do kit Dead-Live; as gotas contendo fragmentos e folículos isolados foram incubados a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida; a viabilidade dos folículos foi avaliada em microscópio de fluorescência e classificados conforme proposto acima, tomando por base o número de folículos visualizados antes da coloração com o kit de viabilidade.

4.4. Análise estatística

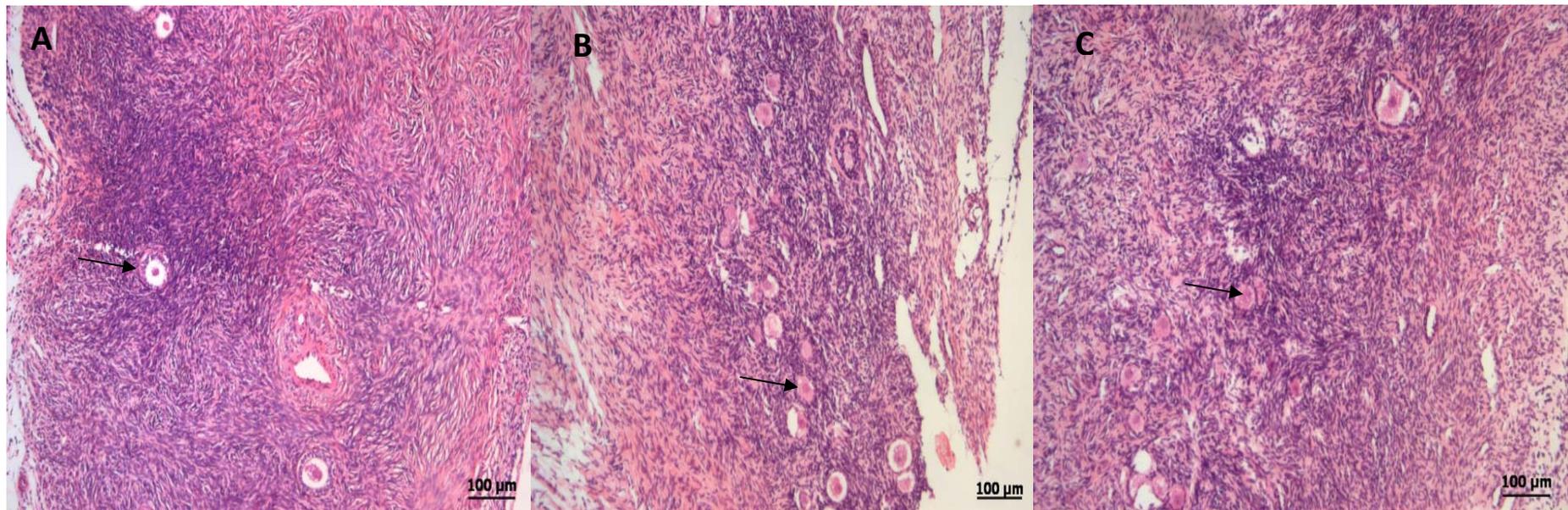
A análise das variáveis foi realizada utilizando-se o programa GraphPad 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente foi calculado o valor da média e desvio padrão para todas as variáveis, seguido do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O teste aplicado para análise da densidade folicular, viabilidade folicular, produção de estradiol e progesterona no meio de cultivo nos diferentes momentos (48, 96 e 144h; para identificação de pico de produção destes hormônios) e entre os grupos, foi o Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's Multiple Comparison Test para identificação da diferença entre eles.

5. Resultados

Foram incluídas na casuística 17 pacientes hígdas, com idade média de $29,0 \pm 2,78$; onde uma paciente apresentou paridade de 2 filhos e todas as outras com paridade superior a 3 filhos.

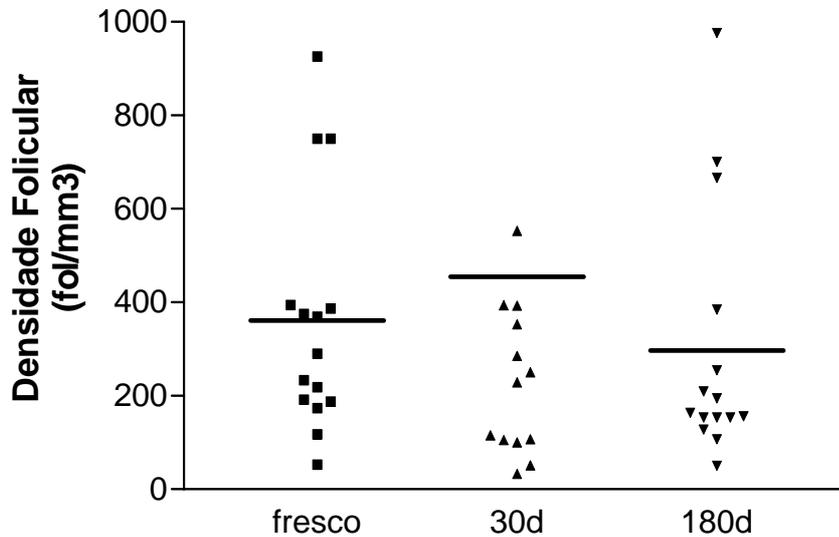
A densidade folicular foi avaliada em cortes de tecido corados com HE, onde pode-se observar a heterogeneidade da distribuição folicular ao longo do parênquima (Figura 2); a densidade média foi de $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ e $296,8 \pm 269,0$ folículos/ mm^3 , para os tecidos: fresco e congelado/descongelados com 30 e 180 dias, respectivamente, não havendo diferença entre eles ($p=0,46$) (Figura 3). Os valores individuais da densidade estão na tabela 2 (anexo A).

Figura 2. Cortes histológicos de tecido ovariano fresco (A) e congelado/descongelados de 30 dias (B) e 180 dias (C), da mesma paciente, corados com HE para avaliação da densidade folicular:



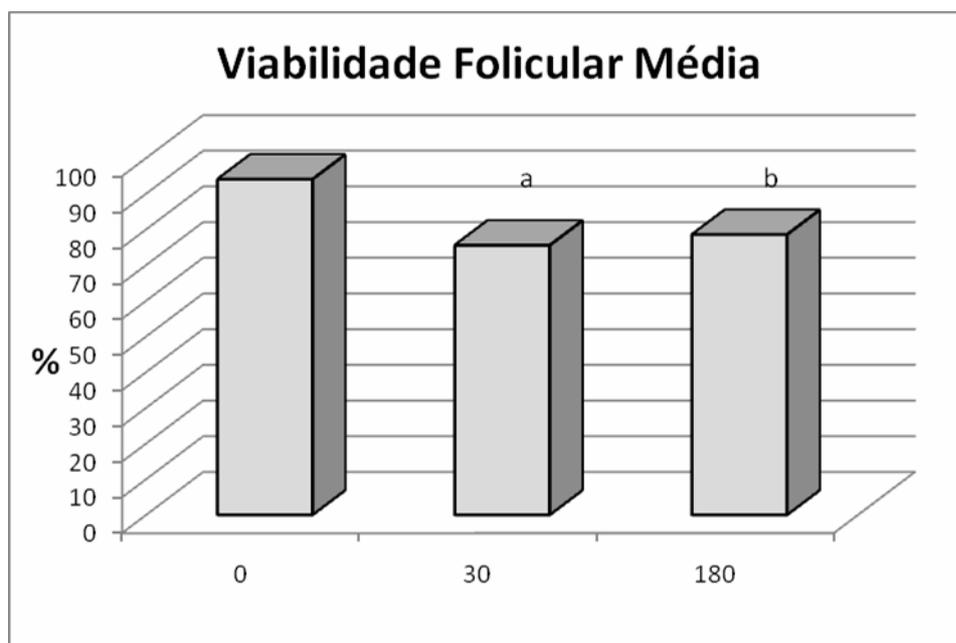
Obs: As setas apontam exemplos de foliculos em cada corte.

Figura 3. Densidade folicular (folículos/mm³) do tecido ovariano fresco e congelado-descongelados, após 30 e 180 dias.



A viabilidade folicular foi maior no tecido fresco com 93,4% de folículos viáveis quando comparado com os tecidos criopreservados de 30 dias 70,8%; $p < 0,001$ e 180 dias 78,4%; $p < 0,001$, embora não tenha havido diferença na viabilidade entre as amostras descongeladas ($p > 0,05$) (figura 4). Os valores da viabilidade por paciente estão na tabela 3 (anexo A).

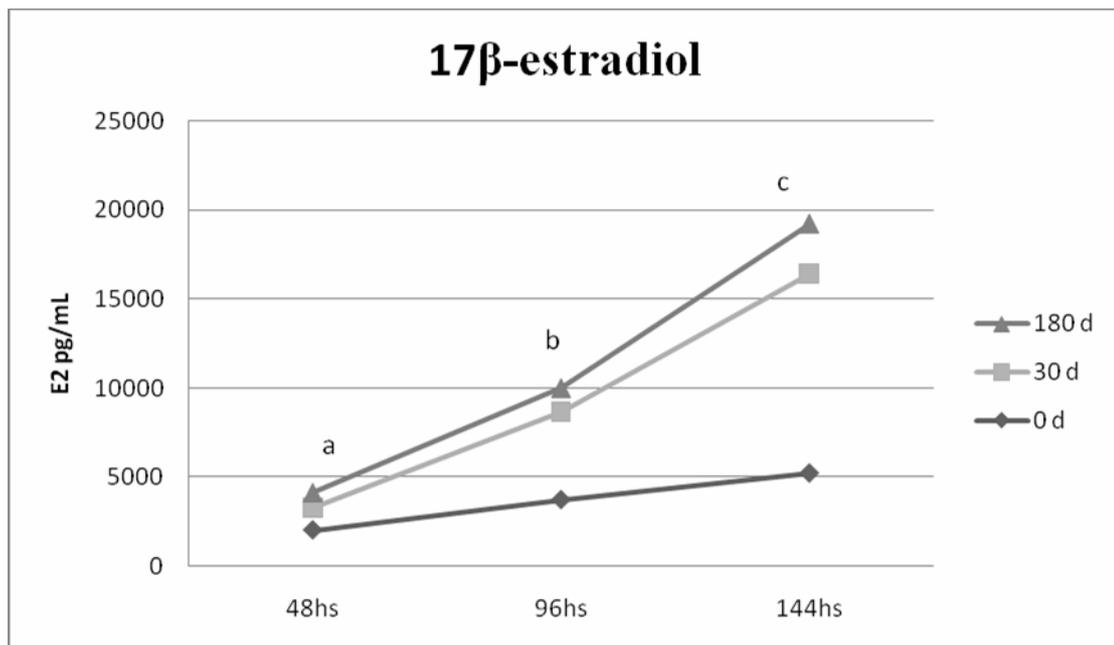
Figura 4. Comparação da viabilidade folicular média entre os tempos 0, 30 e 180 dias.



Legenda: a = $p < 0,001$ e b = $p < 0,001$.

