



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Catarina Antunes Salvado

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

Covilhã, maio de 2020

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Dedicatória

Ao meu avô, Armindo Antunes.

Ao meu afilhado, Mateus Antunes.

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Moutinho, pela orientação para o desenvolvimento desta dissertação, pelo profissionalismo, disponibilidade e espírito crítico.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

Aos meus pais, Idalina e Carlos. Em especial à minha mãe, pelo apoio incondicional, pelo abraço sempre reconfortante e pelas palavras de incentivo ao longo desta caminhada. Ao meu irmão por estar sempre presente nas fases mais importantes e determinantes da minha vida. À minha avó. Ao meu padrinho, à minha tia Margarida e aos seus pequenos, por fazerem do longe sempre perto.

Ao Miguel, por ser presença assídua na minha vida e por me acompanhar ao longo deste percurso.

Aos meus amigos mais próximos. Aos que estão ao meu lado desde sempre! E aos que este percurso me trouxe, nomeadamente à Daniela, ao Afonso, à Inês, ao Rodrigo, ao Luís e ao Filipe, que caminharam comigo lado a lado, num espírito de companheirismo e inter-ajuda. Juntos formámos uma família!

A todos os que, direta ou indiretamente, me acompanharam ao longo destes seis fantásticos anos de trabalho, entrega e dedicação.

A quem sempre acreditou em mim.

O meu obrigada!

Prefácio

Abordagem ao doente oncológico: de “*primum succurrere*” a “*primum non nocere*”

Resumo

Introdução

A investigação em oncologia tem proporcionado significativos avanços ao nível do diagnóstico precoce e tratamento da doença oncológica, contribuindo para um número crescente de sobreviventes de cancro em idade pré-púbere e reprodutiva. Por outro lado, as abordagens terapêuticas podem ser tóxicas para os órgãos reprodutivos e conduzir a infertilidade. Adicionalmente, os efeitos causados pela insuficiência ovárica podem aumentar o risco de osteoporose e doença cardíaca, assim como causar sintomas da menopausa. A Criopreservação de Tecido Ovárico é uma técnica promissora, que pode ser proposta a doentes em risco, uma vez que permite restaurar a função endócrina ovárica e a capacidade reprodutiva.

Objetivos

O objetivo principal desta dissertação é analisar as possíveis aplicações clínicas do tecido ovárico criopreservado em doentes oncológicas.

Metodologia

Foi realizada uma ampla pesquisa bibliográfica, com recurso à base de dados *PubMed*. Foram usadas as seguintes palavras-chave: “*ovarian tissue cryopreservation*”, “*cryopreservation of ovarian tissue*”, “*fertility preservation*” e “*cancer*”. Adicionalmente, foram consultados comunicados, *guidelines* e pareceres de entidades de relevo na área. Após a análise do material recolhido, foi realizada uma revisão descritiva.

Resultados e Discussão

A criopreservação de tecido ovárico é um método considerado ainda experimental pela maioria das sociedades. É uma técnica que não exige a existência de um dador de esperma nem a realização de estimulação ovárica, e é a única opção disponível para raparigas pré-púberes e para casos em que não se pode atrasar o início do tratamento. Atualmente, já foram notificadas mais de 130 gravidezes após recurso ao método e em mais de 95% casos ocorreu recuperação da função ovárica após o transplante. Estima-se que a taxa de nascimentos e gravidezes é cerca de 37,7%, sendo comparável a outros métodos de preservação da fertilidade. O facto de o tecido ovárico transplantado permitir restaurar a função endócrina ovárica tem evocado novas perspetivas de utilização do tecido criopreservado, nomeadamente a terapia hormonal de substituição baseada em tecido celular, em detrimento da terapia hormonal de substituição farmacológica, e a possibilidade de o método ser proposto para adiar a menopausa em mulheres saudáveis. Adicionalmente, pode ser uma abordagem atrativa para induzir a puberdade em jovens pré-púberes, existindo, já, relato de dois casos de sucesso. No entanto, o procedimento levanta algumas preocupações e os principais desafios da técnica surgem sobretudo numa fase pós-

transplante, nomeadamente o restabelecimento da vascularização e o risco de reimplantação de células malignas.