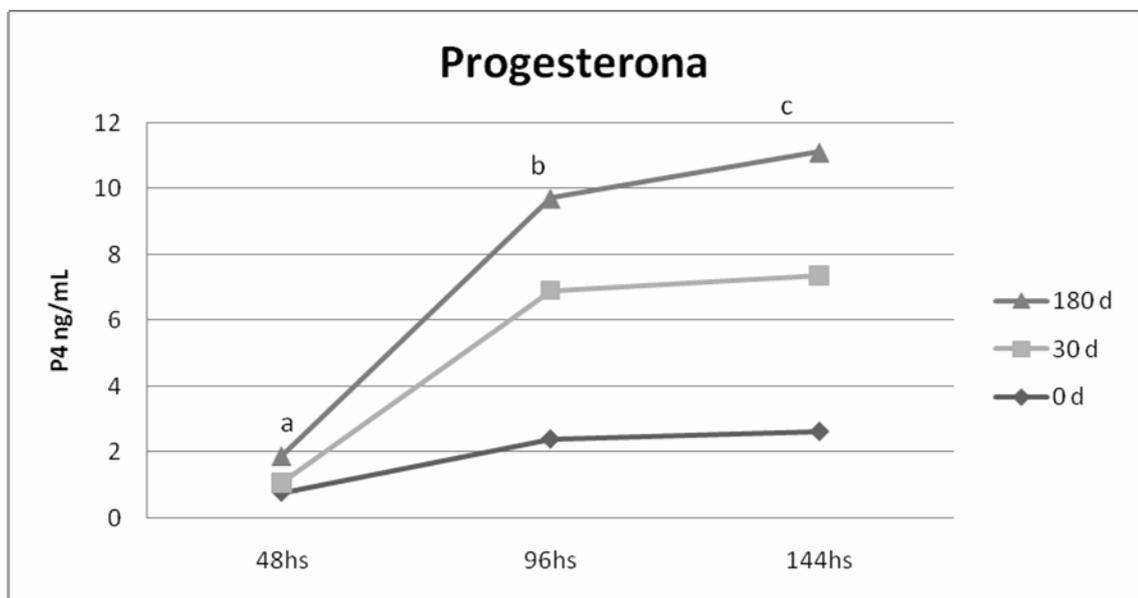
Com relação à capacidade de esteroidogênese do tecido as dosagens no tempo 0 hora apresentaram valor igual a zero, confirmando então a ausência de contaminação hormonal na manipulação do meio; não houve redução na produção de E2 e P4 após a criopreservação: E2: tecido fresco = 2026 ± 1782 pg/ml, 30 dias = 1272 ± 1081 pg/ml e 180 dias = $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; P4: tecido fresco = $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, 30 dias = $0,26 \pm 0,08$ ng/ml e 180 dias = $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$ (figuras 5 e 6). Os valores individuais das dosagens por paciente e por tempo de cultivo estão demonstrados na tabela 4 (anexo B).

Figura 5. Comparação da concentração de estradiol nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.



Legenda: a = comparação das dosagens de E2 após 48 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,19$; b = comparação das dosagens de E2 após 96 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,22$; c = comparação das dosagens de E2 após 144 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,79$.

Figura 6. Comparação da concentração de progesterona nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.



Legenda: a = comparação das dosagens de P4 após 48 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,87$; b = comparação das dosagens de P4 após 96 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,51$; c = comparação das dosagens de P4 após 144 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,58$.

6. Discussão

Na tentativa de verificar a qualidade do tecido ovariana congelado/descongelado após a criopreservação, neste estudo foram avaliados diferentes aspectos do tecido recuperado, sendo consideradas a densidade e a viabilidade folicular e a capacidade esteroidogênica do tecido.

A densidade folicular avalia o número de folículos presente no tecido por área e pode variar de acordo com a idade da paciente, esta técnica vem sendo proposta por diversos autores como critério de controle para avaliação do tecido após descongelamento [33, 94, 100, 103, 104, 105, 106, 107]. De acordo com Poirot *et al.* [33], em pacientes entre 20 e 30 anos de idade espera-se uma média de 30 a 400 folículos/mm³ de tecido ovariano, devemos lembrar, entretanto, que a distribuição dos folículos ao longo do córtex ovariano não costuma ser homogênea. Neste estudo encontramos uma média de densidade folicular compatível com a literatura, variando de 300 a 460 folículos/mm³ além de confirmar a heterogeneidade na distribuição da população folicular. A finalidade da avaliação de densidade foi garantir que os diferentes fragmentos conteriam número significativo de folículos que permitiriam avaliar aspectos funcionais e de viabilidade, já que os cortes de tecido fresco e congelados-descongelados, corados com HE e utilizados na avaliação foram obtidos de fragmentos acolados.

Também foi verificada a manutenção da densidade folicular após o congelamento e descongelamento do tecido, o que já era esperado, visto que a perda de folículos em consequência ao procedimento não promoveria alteração morfológica significativa. Para se avaliar a real integridade estrutural da unidade folicular seria necessária a realização de marcadores de apoptose celular, ou estudo de ultra-estrutura por microscopia eletrônica, os quais não foram realizados neste estudo.

Embora esta avaliação estrutural fina não tenha sido o escopo deste estudo, fez parte das avaliações do tecido a verificação da viabilidade folicular medida por técnica que

indiretamente avalia alguma capacidade funcional do folículo. A técnica do Dead-Live explora uma capacidade celular de metabolização da calceína utilizando o cálcio como cofator, o metabólito produzido emite fluorescência a qual é identificada por microscopia, sendo assim, existe a necessidade de que o metabolismo celular esteja viável e funcional.

Estudos anteriores com criopreservação de tecido ovariano obtiveram entre 40 e 60% de recuperação e viabilidade folicular após congelamento/descongelamento em relação ao tecido a fresco ^[87, 100, 107, 108], neste estudo foi observado que a técnica de congelamento lento em rampa aplicada em biópsia ovariana humana preserva uma alta viabilidade de oócitos imaturos (70,8% a 78,4%). Logicamente que havendo o cuidado na manipulação do tecido recém extraído, esperou-se que a amostra a fresco demonstrasse uma viabilidade próxima de 100%, a qual foi confirmada (GF = 93% de viabilidade folicular).

Também foi verificado que a viabilidade é preservada ao longo do tempo de congelamento. A manutenção da porcentagem de viabilidade independente do tempo de congelamento (30 ou 180 dias) sugere que o dano tecidual provavelmente ocorra pela manipulação cirúrgica e processamento do tecido, os quais podem acarretar isquemia, e não pelo congelamento em si. Não encontramos na literatura dados que contestem ou reafirmem estes achados, sendo assim este é o primeiro relato de avaliação da influência do tempo de congelamento sobre o dano tecidual nas técnicas de criopreservação de tecidos. Por estes achados podemos inferir que uma vez conservada a amostra o tempo de armazenamento não deverá prejudicar a qualidade do tecido. Se levarmos em consideração que as situações clínicas em que técnica será aplicada geralmente demandarão longos períodos de conservação esta informação é extremamente valiosa para a condução destes casos. Vários autores têm relatado o reimplante ou reutilização de amostras preservadas após períodos variados de tempo com resultados promissores ^[9, 25, 76-88]. Ernst *et al.* ^[88] relata que em todo o mundo há oito nascimentos de filhos como resultados do transplante de tecido ovariano

congelado/descongelado. Uma dessas mulheres, que foi originalmente transplantada com seis fragmentos de córtex ovariano, depois de ter experimentado um período de menopausa, já concebeu pela segunda vez por concepção natural, dando à luz uma menina saudável; esta é a primeira mulher no mundo a ter dois filhos, de gestações separadas, nascidos como resultado do transplante de tecido ovariano congelado/descongelado. Este resultado incentiva o desenvolvimento da criopreservação de tecido ovariano para a preservação da fertilidade como um procedimento clínico para meninas e jovens mulheres que enfrentam os tratamentos gonadotóxicos.

Da mesma forma que a integridade estrutural não traduz a viabilidade do tecido, esta última não garante a funcionalidade do mesmo. Com esta finalidade foi realizada a avaliação da capacidade esteroidogênica do tecido, a qual permite inferir a qualidade funcional do mesmo em termos de produção hormonal. O cultivo de tecido ovariano vem sendo descrito por alguns autores como forma de avaliar a capacidade funcional, ou para se obter folículos em estádios mais avançados de desenvolvimento com fins reprodutivo [74, 109, 110]. Sadeu *et al.*^[111] descreveram a manutenção da viabilidade do tecido ovariano fetal humano em cultivo por um período de até 63 dias, inclusive com maturação parcial dos mesmos. Sendo assim, foi optado por este modelo de avaliação funcional dado a comprovação da capacidade de sobrevivência do tecido no meio de cultivo. Vale ressaltar que uma das premissas da criopreservação de tecido ovariano, e não de gametas isolados, é a possibilidade de se manter a capacidade de esteroidogênese e não somente a capacidade reprodutiva.

Neste estudo foi verificado, a partir das dosagens de estradiol e progesterona no meio de cultivo, que a capacidade de esteroidogênese do tecido está preservada. Além disso, o tecido cultivado continuou produzindo quantidades hormonais equivalentes ao longo de todo o tempo de cultivo, mantendo a mesma curva de produção hormonal, indicando a boa conservação do tecido durante o cultivo. É importante frisar que o tamanho das amostras

colocadas em cultivo foi padronizado justamente para evitar que o volume de tecido pudesse influenciar nas concentrações hormonais do meio, gerando um viés metodológico.

Além disso, a produção de hormônios a partir do tecido fresco não apresentou diferença estatística quando comparada com os cultivos de tecido congelado/descongelado, ou seja, houve a preservação da capacidade de produção hormonal após a criopreservação independente do tempo de congelamento. Este dado reforça a não progressão do dano tecidual pela manutenção em baixas temperaturas e corrobora os achados da viabilidade folicular de que provavelmente a agressão ao tecido ocorre pela manipulação e processamento da amostra mais do que pelo congelamento em si.

Finalmente devemos considerar que a função esteroidogênica preservada não afirma que há função reprodutiva mantida, uma vez que o ovário perde primeiramente a capacidade reprodutiva para depois perder a capacidade esteroidogênica. Podemos citar como exemplo a própria fisiologia ovariana da mulher, em que a fecundidade decai bruscamente após os 40 anos (taxas de gestação após 40 anos < 5%), e a menopausa ocorrerá em média entre os 50 e 55 anos de idade.

7. Considerações finais

Apesar da criopreservação de tecido ovariano ainda ser considerada como técnica experimental, muitos centros de Reprodução Assistida vem praticando este procedimento de forma corriqueira em atividades assistenciais [87, 88], embora não haja um consenso com relação ao tema [112] e nem respaldo formal das Sociedades competentes para sua aplicação em larga escala [1]. Entretanto, se o risco de falência ovariana relacionada ao tratamento oncológico for elevado consideramos que a paciente deve ter autonomia para definir se deseja ou não submeter-se ao procedimento de preservação de fertilidade, logicamente após adequada informação de riscos, benefícios e real efetividade da técnica.

Muitos são os questionamentos relativos a esta nova proposta: quais são as melhores candidatas ao procedimento, qual o melhor método para a retirada do tecido, qual a melhor forma de congelamento/descongelamento, se o(s) ovário(s) deve ser criopreservado(s) inteiro(s) ou em fragmentos, qual o melhor local para o reimplante e se deve ser realizada anastomose vascular ou não. Assim sendo, mais estudos científicos clínicos e experimentais ainda devem ser realizados com finalidade de elucidação de todas estas dúvidas.

Apesar de tudo isso, consideramos que a técnica é adequada no que diz respeito à conservação do tecido e manutenção de sua viabilidade e capacidade funcional, embora os aspectos reprodutivos propriamente ditos não tenham sido explorados. Entretanto, isso se justifica facilmente pelas enormes implicações éticas que este tipo de avaliação demandaria, visto que somente a fecundação, implantação e nascimento de bebês saudáveis confirmariam com certeza a preservação desta função.

Portanto, conclui-se que o tempo de criopreservação não interfere na estrutura, na viabilidade e na capacidade esteroideogênica do tecido ovariano. Esses achados permitem implantar com segurança e fidedignidade uma técnica já padronizada para o congelamento de tecido ovariano humano. Ressaltando que a maior limitação atual referente à criopreservação ovariana está na utilização desse tecido após o descongelamento, sendo os resultados encontrados na literatura mundial ainda limitados a relatos de casos ou estudos com pequena casuística.

8. Referências Bibliográficas

1. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2009. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2009. http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2009_Presentation.asp. Accessed in 2009 (Jun 5).
2. Ries L, Percy C, Bunin G: Introduction. In Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995 (NIH Pub No 99-4649). Gurney J, Linet M, Tamra T Young J, Bunin G, (eds), Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999 pp1–15.
3. Chian RC, Gilbert L, Huang JY, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL: Live birth after vitrification of *in vitro* matured human oocytes. *Fertil Steril* 2009; 91(2):372-6.
4. Apperley JF, Reddy N: Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev* 1995;9:93–116.
5. Sanders J, Hawley J, Levy W: Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulphan or total body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87:3045–52.
6. Oehninger S: Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12:222–31.
7. Su HI, Lin K, Bracia CR: Early menopause in cancer survivors: fertility options. *Menopausal Med* 2008; S1–8.
8. Shüffner AG, Piazza MJ, Costa SL, Centa LJR: Criopreservação de Tecido Ovariano. *Revisão Histórica. Femina* 2003; 31(1):63-66.
9. Donnez J, Dollmans M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J: Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364,1405–1410.
10. Kwon JS, Case AM: Preserving reproductive function in women with cancer. *Sexuality, Reproduction & Menopause* 2004; 2(2):222-29.
11. Maltaris T, Koelbl H, Seufert R, Kiesewetter F, Beckmann MW, Mueller A, Dittrich R: Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. *Asian J Androl* 2006; 8:515–33.
12. Revel A, Revel-Vilk S: Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Mol Cell Endocrinol* 2008; 282:143–9.

13. Hawkins MM: Pregnancy outcome and offspring after childhood cancer. *BMJ* 1994; 309:1034.
14. Howell SJ, Shalet S: Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin* 1998; 27:927–43.
15. Tao T, Del Valle A: Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25:287–296.
16. Lamar CA, DeCherney AH: Fertility preservation: state of the science and future research directions. *Fertility and Sterility* 2009;91(2):316-9.
17. Sonmezer M, Oktay K: Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004; 10:251–66.
18. Nowak R: Egg freezing. A reproductive revolution. *New Scientist* 2007. p. 8–9.
19. Dondorp WJ, De Wert GM: Fertility preservation for healthy women: ethical aspects. *Human Reproduction* 2009; 24(8):1779-85.
20. Marhhom E, Cohen I: Fertility preservation options for women with malignancies. *Obstetrical and Gynecological Survey* 2006; 62:1.58-72.
21. Silva, A. C. J.S. R: Preservação de fertilidade. *Revista Brasileira de Ginecol e Obs* 2006; 28:6.
22. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z: Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and Letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005; 23:4347-53.
23. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K; American Society of Clinical Oncology: American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2917-31.
24. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Gosden RG: Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1997; 67:481–6.
25. Oktay K, Karlikaya G: Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 342:1919.

26. Oktay K, Newton H, Aubard Y, Gosden RG: Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998; 69:1–7.
27. Mazur P: Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347-69.
28. Oda K, Gibbons WE, Leibo SP: Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J Reprod Fertil* 1992; 95:737–47.
29. Hotamisligil S, Toner M, Powers RD: Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol Reprod* 1996; 55:161–8.
30. Oktay K, Gosden RG: Cryopreservation of human oocyte and ovarian tissue. In *A Textbook of in vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, Brinsden PR (eds), Parthenon Publishing, London, UK, 1999.
31. Vincent C, Johnson MH: Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf Rev Reprod Biol* 1992; 14: 73–100.
32. Pegg DE, Diaper MP: On the mechanism of injury to slowly frozen erythrocytes. *Biophys J* 1988; 54:471-88.
33. Poirot CJ, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugières L, Jouannet P: Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod* 2002; 17: 1447-52.
34. Varghese AC, du Plessis SS, Falcone T, Agarwal A: Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and *in vitro* maturation of follicles and oocytes: challenges for fertility preservation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 2;6:47.
35. Fuller B, Paynter S: Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004; 9:680–91.
36. Hovatta O: Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 2005; 10:729–34.
37. Isachenko V, Isachenko E, Kreienberg R, Woriedh M, Weiss J. Human ovarian tissue cryopreservation: quality of follicles as a criteria of effectiveness. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20(4):441-442.

38. Gosden RG, Mullan J, Picton HM, Yin H, Tan SL: Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 2008; 8,105–110.
39. Ksiazkiewicz LK: Recent achievements *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reprod Biol* 2006; 6,3–16.
40. Wang LH, Mullen SF, Li Y, Zhong JQ, Crister JK, Chen ZJ: Morphological and Apoptotic Comparison of Primordial and Primary Follicles in Cryopreserved Human Ovarian Tissue. *Reprod Domest Anim*. 2008 Oct 1. [Epub ahead of print]
41. Dermici B, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF, Lornage J: Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing-thawing of ovarian cortex in sheep. *Fertil Steril* 2002; 77(3):595-600.
42. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ: A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68:1682–6.
43. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM: Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 1996; 11:1268–72.
44. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG: Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 1997; 110:11–9.
45. Kartha KK. Meristem culture and germplasm preservation. In *Cryopreservation of plant cells and organs*, Kartha KK (eds), Boca Raton, FL, CRC Press, 1985. p. 115-134.
46. Stushnof C, Seufferheld M: Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In *Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm*. Bajaj, YPS (eds), Berlin: Springer-Verlag. 1995. p.87-101.
47. Santos RR: Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation. 2007. 144f. Thesis (Doctorat) - Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2007.
48. Kim SS, Battaglia DE, Soules MR: The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond. *Fertil Steril* 2001; 75(6):1049.

49. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R: Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11:487-91.
50. Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness, Ornoy A: Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001; 7(4): 394-403.
51. Hovatta O: Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17(2):331-42.
52. Paynter SJ: Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Updated* 2000; 6:449-456.
53. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR: Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 2004a; 61:1009-1024.
54. Rodrigues APR, Amorim, CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Ohashi OM, Figueiredo JR: Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci* 2004b; 84:211-227.
55. Leibo SP: One-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21,767-790.
56. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R: Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994; 9,597-603.
57. Sánchez M, Alamá P, Gadea B, Soares SR, Simón C, Pellicer A: Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results. *Hum Reprod* 2007; 22,3:786-791.
58. Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 24:387-402.
59. Stachecki JJ, Cohen J: Symposium: cryopreservation and assisted human conception. *Reprod BioMed Online* 2004; 9:152-163.
60. Salehnia M, Abbasian Moghadam E, Rezazadeh Velojerdi M: Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 2002; 78:644-5.

61. Isachenko E, Isachenko V, Rahimi G, Nawroth F: Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 108:186–93.
62. Gook DA, Osborn SM, Archer J, Edgar DH, McBain J: Follicle development following cryopreservation of human ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113S:S60-62.
63. Fulka J Jr, First NL, Moor RM: Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(1):41-9.
64. Russel DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH: The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1255-1270.
65. Aktas H, Leibfried-Rutledge ML, First NL: Meiotic state of bovine oocytes is regulated by interactions between cAMP, cumulus, and granulosa. *Mol Reprod Dev* 2003; 65(3):336-343.
66. Ali A, Coenen K, Bousquet D, Sirard MA: Origin of bovine follicular fluid and its effect during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2004; 62:1596-1606.
67. Pavlok A, Lapathitis G, Cech S, Kubelka M, Lopatarova M, Holy L, Klima J, Motlik J, Havlicek V: Simulation of intrafollicular conditions prevents GVBD in bovine oocytes: a better alternative to affect their developmental capacity after two-step culture. *Mol Reprod* 2005; 71(2):197-208.
68. Sirard MA, Coenen K: The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 1993; 40:933-42.
69. Thompson JG: The impact of nutrition of cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J Reprod Dev* 2006; 52:169-175.
70. Coleman N, Shagiakhmetova G, Lebedeva I, Kuzmina T, Golubev A: *In vitro* maturation and early developmental capacity of bovine oocytes cultured in pure follicular fluid and supplementation with follicular wall. *Theriogenology* 2007; 67(5):1053-59.
71. Huang JYJ, Buckett WM, Gilbert L, Tan LS, Chian RC: Retrieval of immature oocytes followed by *in vitro* maturation and vitrification: A case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecologic Oncology* 2007; 105:542-544.

72. Chian RC, Tan SL: Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reproductive BioMedicine Online* 2002; 5:125–132.
73. Lin YH, Hwang JL: *In vitro* Maturation of Human Oocytes. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2006; 45(2):95-98.
74. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ: A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction* 2008; 23,5:1151–1158.
75. Akar M, Oktay K: Restoration of ovarian endocrine function by ovarian transplantation. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16,8:374-380.
76. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J: Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4489-94.
77. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG, Shalet SM: Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357:1172–1175.
78. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z: Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004a; 363(9412):873-40.
79. Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A: Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer-follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(4):448-53.
80. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J: Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Eng J Med* 2005; 353:318-321.
81. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN, Ottosen C, Andersen CY: Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* 2006; 21(8):2006-9.
82. Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, Delbaere A, Englert Y: Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic

- and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* 2006; 21,8:2010-2014.
83. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y: Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007; 12:1437-1442.
 84. Callejo J, Salvador C, Marqués L, Navarro A, Busquets M, Valls C: Long-term evaluation of three series of implantation (orthotopical and heterotopical) ovarian frozen-thawed autografting. 2008. In press.
 85. Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, Gosden RG: A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008; 23(7):1531-7.
 86. Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escribá MJ, Simón C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril*. 2010; 93(1):268.e11-3.
 87. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
 88. Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS, Andersen CY. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010; 25(5):1280-1.
 89. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M: Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod* 2002;17:605-11.
 90. Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J: Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril* 2000;74:122-9.
 91. Kuwayama M, Ieda S, Zhang J, Kato O: The Cryo Top method: aseptic vitrification of oocytes and embryos. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1):S187.
 92. Lass A, Silye R, Abrams DC, Krausz T, Hovatta O, Margara R, Winston RML. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997; 12(5): 1028-31.