Conclusão

A Criopreservação de Tecido Ovárico tem sido amplamente aplicada na preservação da fertilidade em doentes oncológicas, e mais recentemente, tem sido discutida como alternativa para adiar a menopausa e induzir a puberdade. No entanto, é evidente a necessidade de maior investigação para otimizar e estandardizar protocolos na realização da técnica; assim como, melhorar os métodos de pesquisa de células malignas e de revascularização do tecido enxertado.

Palavras-chave

Criopreservação de tecido ovárico; preservação da fertilidade; cancro.

Abstract

Introduction

Research in oncology has provided significant advances in the diagnosis and treatment of oncological disease, which leads to an increasing number of cancer survivors in prepubertal and reproductive age. While treatment approaches are improving, they may also lead to infertility, as it can be harmful to germinative cells. In addition to fertility loss, effects caused by ovarian failure can be responsible for increased risks of osteoporosis and heart disease and induce menopausal symptoms. Ovarian Tissue Cryopreservation is a promising technique that can be proposed to patients at risk, since it allows restoring ovarian endocrine function and reproductive capacity.

Objectives

The main objective of this dissertation is to analyze the possible clinical applications of cryopreserved ovarian tissue in cancer patients.

Methods

A wide bibliographic search was carried out, using the *PubMed* database. The following keywords were used: “*ovarian tissue cryopreservation*”, “*cryopreservation of ovarian tissue*”, “*fertility preservation*” and “*cancer*”. Additionally, communications, guidelines and recommendations from relevant related societies were consulted. Afterwards, a descriptive review was carried out.

Results and Discussion

Ovarian tissue cryopreservation is still considered an experimental technique by most societies. It does not require a sperm donor or ovarian stimulation, and it is the only option available to prepubertal girls and patients who do not have enough time to undergo another fertility preservation method. Until today, the technique has enabled the birth of more than 130 healthy babies worldwide and the restoration of ovarian endocrine function in 95% of the patients. The pregnancy and live birth rate is reported to be about 37,7%. As it allows to restore the ovarian function, some possible new perspectives on the use of cryopreserved tissue have been evoked, mainly the hormone replacement therapy based on cell tissue, at the expense of pharmacological hormone replacement therapy, and the possibility of using it to postpone menopause in healthy women. Additionally, cryopreservation of ovarian tissue can also be a potential physiological approach to induce puberty in prepubertal girls. At this date, two cases have been reported. Nevertheless, the procedure arouses some concerns and the main challenges of the technique arise mainly in the post-transplant phase and include the restoration of vascularization and the risk of malignant cells reimplantation.

Conclusion

Ovarian Tissue Cryopreservation has been applied effectively to preserve fertility in cancer patients and, more recently, it has been discussed as an alternative to postpone menopause and induce puberty. However, further research to optimize and standardize cryopreservation is necessary; as well as to improve methods of searching for malignant cells and revascularizing the grafted tissue.

Keywords

Ovarian Tissue Cryopreservation; Fertility preservation; Cancer

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos.....	v
Prefácio.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice.....	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Criopreservação e transplante de tecido ovárico: a técnica	3
1.2.1. Métodos de criopreservação: congelamento lento vs vitrificação	3
1.2.2. Transplante de tecido ovárico	5
1.2.3. Risco de reimplantação de células malignas	7
1.3. Indicações para a criopreservação de tecido ovárico	9
1.4. Objetivos.....	10
Capítulo 2. Metodologia	13
Capítulo 3. Resultados	15
3.1 Criopreservação de tecido ovárico em mulheres adultas	15
3.1.1 Interesse para a preservação da fertilidade	15
3.1.1.1. Opções técnicas para a preservação da fertilidade	16
3.1.1.2 Eficácia reprodutora da criopreservação e reimplantação de tecido ovárico	17
3.1.2 Eficácia hormonal da reimplantação de tecido ovárico	20
3.1.2.1 O uso de tecido ovárico criopreservado como THS endógena.....	21
3.1.2.1.1 Duração da atividade ovárica após o transplante	21
3.1.2.1.2 Transplante heterotópico para restaurar exclusivamente a função endócrina	22
3.1.2.1.3 A THS baseada na CTO é superior à THS farmacológica? Os obstáculos, as dúvidas.....	22
3.2. Criopreservação de tecido ovárico em adolescentes	23
3.2.1 O cancro em adolescentes.....	23
3.2.2 Preservação da fertilidade.....	24
3.2.3 THS farmacológica vs THS endógena	26
3.3 Criopreservação de tecido ovárico na pré-puberdade.....	27
3.3.1. O cancro nestas idades - contextualização.....	27
3.3.2. Preservação da fertilidade.....	28

3.3.3. Indução da puberdade	30
Capítulo 4. Discussão	33
Capítulo 5. Conclusão	37
Referências Bibliográficas	39

Lista de Figuras

Figura 1 - A criopreservação de tecido ovárico no contexto da preservação da fertilidade.(29)	
.....	17

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação entre o transplante ortotópico e heterotópico de tecido ovárico (traduzido e adaptado de Ladanyi <i>et al.</i> (16)). FIV: fertilização <i>in vitro</i>	6
Tabela 2 - Critérios de seleção de Edinburgh (adaptado de Wallace <i>et al.</i> (33))	9

Lista de Acrónimos

ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ASRM	<i>American Society of Reproductive Medicine</i>
CFA	Contagem de folículos antrais
CPF	Centro de Preservação da Fertilidade
CTO	Criopreservação de tecido ovárico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESMO	<i>European Society of Medical Oncology</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormona de estimulação folicular (Follicle-stimulating hormone)
Gy	Gray
HAM	Hormona anti-mulleriana
HHO	Hipotálamo-Hipófise-Ovário
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IOP	Insuficiência Ovária Prematura
LH	Hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
THS	Terapia Hormonal de Substituição
vs	<i>versus</i>
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Capítulo 1. Introdução

1.1. Contextualização

A investigação em oncologia tem proporcionado significativos avanços ao nível do diagnóstico precoce e tratamento da doença oncológica, melhorando as taxas de remissão e conduzindo a um aumento do número de sobreviventes de cancro em idade pré-púbere e reprodutiva.(1) Esta nova realidade torna a qualidade de vida do sobrevivente um aspecto fulcral durante todo o processo de tratamento e seguimento.

Os tratamentos oncológicos podem ser tóxicos para os órgãos reprodutivos e conduzir a Insuficiência Ovárica Prematura (IOP) e, subsequentemente, a infertilidade. O impacto do tratamento oncológico na fertilidade depende da idade da doente ao diagnóstico e do tipo de tratamento, assim como da dose e duração do mesmo. É difícil prever quais serão os casos que vão culminar em IOP, no entanto, sabe-se que o risco é mais elevado com quimioterapia baseada em agentes alquilantes, altas doses de irradiação cranioespinhal capaz de lesar o eixo hipotálamo-hipófise, e irradiação da área abdomino-pélvica, incluindo a irradiação corporal total.(2-5)

Os fármacos anti-neoplásicos podem reduzir o número de folículos, conduzindo a IOP, traduzida por uma amenorreia secundária e, conseqüentemente, menopausa precoce.(6) No caso de raparigas pré-puberes, ocorre uma amenorreia primária. De acordo com o potencial de gonadotoxicidade, esses fármacos são classificados em baixo, intermédio e alto risco.(3) No que diz respeito à radioterapia, pode ocorrer lesão folicular, com elevado risco de amenorreia prolongada, quando as áreas abdominal e/ou pélvica são expostas a uma dose de radiação superior a 6 Gy em mulheres adultas, superior a 10 Gy em jovens pós-púberes e superior a 15 Gy em pré-púberes.(3) Uma vez que a reserva folicular diminui com a idade, mulheres mais velhas têm maior risco de insuficiência ovárica permanente e mais precoce, e doses progressivamente mais pequenas tendem a causar maior disfunção à medida que a idade aumenta.(2,3,5-7)

A falência ovárica induzida pelo tratamento anti-neoplásico está associada, não só ao risco de infertilidade, como também à disrupção endócrina.(8) As doentes com IOP podem desenvolver sintomas caraterísticos da menopausa e estão em maior risco de diminuição da densidade mineral óssea, com subseqüente desenvolvimento de osteoporose, desenvolvimento precoce de doença cardiovascular, disfunção sexual, ganho de peso e diminuição da qualidade de vida.(9)