93. Siebzehnruhl E, Kohl J, Dittrich R, Wildt L. Freezing of human ovarian tissue – not the oocytes but the granulosa is the problem. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 109-111.
94. Cortvrindt RG, Smits JE. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human cortical biopsy samples. *Fertil Steril* 2001; 75(3): 588-93.
95. Hreinsson J, Zhang P, Swahn ML, Hultenby K, Hovatta O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Hum Reprod* 2003; 18(11): 2420-28.
96. Kim SS, Kang HG, Kim NH, Lee HC, Lee HH. Assessment of the integrity of human oocytes retrieved from cryopreserved tissue after xenotransplantation. *Hum Reprod* 2005; 20(9): 2502-8.
97. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril* 2005; 83 S1: 1248-54.
98. Lara LA, Useche B, Ferriani RA, Reis RM, de Sá MF, de Freitas MM, Rosa e Silva JC, Rosa e Silva AC. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response. *J Sex Med.* 2009; 6(1):30-9.
99. Gougeon A, Chainy GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):433-42.
100. Maltaris T, Dimmler A, Muller A, Hoffmann I, Beckmann MW, Dittrich R. Comparison of two freezing protocols in an open freezing system for cryopreservation of rat ovarian tissue. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(3): 273-279.
101. Maltaris T, Dragonas C, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, Dittrich R. Simple prediction of the survival of follicles in cryopreserved human ovarian tissue. *J Reprod Dev* 2006a; 52(4): 577-582.
102. Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Langendonck AV, Defrere S, Van Eyck AS, Donnez J. Ficoll density gradient method for recovery of isolated human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril.* 2004; 82:1648-53.
103. Oktay K, Schenken R, Nelson J. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995; 53: 295-301.

104. Demirci B, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 754-762.
105. Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Seracchioli R, Grigioni WF. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gyneol Oncol* 2003; 89: 259-266.
106. Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TAL, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 2006; 85(Suppl 1): 1150-1156.
107. Poirot CJ, Martelli H, Genestie C, Golmard JL, Valteau-Couanet D, Helardot P, Pacquement H, Sauvat F, Tabone MD, Phillippe-Chomette P, Esperou H, Baruchel A, Brugieres L. Feasibility of Ovarian Tissue Cryopreservation for Prepubertal Females With Cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2006, Wiley-Liss, Inc.
108. Oktay K, Sonmezer M. Ovarian tissue banking for cancer patients. Fertility preservation, not only ovarian preservation. *Hum Rep* 2004; 19(3): 477-80.
109. Morimoto Y, Oku Y, Sonoda M, Haruki A, Ito K, Hashimoto S, Fukuda A. High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues in vitro. *Hum Reprod*. 2007 Dec;22(12):3170-7.
110. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, Venturoli S. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1619-29.
111. Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2006 Apr;85 Suppl 1:1130-41.
112. Kim SS. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20(2):171-174.

Anexo A

Tabela 2. Densidade Folicular/mm³

Paciente	0 dia	30 dias	180 dias
3	750	250	153,84
4	187,5	1187,5	700
5	218,75	100	153,84
6	925,92	393,93	666,66
7	387,09	285,71	254,54
8	117,64	533,33	107,14
9	369,56	107,14	194,44
10	234,04	392,85	50
11	173,91	2666,66	976,19
12	52,63	228,57	153,84
13	192,30	50,84	209,67
14	290,32	352,94	127,90
15	394,73	105,26	156,25
16	375	33,33	384,61
17	750	115,38	163,63
Média	361,3 ± 255,4	454,9 ± 676,3	296,8 ± 269,0

Tabela 3. Viabilidade folicular avaliada pela técnica Dead-Live nos tempos 0, 30 e 180 dias após descongelamento

Paciente	N folicular total	0 dia		30 dias		180 dias	
		N	%	N	%	N	%
2	134	45	93	45	82	44	81
4	94	26	84	28	79	40	82
5	109	38	100	38	76	33	81
6	204	85	100	50	72	69	87
7	65	23	95	13	77	29	68
9	73	24	91	26	84	23	87
10	140	53	88	56	73	31	77
11	312	224	95	45	75	43	79
12	27	10	100	7	0	10	80
13	64	17	94	20	70	27	74
14	152	74	93	42	73	36	77
15	140	63	81	51	76	26	71
16	174	85	100	50	82	39	78
17	143	56	94	47	72	40	76
Média	130,78	58,78	93,42	37	70,78	35	78,42

Anexo B

Tabela 4. Dosagens E2 (pg/ml) e P4 (ng/ml)

Paciente	Estradiol									Progesterona								
	Fresco			30 dias			180 dias			Fresco			30 dias			180 dias		
	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
11	2638	2020	2588	954	2420,6	3145,1	601	1938	3535	0,78	3,66	4,48	<0,2	1,7	1,72	<0,2	7,18	8,77
12	1480	3844,4	3546,9	3619	18759,3	39748,8	1515	2220	5149	1,13	2,42	1,44	0,29	7,04	7,64	<0,2	5,62	6,37
13	1178	3777,9	3938,9	812	881	1850	674	1364	2815	<0,2	0,89	1,21	0,2	0,59	0,65	1,66	2,49	3,21
14	1806	3118,5	4994,5	1528	3108	13295	458	1396	3976	<0,2	0,75	0,95	0,41	1,69	2,31	<0,2	0,38	1
15	630	1063	1324	765	498	648	877	231	1272	<0,2	0,25	0,52	<0,2	0,56	1,13	0,25	<0,2	3,62
16	5754	11465,3	18213,3	596	8000	18576	679	739	2180	<0,2	3,37	5,52	<0,2	8,49	12,2	<0,2	0,643	1,97
17	697	801	1939	633	954	1075	1143	1486	901	0,43	5,46	4,28	0,31	11,5	7,55	0,46	0,49	1,36
Grupo	p=0,19			p=0,22			p=0,79			p=0,87			p=0,51			p=0,58		

Obs: os *ps* apresentados se referem à comparação das dosagens entre os diferentes momentos e comprovam a ausência de pico na produção destes esteróides ao longo do tempo.

Anexo C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: “Implementação da técnica de congelamento progressivo lento em rampa para criopreservação de tecido cortical ovariano no serviço de Reprodução Humana do HC-FMRP e Avaliação da viabilidade do tecido cortical ovariano criopreservado ao longo do tempo”

Pesquisadores envolvidos: Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva; Jacira Ribeiro Campos; Bruno Ramalho de Carvalho; Professor Doutor Rui Alberto Ferriani; Maria Cristina Picinato.

Orientador: Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

1. Conteúdo

Este texto é direcionado às mulheres, entre 18 e 40 anos, que serão submetidas a procedimento eletivo de laqueadura das trompas por vídeo-laparoscopia, para fins de planejamento familiar.

2. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Essa é uma pesquisa que vai estudar como fazer para congelar fragmentos de ovário de mulheres. Os resultados dela poderão ser usados, no futuro, em mulheres jovens que precisam ser tratadas por câncer, pois os tratamentos de quimioterapia (soro) e radioterapia normalmente deixam essas mulheres estéreis, ou seja, não podem mais engravidar.

A nova técnica propõe congelar um pequeno fragmento do ovário, com tamanho menor que 1 cm; mas ainda está em estudo. Para pesquisar e melhorar a técnica, precisamos de fragmentos de ovários de mulheres jovens como você, com funcionamento normal dos ovários, que já tenham tido filhos. Assim, as voluntárias ideais para a pesquisa são as pacientes que vão fazer a laqueadura das trompas, pois certamente já tiveram filhos e não querem mais engravidar. Você **NÃO** está sob suspeita de ter câncer.

3. Os procedimentos que serão utilizados:

Para este estudo, no momento da ligadura das trompas por vídeo-laparoscopia, aproveitaremos a oportunidade para fazer, também, uma biopsia (a retirada de um pequeno pedaço) de **UM** dos seus dois ovários. O volume de um ovário normal é de 3 a 9 centímetros cúbicos e o fragmento retirado para a pesquisa terá aproximadamente 0,3 centímetros cúbicos, correspondendo, portanto, a, no máximo, 10% do seu ovário (Figura 1).

Esse pequeno fragmento do ovário será congelado por seis meses e, então, descongelado para ser estudado em laboratório, para ver se estamos congelando de maneira correta. Os resultados pretendem mostrar o que acontece com o ovário depois do congelamento, ou seja, se o tecido continua vivo e com células normais.

Esse material não será utilizado para outra finalidade que não a da pesquisa, e, portanto, não existe nenhuma possibilidade de uso de seu ovário para produção de óvulos para serem usados por você ou outra paciente. Após o congelamento, o fragmento será digerido e apenas restarão os óvulos e estes óvulos serão analisados após 30 e 180 dias do congelamento e depois devidamente desprezados.

Normalmente, para a realização da laqueadura por vídeo-laparoscopia, seria necessária apenas uma abertura no abdome (um corte), geralmente feita dentro do umbigo, com um pouco mais de 1 cm de comprimento. Porém, para a retirada desse pequeno fragmento de um de seus dois ovários, serão necessárias mais duas pequenas aberturas no abdome (dois pequenos cortes com menos de 1 cm de comprimento), abaixo da linha da cintura (na virilha), ficando as cicatrizes cobertas pela roupa íntima ou de banho mais cavada (Figura 2).

Figura 1

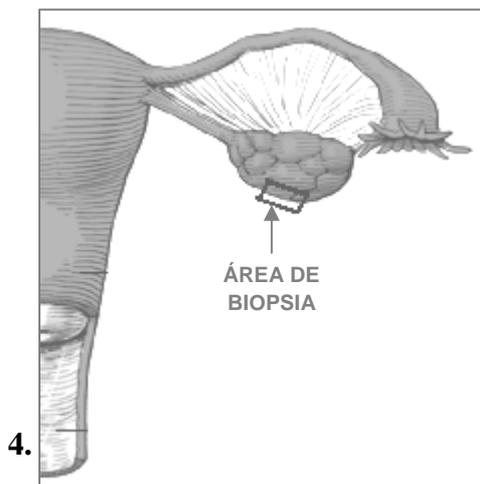
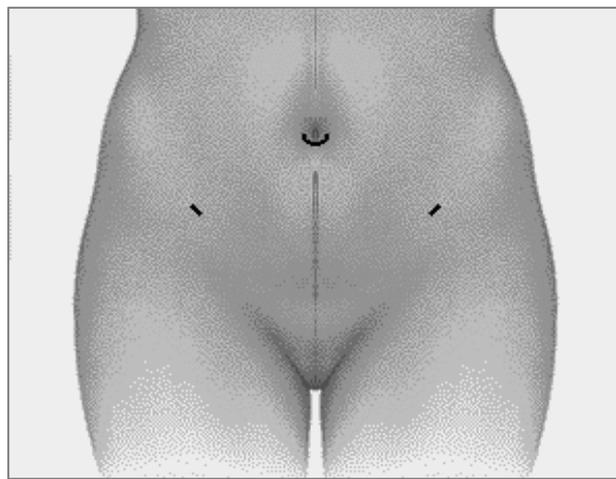


Figura 2



Os riscos são os mesmos já presentes no procedimento de laqueadura por vídeo-laparoscopia, que existem para todas as cirurgias: sangramentos, lesão de alças intestinais, infecções no pós-operatório. As outras duas aberturas no abdome praticamente não acrescentam riscos, pois serão realizadas com visualização através de uma câmera, o que evita a possibilidade de complicações.