Os médicos que acompanham os doentes com diagnóstico de cancro devem estar a par dos efeitos adversos do tratamento na fertilidade e, caso a gonadotoxicidade seja inevitável, devem referenciá-los a especialistas na área da preservação da fertilidade.(5) Este é um

assunto fundamental na gestão da qualidade de vida do doente com doença oncológica e tem vindo a ganhar relevância entre as comunidades médica e científica.(8) As *guidelines* clínicas da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e da *European Society for Medical Oncology* (ESMO) recomendam que os médicos devem discutir com os seus doentes as opções de preservação da fertilidade o mais brevemente possível após o estabelecimento do diagnóstico e, preferencialmente, antes do início do tratamento. Ainda assim, continua a ser um assunto pouco abordado e discutido na prática clínica. (10-12)

Os métodos mais amplamente usados na preservação da fertilidade em mulheres são a criopreservação de embriões e oócitos. Tradicionalmente, ambos requeriam um período de 2 ou mais semanas de estimulação ovárica e dependiam da fase menstrual.(13) Atualmente, existem protocolos que podem ser iniciados quer na fase folicular, quer na fase lútea, o que reduz o atraso no início do tratamento anti-neoplásico.(10,13) No caso de raparigas pré-púberes, sem um eixo Hipotálamo-Hipófise-Ovário (HHO) maduro e funcional, a estimulação ovárica não pode fazer-se e, no caso de doentes com cancro da mama ou ginecológico sensível aos estrogénios e de doentes em risco de síndrome de hiperestimulação ovárica, a técnica pode não ser empregue pelos riscos que acarreta.(10,13-15) Por outro lado, a criopreservação de embriões não é possível em mulheres sem um parceiro homem, que não queiram usar esperma de dador ou que tenham objeções religiosas e/ou éticas para o congelamento de embriões.(10,14) Nestas doentes, caso exista tempo antes do início do tratamento e a possibilidade de fazer estimulação ovárica, pode fazer-se criopreservação de oócitos, técnica que deixou de ser considerada experimental pela *American Society of Reproductive Medicine* (ASRM) em 2012.(5)

Por sua vez, a criopreservação de tecido ovárico (CTO) e o seu posterior transplante é uma técnica alternativa promissora para doentes pré-púberes e para doentes que não possam passar por um processo de estimulação ovárica ou que não possam adiar o início do tratamento, uma vez que, o tecido pode ser recolhido durante um procedimento laparoscópico, em qualquer momento, independentemente da fase do ciclo menstrual e da idade da doente.(5,13,14) Tanto a ASRM como a ESMO consideram, ainda, que a CTO é uma técnica experimental. Aquando da publicação do *update* das *guidelines* da ASCO também se considerava a CTO experimental, no entanto, ressalva-se que com as evidências crescentes este estatuto pode ser reconsiderado num futuro próximo.(5,10,11)

A CTO envolve a remoção da totalidade ou de “pedaços” do córtex ovárico, antes do início do tratamento anti-neoplásico. O tecido é criopreservado, descongelado e transplantado de novo para a paciente, assim que esta esteja livre da doença. O tecido pode ser transplantado de forma ortotópica, para o seu local nativo ou para o ovário contralateral e atrofico, ou de forma heterotópica para o tecido subcutâneo do antebraço ou da parede abdominal.(13) Em alguns tipos de cancros, nomeadamente, leucemias, existe o risco de reintroduzir células malignas com o transplante.(13)

A CTO e a sua posterior reimplantação podem ser uma alternativa não só para a preservação da fertilidade, como também para a restauração da função endócrina, permitindo a produção de hormonas endógenas. Assim, pode ser potencialmente usada para a indução da puberdade em doentes pré-puberes, e para adiar o desenvolvimento dos efeitos deletérios de uma menopausa precoce.(8,15,16)

1.2. Criopreservação e transplante de tecido ovárico: a técnica

1.2.1. Métodos de criopreservação: congelamento lento vs vitrificação

Os folículos primordiais são a unidade básica da fertilidade feminina e representam cerca de 90% da reserva folicular ovárica. Apesar de o tecido ovárico recolhido conter outros tipos de folículos, são os primordiais que se têm em conta para a criopreservação. Estes folículos, mais resistentes ao dano provocado pelo frio, localizam-se no córtex ovárico, perto da superfície epitelial.(14) A recolha do tecido ovárico deve ser efetuada de forma cuidadosa para evitar o mínimo dano do tecido e a sua preparação envolve a separação do córtex ovárico da medula, o que facilita a penetração de crioprotetores no tecido cortical e permite o restabelecimento da perfusão sanguínea e da atividade folicular após o enxerto.(17) Podem aplicar-se diferentes métodos de criopreservação. A técnica de congelamento lento tem sido a mais usada e consiste na preservação do tecido em nitrogénio líquido. A vitrificação é um método alternativo, mas é mais usado na criopreservação de embriões.(14)