A biópsia de ovário, em si, normalmente, pode provocar apenas um sangramento mínimo, que pode ser corrigido rapidamente, não representando praticamente nenhum risco a mais para a paciente. Os ovários que são submetidos a biópsia continuarão funcionando normalmente depois da cirurgia (produção de hormônios), e esse procedimento é usado também para diagnóstico e tratamento de algumas pacientes.

Assim, tendo lido todo o texto e recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, eu, _____, RG _____, Registro no HCFMRP _____, concordo e aceito o convite para participar como **VOLUNTÁRIA** da pesquisa em questão.

São meus direitos:

1. Possuir uma cópia deste documento, ficando outra igual com o pesquisador responsável;
2. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa para a qual sou voluntária;
3. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, em qualquer fase dele, sem penalização alguma e sem que isso traga prejuízo ao meu cuidado;
4. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
5. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

Ribeirão Preto (SP), ____ de _____ de 20__.

VOLUNTÁRIA

Dra Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Pesquisadora responsável

Você poderá encontrar a Dra. Ana Carolina e Jacira,

das 07:30h às 17:00h, no endereço:

Hospital das Clínicas da FMRP-USP / Campus Universitário

Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia - 1º andar

Bairro Monte Alegre / Ribeirão Preto – São Paulo

CEP: 14.049-900

Telefones: (16) 3602-2814 / 3602-2815 / 3602-2817

ou pelo e-mail:

anasars@fmrp.usp.br

“O tempo de criopreservação não aumenta o dano no tecido ovariano congelado para fins de preservação de fertilidade”

RESUMO

Introdução: O câncer invasivo é diagnosticado em mais de 600.000 pessoas /ano nos Estados Unidos, 269.800 dos acometidos são mulheres e 8% apresentam idade abaixo de 40 anos ^[1], com taxas progressivamente maiores de sobrevida. Estima-se que uma em cada 250 jovens adultas é sobrevivente do câncer infantil, mas com alguns efeitos colaterais ^[2, 3]. Um dos principais problemas, especialmente para as jovens pacientes, é que a terapia destrói uma proporção significativa da população folicular, o que pode resultar em infertilidade permanente ^[3, 4, 5]. Sendo estas pacientes tão jovens, o tempo que o tecido permanecerá congelado é bastante longo e não está bem claro se o tempo de congelamento amostra interfere na qualidade do tecido preservado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se o tempo de congelamento da amostra interfere na população folicular, na viabilidade do tecido após o descongelamento e na capacidade funcional do tecido para a esteroidogênese.

Material e Métodos: foram incluídas na casuística 17 pacientes, em idade reprodutiva, submetidas à laqueadura laparoscópica, durante a qual foi realizada uma biopsia ovariana de cerca de 2 x 2 cm, a qual foi subdividida em 3 fragmentos. Um foi processado à fresco e os outros dois embebidas em meio contendo crioprotetor e congelados para posterior descongelamento e análise. Foi utilizada a técnica de congelamento lento. Os fragmentos foram divididos em três para análise nas amostras a fresco (GF), e descongeladas após 30 (G30) e 180 (G180) dias. Cada fragmento foi subdividido em três: 1) para fixação com formaldeído e inclusão em parafina, seguido de cortes seriados com espessura de 4 μ e a cada 3 cortes, o material foi corado com HE (hematoxilina/eosina) e analisado com microscópio com aumento de 400 vezes para contagem de folículos. O número total de folículos/mm³ foi calculado usando-se a seguinte fórmula: $Nt=(No \times St \times t)$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm², St é o total de cortes em 1 mm³ do ovário e t é a espessura do corte. 2) Digestão química com

colagenase e aplicação técnica DEAD-LIVE (fluorescência por calceína AM e brometo de ethidium) para avaliação da viabilidade folicular, dada por %de foliculos viáveis. 3) Cultivo de tecido ovariano em meio quimicamente definido para avaliação da capacidade esteroidogênica do tecido através da dosagem de estradiol e progesterona no meio de cultivo nos tempos 0, 48, 96 e 144h.

Resultados: A idade média das pacientes incluídas foi de $29,0 \pm 2,78$ anos, com paridade média de $2,94 \pm 0,24$ filhos. A densidade folicular média foi $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ e $296,8 \pm 269,0$ foliculos/mm³, para os tecidos frescos e descongelados com 30 e 180 dias, respectivamente, não havendo diferença entre eles ($p=0,46$). A viabilidade folicular foi maior no tecido fresco (GF=93,4% de foliculos viáveis) quando comparado com os tecidos criopreservados (G30=70,8%; $p<0,001$ e G180=78,4%; $p<0,001$), embora não tenha havido diferença na viabilidade entre as amostras descongeladas ($p>0,05$). Com relação à capacidade esteroidogênica do tecido não houve redução na produção de estradiol e progesterona após a criopreservação (Estradiol: GF= 2026 ± 1782 pg/ml, G30= 1272 ± 1081 pg/ml e G180= $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; Progesterona: GF= $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, G30= $0,26 \pm 0,08$ ng/ml e G180= $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$).

Conclusões: O processo de congelamento lento de ovário, embora comprometa parcialmente o tecido, permite conservar cerca de 80% de viabilidade folicular e preserva a capacidade esteroidogênica tecidual similar ao tecido fresco. Ainda que a pequena casuística limite conclusões mais definitivas com relação à função do tecido, o fato de comprovar a produção hormonal no meio encoraja a implementação desta técnica na preservação da fertilidade feminina, já que ensaios clínicos para esta finalidade são eticamente complicados e os estudos atualmente apresentados com série de casos apresentam pequenas amostras ou relatos isolados de caso. Além disso, nos casos de reimplante, indícios de falência do enxerto provavelmente se devem mais à isquemia do que à criopreservação propriamente dita.

Palavras-chave: tecido ovariano, criopreservação, viabilidade, densidade folicular, cultivo de tecido.

Introdução

A cada dia mais pacientes estão sobrevivendo ao câncer, graças ao diagnóstico precoce e tratamento adequado. A ação citotóxica da radiação ionizante e dos quimioterápicos, com grande frequência, leva à ocorrência de falência ovariana precoce (FOP), que implica sérias conseqüências a longo prazo, como redução da massa óssea levando a osteoporose, aumento na incidência de doenças cardiovasculares, ocorrência precoce de sintomas climatéricos e infertilidade ^[1]. O risco de infertilidade varia de acordo com o tratamento, a quimioterapia induzida por esquemas de tratamento individual baseada em agentes alquilantes e platina possui o maior potencial de dano ao sistema reprodutivo ^[2, 3, 4].

Uma variedade de tratamentos de câncer pode causar infertilidade nos pacientes que se destinam a cura. Alguns protocolos de quimioterapia podem causar insuficiência prematura do ovário ou insuficiência ovariana aguda que ocorre durante ou logo após o tratamento do câncer, ou menopausa prematura seguida de uma janela de função normal após a terapia. Embora adultos sobreviventes tendam a ter maior interesse na preservação e fertilidade reprodutiva, é fundamental ter em mente que outras opções devem ser disponibilizadas aos jovens pacientes com câncer.

A evolução contínua das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) permite que se considerem várias estratégias de tentativa de manutenção da função reprodutiva em pacientes egressas de tratamentos de doenças neoplásicas, dentre as quais se incluem manipulação hormonal, transposição dos ovários, criopreservação de embriões, gametas e de tecido cortical ovariano. O congelamento de tecido ovariano é atualmente proposto com o intuito principal de manter a função ovariana preservada, tanto do ponto de vista de fertilidade como de produção hormonal, o que não se alcança com os demais métodos. Além disso, essa opção surge no contexto atual para servir a grupos específicos de pacientes para as quais as demais técnicas não são recomendáveis, como: (1) pacientes pré-púberes, cujas gônadas ainda não

estão sob controle do eixo hipotálamo-hipófise; (2) mulheres que não tenham parceiro e não desejam embriões oriundos da fertilização com sêmen de doador; (3) pacientes portadoras de neoplasias estrogênio-dependentes, como o câncer de mama; e (4) mulheres portadoras de neoplasias malignas que necessitam de abordagem imediata, para as quais o retardo no início do tratamento pelo tempo necessário para indução da ovulação poderia levar a mudanças no prognóstico da paciente. Particularmente sob esse aspecto, a coleta do tecido cortical ovariano para criopreservação oferece a vantagem de poder ser realizada em qualquer momento do ciclo menstrual da paciente, e possibilitar a aquisição de centenas de milhares de folículos primordiais ^[5, 6]. É relevante comentar sobre as desvantagens encontradas quanto à criopreservação de tecido cortical ovariano, sendo estas, (1) submeter à paciente a procedimentos cirúrgicos para colheita de tecido ovariano; e (2) possibilidade de reintroduzir células malignas no caso de posterior reimplante do tecido ^[6].

Contudo o presente trabalho teve com objetivo avaliar a densidade folicular, a viabilidade folicular e a capacidade esteroidogênica do tecido fresco e congelado/descongelado após 30 e 180 dias.

Material e métodos

Trata-se de um estudo prospectivo, onde foram incluídas na casuística 17 pacientes hígdas, com idade média de $29,0 \pm 2,78$; onde uma paciente apresentou paridade de 2 filhos e todas as outras com paridade superior a 3 filhos.

Foram colhidas biópsias de tecido ovariano com aproximadamente 2,0 x 2,0 cm, com tesoura laparoscópica; as biópsias foram preparadas submersas em meio nutriente M199 (Medium 199 – Sigma sterile filtered with Earle's salts, L-glutamine and NaHCO₃). Para preparo da amostra foram eliminados os restos de tecido medular, corpos lúteos e eventuais cistos hemorrágicos, por meio de raspagem com lâmina de bisturi ^[7], de maneira que o tecido manteve espessura de, no máximo, 2,0 mm, preservando somente a córtex ovariana para

adequada penetração do crioprotetor DMSO (Dimetil-Sulfóxido 1,5M Sigma). O tecido foi então dividido em 3 fragmentos: (1) para análise da amostra a fresco (controle), de 0,4 cm x 2,0 cm; (2) para congelamento em rampa e descongelamento após 30 dias, de 0,8 cm x 2,0 cm; (3) para congelamento em rampa e descongelamento após 180 dias, de 0,8 cm x 2,0 cm. A amostra para avaliação a fresco foi dividida em 2 fragmentos iguais, de 0,4 cm x 1,0 cm, sendo um para avaliação por hematoxilina-eosina (HE) e outro pela técnica Dead-Live. Nos sete últimos casos, dividiu-se a amostra em 3, e o terceiro fragmento foi submetido a cultivo para testar a capacidade funcional do tecido para esteroidogênese.