A criopreservação é um processo que permite conservar células, tecidos e órgãos através da diminuição da temperatura com o objetivo de suspender o metabolismo celular. Apesar de permitir o armazenamento durante um largo período de tempo, a diminuição e o posterior aumento da temperatura no processo de congelamento e aquecimento podem provocar dano nas células, uma vez que as expõe a forças térmicas, químicas e mecânicas. O tipo de lesão pode variar de acordo com a técnica aplicada.(18)

A taxa de arrefecimento dita a extensão de movimento da água e a nucleação do gelo, com uma alta velocidade de arrefecimento a atingir um grau menor de desidratação/concentração de solutos do que velocidades menores. Assim, velocidades superiores são mais benéficas para células que têm tendência a desidratar rapidamente ou que são mais sensíveis a concentrações elevadas de soluto, enquanto velocidades de arrefecimento menores são convencionalmente aplicadas a oócitos. O gelo que se forma durante o congelamento tem potencial para causar lesão física e mecânica, uma vez que ocupa um volume maior que a água e que as dimensões dos cristais de gelo se vão alterando durante os processos de arrefecimento e aquecimento. O tecido ovárico contém vários tipos de células que diferem naquele que seria o crioprotetor mais adequado e nas necessidades para congelamento.(8,15,17,19)

No método de congelamento lento, o tecido é congelado de forma lenta até cerca de $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apesar do potencial risco de formação de cristais de gelo que podem lesar as células, não se têm verificado alterações significativas do tecido.(8,15) A adição de crioprotetores permite proteger a célula do dano causado pela formação de cristais e pela hipertonicidade do processo. No entanto, crioprotetores permeáveis podem também provocar mudanças de volume celular, que podem levar igualmente a dano celular. Além disso, os crioprotetores podem ser tóxicos. O ideal é otimizar a quantidade, de forma a evitar o dano celular pela toxicidade e pelas variações osmóticas, atingindo um nível de permeabilidade suficiente para evitar o dano causado pelo congelamento.(8) Os métodos de congelamento lento usam concentrações baixas de crioprotetores.(18) Os protocolos aplicados no método de congelamento lento são baseados no protocolo de Gosden *et al.*(20) Por outro lado, em alguns países foram criados programas nacionais centralizados em criobancos, com protocolos próprios. O exemplo mais conhecido é o da FertiPROTEKT que inclui países de língua alemã: Alemanha, Suíça e Áustria.(21) Apesar de a técnica de congelamento lento ser eficaz, consome tempo e recursos. Assim, torna-se necessário encontrar métodos alternativos como a vitrificação.(18)

A vitrificação consiste na solidificação instantânea da solução devido ao aumento da viscosidade durante o arrefecimento com concentrações de crioprotetores superiores às usadas no congelamento lento.(15) É um método mais recente e com poucos resultados até ao momento. Registam-se apenas 2 nascimentos após uso de tecido ovárico criopreservado por este método.(8) Consiste num processo de conversão de um líquido frio num sólido amorfo semelhante ao vidro, evitando a formação de cristais de gelo. É empregue uma velocidade de arrefecimento muito rápida com o uso de uma elevada concentração de crioprotetores. Como já referido, estes, quando empregues em grande quantidade, têm efeitos tóxicos nas células.(8,15,18) De forma a evitá-los, usa-se uma combinação de vários crioprotetores em baixa concentração. Outro fator que influencia a vitrificação é o volume da amostra. O controlo eficiente no equilíbrio de crioprotetores, tendo em conta concentrações, tempo de exposição e temperatura, é possível apenas com a criopreservação de um número pequeno de fragmentos de tecido ovárico.(18,19) Isto ocorre porque fragmentos grandes iriam exigir um equilíbrio mais longo para que a solução de vitrificação penetrasse nas camadas mais internas do tecido, enquanto as células da superfície seriam expostas a concentrações demasiado altas de crioprotetores.(18) A vitrificação é um método rápido (15-30 minutos) e fácil mas, se as taxas de arrefecimento não forem suficientemente rápidas, pode ocorrer cristalização. No entanto, acredita-se que a solução permanece inalterada durante o arrefecimento e aquecimento, estrutural e quimicamente, já que não se formam cristais de gelo.(18) Apesar do crescente grau de popularidade, sobretudo ao nível da preservação de embriões, este método é raramente usado para criopreservar tecido ovárico.(8)