As duas amostras congeladas foram posteriormente descongeladas após 30 ou 180 dias após o congelamento. A análise dos fragmentos descongelados recebeu o mesmo tratamento do fragmento fresco da mesma paciente. O primeiro fragmento fresco foi fixado em solução de formol aldeído a 4% (MERCK) e embebido em parafina foram realizados cortes seriados com espessura de 4 μ m, e a cada 3 cortes, o material foi corado com HE e analisado ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes para a contagem do número de folículos. Foram analisados 9 cortes por paciente, sendo 3 cortes do tecido fresco, 3 cortes do descongelado de 30 dias e 3 cortes do descongelado de 180 dias. Para cálculo da área foi utilizado o sistema para morfometria do fragmento que é constituído de uma câmera analógico-digital modelo JVC TK1270, utilizando uma lente grande angular de 55 mm acoplada e este conjunto, preso a um suporte vertical permitindo assim seu posicionamento em relação ao objeto captado. As imagens obtidas são então captadas através de uma placa de captura de vídeo FG1 da Keiss Zeiss acoplada a um computador padrão IBM-PC. Desta forma a primeira fase do processo é a captação das imagens dos cortes de fragmento, onde se cuida da iluminação e foco do objeto para melhor visualização de suas estruturas. Em seguida o sistema automaticamente destaca as estruturas da imagem através de ferramentas de brilho e contraste.

A Segunda fase é propriamente a morfometria das estruturas desejadas. Para isso desenvolveu-se uma macro sobre o software de processamento de imagem KS400; Karl Zeiss Versão 2.0. A macro permite ao usuário escolher a imagem previamente captada e em seguida gerar a sua calibração, que é a relação pixel (unidade de imagem) x milímetro, que permite obter os valores de medidas de estruturas já em milímetros^[8]. O número total de folículos por 1 mm³ foi calculado usando-se a seguinte fórmula: $Nt=(No \times St \times t)$, onde Nt é o número de folículos, No é a média de folículos observados em 1 mm², St é o total de cortes em 1 mm³ do ovário e t é a espessura do corte^[9].

O segundo fragmento foi submetido à digestão em solução enzimática contendo PBS (PBS DULBECCOS W/O Ca, Mg (1X) INVITROGEN GIBCO) e Colagenase (Collagenasa Crude Type IA Cell Culture*T, Sigma) para análise da viabilidade folicular pela técnica Dead-Live (Dead-Live Viability/Cytotoxicity Molecular Probes); e, nas pacientes 11 a 17.

O terceiro fragmento fresco foi subdividido em 4 frações de 2 x 2 mm e colocados em cultivo utilizando o meio α -MEM (Minimum Essential Medium- Invitrogen), suplementado com 0,1% polivinilpirrolidona (PVP-40) (Sigma); 100 ng/ml de insulina bovina (Sigma); 10 ng/ml de IGF-1 recombinante humano (Invitrogen); 10⁻⁷M de androstenediona (Sigma); 11 mM de aminoácidos não-essenciais (Gibco); 5 μ g/ml de transferrina humana (Sigma); 1,4 ng/ml de selênio de sódio (Acros Organics); 10 mM de bicarbonato de sódio (Gibco); 0,02M de hepes (Sigma) e antibióticos (10000 UI de penicilina e 10000 UI de estreptomicina) (Sigma). Foram cultivados 4 fragmentos de 2 x 2 mm/1 ml de meio de cultura em placa NUNC de 4 poços e incubados em atmosfera úmida de 5% de CO₂ e 37°C, por 144 horas. Os meios de cultura foram obtidos a cada troca de 48 horas, sendo retirados antes (tempo 0 hora), após 48, 96 e 144 horas de cultivo e estocados em freezer a -20°C para as dosagens de progesterona (P4) e 17 β -estradiol (E2), as amostras de meio foram submetidas à dosagem hormonal pelo método de quimioluminescência, que combina anticorpos específicos com

enzima amplificada, em um aparelho Immulite – Diagnostic Products Corporation (DPC) sistema randômico automatizado.

Em seguida, os fragmentos reservados para o congelamento progressivo lento em rampa foi iniciado, utilizando programa específico Freeze Control – Cryobath – CL-8800 – Cryologic, até 120°C negativos, seguido de imersão para armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) [10]. O descongelamento rápido também foi seguido segundo o protocolo de Gosden *et al.* [10].

A viabilidade celular foi estimada pela técnica Dead-Live, que permite diferenciar células vivas e mortas, marcadas, respectivamente, pela calceína e pelo homodímero de etídio, visualizadas ao microscópio de fluorescência. De acordo com os princípios da técnica, a calceína, utilizando o cálcio como co-fator, é metabolizada por células com viabilidade preservada, produzindo a emissão de fluorescência verde. O homodímero de etídio, por sua vez, somente consegue penetrar em células cuja membrana plasmática tenha perdido sua integridade, ou seja, em células inviáveis, corando-as de vermelho. Assim, utilizando-se um microscópio de fluorescência, esta técnica permite reconhecer células vivas e células mortas ou em processo de degeneração, de acordo com a cor da fluorescência emitida [7, 11, 12, 13].

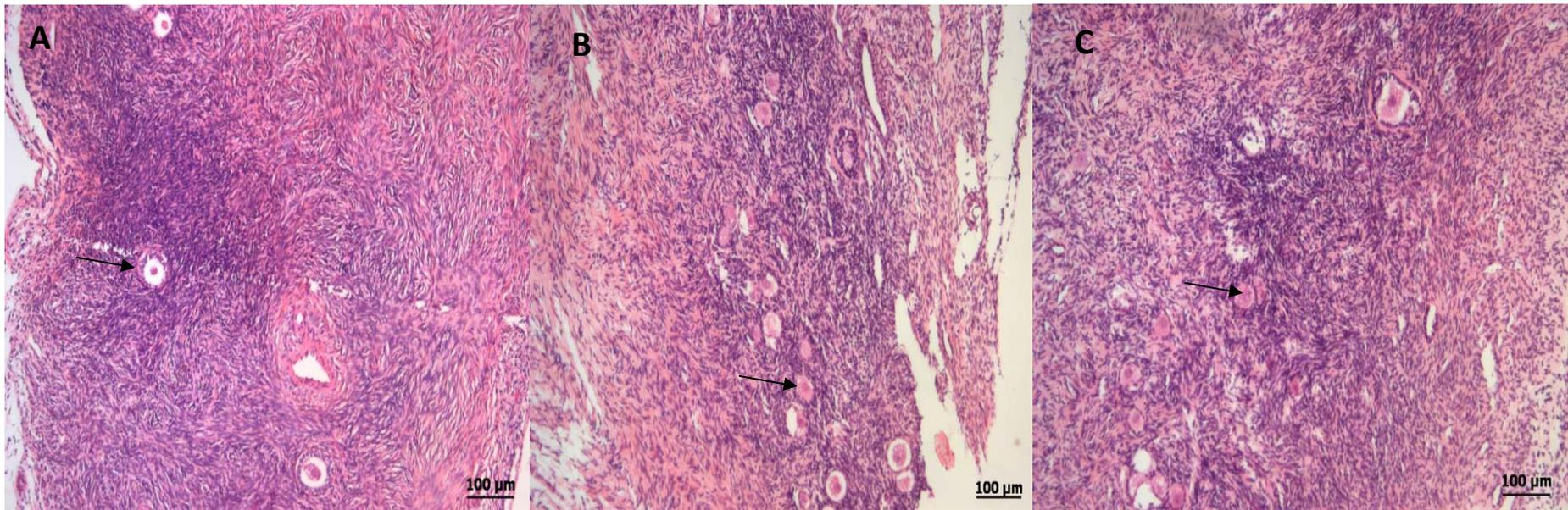
Análise estatística

A análise das variáveis foi realizada utilizando-se o programa GraphPad 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente foi calculado o valor da média e desvio padrão para todas as variáveis, seguido do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O teste aplicado para análise da densidade folicular, viabilidade folicular, produção de estradiol e progesterona no meio de cultivo nos diferentes momentos (48, 96 e 144h; para identificação de pico de produção destes hormônios) e entre os grupos, foi o Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's Multiple Comparison Test para identificação da diferença entre eles.

Resultados

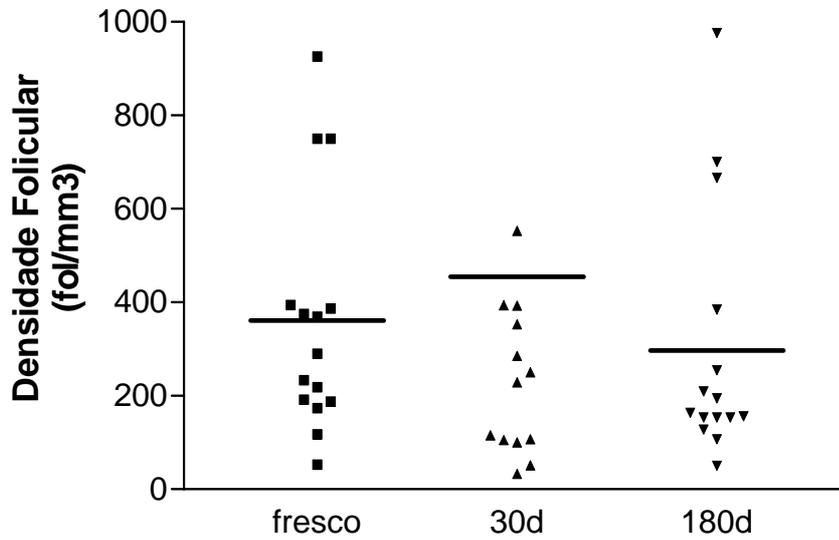
A densidade folicular foi avaliada em cortes de tecido corados com HE, onde pode-se observar a heterogeneidade da distribuição folicular ao longo do parênquima (Figura 1); a densidade média foi de $361,3 \pm 255,4$, $454,9 \pm 676,3$ e $296,8 \pm 269,0$ folículos/mm³, para os tecidos: fresco e congelado/descongelados com 30 e 180 dias, respectivamente, não havendo diferença entre eles ($p=0,46$) (Figura 2).

Figura 1. Cortes histológicos de tecido ovariano fresco (A) e congelado/descongelados de 30 dias (B) e 180 dias (C), da mesma paciente, corados com HE para avaliação da densidade folicular:



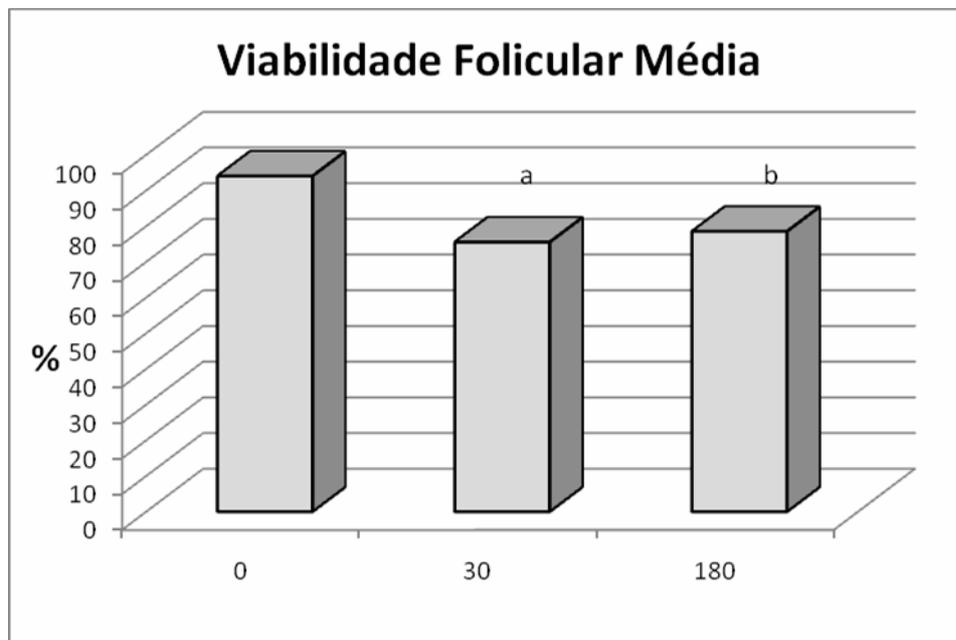
Obs: As setas apontam exemplos de foliculos em cada corte.

Figura 2. Densidade folicular (folículos/mm³) do tecido ovariano fresco e congelado-descongelados, após 30 e 180 dias.



A viabilidade folicular foi maior no tecido fresco com 93,4% de folículos viáveis quando comparado com os tecidos criopreservados de 30 dias 70,8%; $p < 0,001$ e 180 dias 78,4%; $p < 0,001$, embora não tenha havido diferença na viabilidade entre as amostras descongeladas ($p > 0,05$) (figura 3).

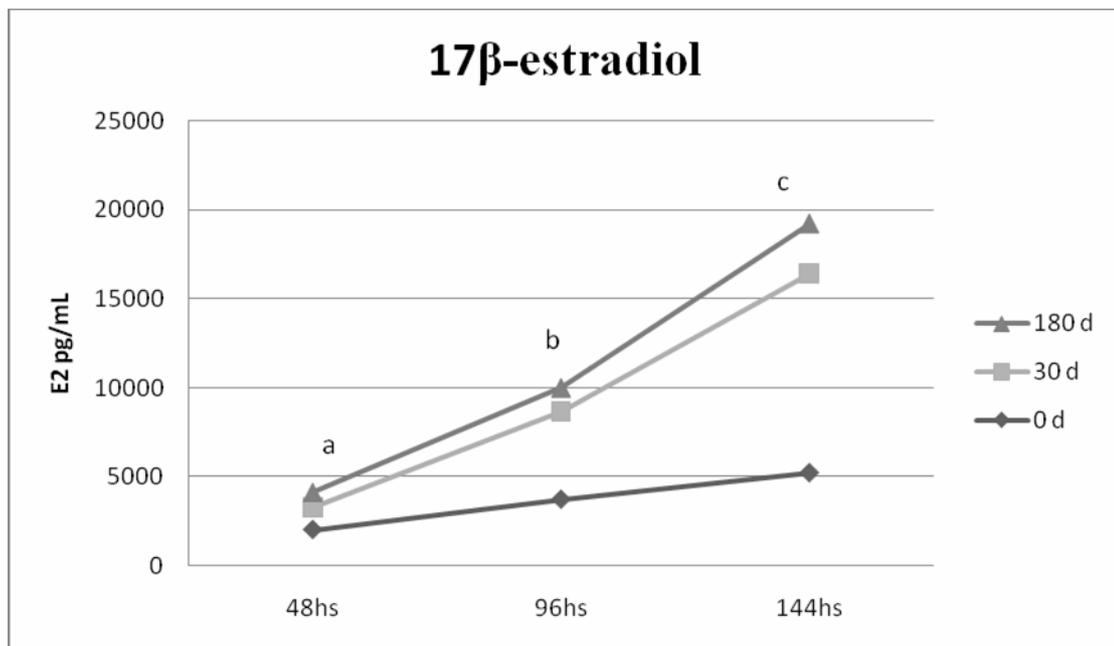
Figura 3. Comparação da viabilidade folicular média entre os tempos 0, 30 e 180 dias.



Legenda: a = $p < 0,001$ e b = $p < 0,001$.

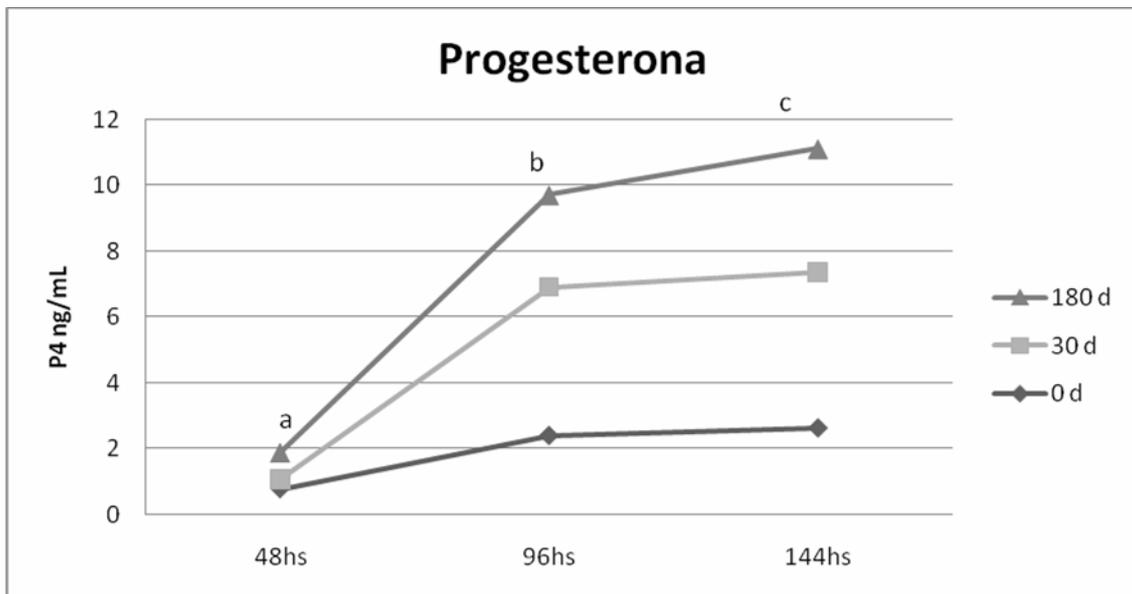
Com relação à capacidade de esteroidogênese do tecido as dosagens no tempo 0 hora apresentaram valor igual a zero, confirmando então a ausência de contaminação hormonal na manipulação do meio; não houve redução na produção de estradiol e progesterona após a criopreservação: Estradiol: tecido fresco = 2026 ± 1782 pg/ml, 30 dias = 1272 ± 1081 pg/ml e 180 dias = $849,6 \pm 366,2$ pg/ml, $p=0,19$; Progesterona: tecido fresco = $0,45 \pm 0,37$ ng/ml, 30 dias = $0,26 \pm 0,08$ ng/ml e 180 dias = $0,45 \pm 0,54$ ng/ml, $p=0,86$ (figuras 4 e 5).

Figura 4. Comparação da concentração de estradiol nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.



Legenda: a = comparação das dosagens de estradiol após 48 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,19$; b = comparação das dosagens de estradiol após 96 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,22$; c = comparação das dosagens de estradiol após 144 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,79$.

Figura 5. Comparação da concentração de progesterona nos diferentes tempos de cultivo e diferentes datas de descongelamento.



Legenda: a = comparação das dosagens de progesterona após 48 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,87$; b = comparação das dosagens de progesterona após 96 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,51$; c = comparação das dosagens de progesterona após 144 horas de cultivo nos tempos 0, 30 e 180 dias onde $p=0,58$.

Discussão

Na tentativa de verificar a qualidade do tecido ovariana congelado/descongelado após a criopreservação, neste estudo foram avaliados diferentes aspectos do tecido recuperado, sendo consideradas a densidade e a viabilidade folicular e a capacidade esteroidogênica do tecido.

A densidade folicular avalia o número de folículos presente no tecido por área e pode variar de acordo com a idade da paciente, esta técnica vem sendo proposta por diversos autores como critério de controle para avaliação do tecido após descongelamento [5, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18]. De acordo com Poirot *et al.* [5], em pacientes entre 20 e 30 anos de idade espera-se uma média de 30 a 400 folículos/mm³ de tecido ovariano, devemos lembrar, entretanto, que a distribuição dos folículos ao longo do córtex ovariano não costuma ser homogênea. Neste estudo encontramos uma média de densidade folicular compatível com a literatura, variando

de 300 a 460 folículos/mm³ além de confirmar a heterogeneidade na distribuição da população folicular. A finalidade da avaliação de densidade foi garantir que os diferentes fragmentos conteriam número significativo de folículos que permitiriam avaliar aspectos funcionais e de viabilidade, já que os cortes de tecido fresco e congelados-descongelados, corados com HE e utilizados na avaliação foram obtidos de fragmentos acolados.

Também foi verificada a manutenção da densidade folicular após o congelamento e descongelamento do tecido, o que já era esperado, visto que a perda de folículos em consequência ao procedimento não promoveria alteração morfológica significativa. Para se avaliar a real integridade estrutural da unidade folicular seria necessária a realização de marcadores de apoptose celular, ou estudo de ultra-estrutura por microscopia eletrônica, os quais não foram realizados neste estudo.

Embora esta avaliação estrutural fina não tenha sido o escopo deste estudo, fez parte das avaliações do tecido a verificação da viabilidade folicular medida por técnica que indiretamente avalia alguma capacidade funcional do folículo. A técnica do Dead-Live explora uma capacidade celular de metabolização da calceína utilizando o cálcio como cofator, o metabólito produzido emite fluorescência a qual é identificada por microscopia, sendo assim, existe a necessidade de que o metabolismo celular esteja viável e funcional.

Estudos anteriores com criopreservação de tecido ovariano obtiveram entre 40 e 60% de recuperação e viabilidade folicular após congelamento/descongelamento em relação ao tecido a fresco ^[12, 18, 19, 20], neste estudo foi observado que a técnica de congelamento lento em rampa aplicada em biópsia ovariana humana preserva uma alta viabilidade de oócitos imaturos (70,8% a 78,4%). Logicamente que havendo o cuidado na manipulação do tecido recém extraído, esperou-se que a amostra a fresco demonstrasse uma viabilidade próxima de 100%, a qual foi confirmada (GF = 93% de viabilidade folicular).

Também foi verificado que a viabilidade é preservada ao longo do tempo de congelamento. A manutenção da porcentagem de viabilidade independente do tempo de congelamento (30 ou 180 dias) sugere que o dano tecidual provavelmente ocorra pela manipulação cirúrgica e processamento do tecido, os quais podem acarretar isquemia, e não pelo congelamento em si. Não encontramos na literatura dados que contestem ou reafirmem estes achados, sendo assim este é o primeiro relato de avaliação da influência do tempo de congelamento sobre o dano tecidual nas técnicas de criopreservação de tecidos. Por estes achados podemos inferir que uma vez conservada a amostra o tempo de armazenamento não deverá prejudicar a qualidade do tecido. Se levarmos em consideração que as situações clínicas em que técnica será aplicada geralmente demandarão longos períodos de conservação esta informação é extremamente valiosa para a condução destes casos. Vários autores têm relatado o reimplante ou reutilização de amostras preservadas após períodos variados de tempo com resultados promissores [21, 22, 23-35]. Ernst *et al.* [35] relata que em todo o mundo há oito nascimentos de filhos como resultado do transplante de tecido ovariano congelado/descongelado. Uma dessas mulheres, que foi originalmente transplantada com seis fragmentos de córtex ovariano, depois de ter experimentado um período de menopausa, já concebeu pela segunda vez por concepção natural, dando à luz uma menina saudável; esta é a primeira mulher no mundo a ter dois filhos, de gestações separadas, nascidos como resultado do transplante de tecido ovariano congelado/descongelado. Este resultado incentiva o desenvolvimento da criopreservação de tecido ovariano para a preservação da fertilidade como um procedimento clínico para meninas e jovens mulheres que enfrentam os tratamentos gonadotóxicos.

Da mesma forma que a integridade estrutural não traduz a viabilidade do tecido, esta última não garante a funcionalidade do mesmo. Com esta finalidade foi realizada a avaliação da capacidade esteroideogênica do tecido, a qual permite inferir a qualidade funcional do

mesmo em termos de produção hormonal. O cultivo de tecido ovariano vem sendo descrito por alguns autores como forma de avaliar a capacidade funcional, ou para se obter folículos em estádios mais avançados de desenvolvimento com fins reprodutivo [36, 37, 38]. Sadeu *et al.* [39] descreveram a manutenção da viabilidade do tecido ovariano fetal humano em cultivo por um período de até 63 dias, inclusive com maturação parcial dos mesmos. Sendo assim, foi optado por este modelo de avaliação funcional dado a comprovação da capacidade de sobrevivência do tecido no meio de cultivo. Vale ressaltar que uma das premissas da criopreservação de tecido ovariano, e não de gametas isolados, é a possibilidade de se manter a capacidade de esteroidogênese e não somente a capacidade reprodutiva.

Neste estudo foi verificado, a partir das dosagens de estradiol e progesterona no meio de cultivo, que a capacidade de esteroidogênese do tecido está preservada. Além disso, o tecido cultivado continuou produzindo quantidades hormonais equivalentes ao longo de todo o tempo de cultivo, mantendo a mesma curva de produção hormonal, indicando a boa conservação do tecido durante o cultivo. É importante frisar que o tamanho das amostras colocadas em cultivo foi padronizado justamente para evitar que o volume de tecido pudesse influenciar nas concentrações hormonais do meio, gerando um viés metodológico.

Além disso, a produção de hormônios a partir do tecido fresco não apresentou diferença estatística quando comparada com os cultivos de tecido congelado/descongelado, ou seja, houve a preservação da capacidade de produção hormonal após a criopreservação independente do tempo de congelamento. Este dado reforça a não progressão do dano tecidual pela manutenção em baixas temperaturas e corrobora os achados da viabilidade folicular de que provavelmente a agressão ao tecido ocorre pela manipulação e processamento da amostra mais do que pelo congelamento em si.

Finalmente devemos considerar que a função esteroidogênica preservada não afirma que há função reprodutiva mantida, uma vez que o ovário perde primeiramente a capacidade

reprodutiva para depois perder a capacidade esteroidogênica. Podemos citar como exemplo a própria fisiologia ovariana da mulher, em que a fecundidade decai bruscamente após os 40 anos (taxas de gestação após 40 anos < 5%), e a menopausa ocorrerá em média entre os 50 e 55 anos de idade.

Considerações Finais

Apesar da criopreservação de tecido ovariano ainda ser considerada como técnica experimental, muitos centros de Reprodução Assistida vem praticando este procedimento de forma corriqueira em atividades assistenciais ^[34, 35], embora não haja um consenso com relação ao tema ^[40] e nem respaldo formal das Sociedades competentes para sua aplicação em larga escala ^[41]. Entretanto, se o risco de falência ovariana relacionada ao tratamento oncológico for elevado consideramos que a paciente deve ter autonomia para definir se deseja ou não submeter-se ao procedimento de preservação de fertilidade, logicamente após adequada informação de riscos, benefícios e real efetividade da técnica.

Muitos são os questionamentos relativos a esta nova proposta: quais são as melhores candidatas ao procedimento, qual o melhor método para a retirada do tecido, qual a melhor forma de congelamento/descongelamento, se o(s) ovário(s) deve ser criopreservado(s) inteiro(s) ou em fragmentos, qual o melhor local para o reimplante e se deve ser realizada anastomose vascular ou não. Assim sendo, mais estudos científicos clínicos e experimentais ainda devem ser realizados com finalidade de elucidação de todas estas dúvidas.

Apesar de tudo isso, consideramos que a técnica é adequada no que diz respeito à conservação do tecido e manutenção de sua viabilidade e capacidade funcional, embora os aspectos reprodutivos propriamente ditos não tenham sido explorados. Entretanto, isso se justifica facilmente pelas enormes implicações éticas que este tipo de avaliação demandaria, visto que somente a fecundação, implantação e nascimento de bebês saudáveis confirmariam com certeza a preservação desta função.

Portanto, conclui-se que o tempo de criopreservação não interfere na estrutura, na viabilidade e na capacidade esteroidogênica do tecido ovariano. Esses achados permitem implantar com segurança e fidedignidade uma técnica já padronizada para o congelamento de tecido ovariano humano. Ressaltando que a maior limitação atual referente à criopreservação ovariana está na utilização desse tecido após o descongelamento, sendo os resultados encontrados na literatura mundial ainda limitados a relatos de casos ou estudos com pequena casuística.

Referências

1. Shüffner AG, Piazza MJ, Costa SL, Centa LJR: Criopreservação de Tecido Ovariano. Revisão Histórica. *Femina* 2003; 31(1):63-66.
2. Su HI, Lin K, Bracia CR: Early menopause in cancer survivors: fertility options. *Menopausal Med* 2008; S1-8.
3. Maltaris T, Koelbl H, Seufert R, Kiesewetter F, Beckmann MW, Mueller A, Dittrich R: Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. *Asian J Androl* 2006; 8:515-33.
4. Revel A, Revel-Vilk S: Pediatric fertility preservation: is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Mol Cell Endocrinol* 2008; 282:143-9.
5. Poirot CJ, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugières L, Jouannet P: Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod* 2002; 17: 1447-52.
6. Varghese AC, du Plessis SS, Falcone T, Agarwal A: Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and *in vitro* maturation of follicles and oocytes: challenges for fertility preservation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 2:6:47.

7. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril* 2005; 83 S1: 1248-54.
8. Lara LA, Useche B, Ferriani RA, Reis RM, de Sá MF, de Freitas MM, Rosa e Silva JC, Rosa e Silva AC. The effects of hypoestrogenism on the vaginal wall: interference with the normal sexual response. *J Sex Med.* 2009; 6(1):30-9.
9. Gougeon A, Chainy GB. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):433-42.
10. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R: Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod* 1994; 9,597-603.
11. Cortvrindt RG, Smitz JE. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human cortical biopsy samples. *Fertil Steril* 2001; 75(3): 588-93.
12. Maltaris T, Dimmler A, Muller A, Hoffmann I, Beckmann MW, Dittrich R. Comparison of two freezing protocols in an open freezing system for cryopreservation of rat ovarian tissue. *J Obstet Gynaecol Res* 2006a; 32(3): 273-279.
13. Maltaris T, Dragonas C, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, Dittrich R. Simple prediction of the survival of follicles in cryopreserved human ovarian tissue. *J Reprod Dev* 2006b; 52(4): 577-582.
14. Oktay K, Schenken R, Nelson J. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995; 53: 295-301.
15. Demirci B, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 754-762.

16. Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Seracchioli R, Grigioni WF. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gyneol Oncol* 2003; 89: 259-266.
17. Gandolfi F, Paffoni A, Brambilla EP, Bonetti S, Brevini TAL, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 2006; 85(Suppl 1): 1150-1156.
18. Poirot CJ, Martelli H, Genestie C, Golmard JL, Valteau-Couanet D, Helardot P, Pacquement H, Sauvat F, Tabone MD, Phillippe-Chomette P, Esperou H, Baruchel A, Brugieres L. Feasibility of Ovarian Tissue Cryopreservation for Prepubertal Females With Cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2006, Wiley-Liss, Inc.
19. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
20. Oktay K, Sonmezer M. Ovarian tissue banking for cancer patients. Fertility preservation, not only ovarian preservation. *Hum Rep* 2004; 19(3): 477-80.
21. Donnez J, Dollmans M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squi□et J: Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364,1405–1410.
22. Oktay K, Karlikaya G: Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med* 2000; 342:1919.
23. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J: Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4489-94.
24. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG, Shalet SM: Orthotopic reimplantation of

- cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2001; 357:1172–1175.
25. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z: Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004a; 363(9412):873-40.
26. Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A: Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer-follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(4):448-53.
27. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J: Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Eng J Med* 2005; 353:318-321.
28. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN, Ottosen C, Andersen CY: Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* 2006; 21(8):2006-9.
29. Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, Delbaere A, Englert Y: Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod* 2006; 21,8:2010-2014.
30. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y: Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007; 12:1437-1442.

31. Callejo J, Salvador C, Marqués L, Navarro A, Busquets M, Valls C: Long-term evaluation of three series of implantation (orthotopical and heterotopical) ovarian frozen-thawed autografting. 2008. In press.
32. Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, Gosden RG: A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod* 2008; 23(7):1531-7.
33. Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escribá MJ, Simón C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril*. 2010; 93(1):268.e11-3.
34. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
35. Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS, Andersen CY. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010 Feb 19. [Epub ahead of print]
36. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ: A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction* 2008; 23,5:1151–1158.
37. Morimoto Y, Oku Y, Sonoda M, Haruki A, Ito K, Hashimoto S, Fukuda A. High oxygen atmosphere improves human follicle development in organ cultures of ovarian cortical tissues in vitro. *Hum Reprod*. 2007 Dec;22(12):3170-7.
38. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, Venturoli S. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1619-29.

39. Sadeu JC, Cortvrindt R, Ron-El R, Kasterstein E, Smitz J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertil Steril*. 2006 Apr;85 Suppl 1:1130-41.
40. Kim SS. Time to re-think: ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20(2):171-174.
41. American Cancer Society. *Cancer facts and figures 2009*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2009. http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2009_Presentation.asp. Accessed in 2009 (Jun 5).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)