A vitrificação parece oferecer meios rápidos, fáceis e baratos de criopreservar tecido ovárico. No entanto, há ainda muito espaço para a investigação e melhoria dos protocolos que têm sido empiricamente criados ou adaptados de protocolos para embriões ou oócitos.(18) De facto, a maioria das gestações e nascimentos gerados a partir de tecido ovárico criopreservado resultou do uso do método de congelamento lento.(15) E estudos comparativos entre o método de congelamento lento e vitrificação mostram que o primeiro apresenta vantagens em relação ao segundo: maior preservação folicular, maior taxa de proliferação folicular e angiogénese, e menor dano do DNA.(15,19)

1.2.2. Transplante de tecido ovárico

Na maioria dos casos, o objetivo principal da preservação do tecido ovárico é a sua posterior reimplantação na doente após a remissão da doença, de modo a restabelecer o ciclo foliculogénico e a produção hormonal.(14)

O transplante de tecido ovárico pode ser ortotópico ou heterotópico.(8,13,14) O transplante ortotópico implica a colocação do enxerto de tecido cortical no local de origem (ovário), no ovário contralateral ou perto do local natural com condição envolvente semelhante, e portanto, na cavidade pélvica. No caso de inexistência dos dois ovários, pode criar-se uma bolsa peritoneal na cavidade pélvica, de forma faseada: inicialmente induz-se a angiogénese e posteriormente faz-se o transplante de fragmentos de tecido ovárico.(17,22) Já o transplante heterotópico envolve a aplicação do tecido ovárico fora da sua localização habitual, e portanto, ectopicamente, nomeadamente no antebraço, parede abdominal, espaço subperitoneal ou parede torácica.(14) Na tabela 1, comparam-se as duas formas de transplante.

A sobrevivência do enxerto tem sido relatada com sucesso em ambos os tipos de transplante. No caso de um transplante ortotópico, existe a possibilidade de ocorrer uma gravidez por concepção natural e espontânea, se as trompas de Falópio estiverem intactas. Já o transplante heterotópico requer a recolha de oócitos e a sua fertilização *in vitro*. Praticamente todas as gravidezes após CTO ocorreram em doentes submetidas a transplante ortotópico, sugerindo a sua superioridade na restauração da fertilidade.(14,22)

A reimplantação heterotópica tem a vantagem de não requerer um procedimento invasivo e de proporcionar um acesso fácil ao enxerto, com fácil monitorização do desenvolvimento folicular e colheita de oócitos, assim como fácil deteção de recidiva oncológica. Além disso, apresenta melhor custo-efetividade, caso o procedimento seja repetido mais do que uma vez. No entanto, o desenvolvimento folicular pode ser afetado pelo ambiente envolvente, que pode não oferecer condições ótimas.(3)

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Tabela 1 - Comparação entre o transplante ortotópico e heterotópico de tecido ovárico (traduzido e adaptado de Ladanyi *et al.* (16)). FIV: fertilização *in vitro*.

	Ortotópico	Heterotópico
Localização	Ovário remanescente ou contralateral, fossa ovárica	Parede abdominal subcutânea, antebraço, parede torácica
Possibilidade de concepção natural	Sim	Não. Requer FIV
Abordagem cirúrgica	Mais complexo. Invasivo	Mais simples e menos invasivo
Vantagens	Permite gravidez espontânea Ambiente favorável ao desenvolvimento folicular	Procedimento mais fácil Possibilidade de repetição do procedimento Monitorização folicular e colheita de oócitos com maior facilidade Acesso mais fácil para vigilância de potencial recorrência de malignidade Possível no caso de adesões pélvicas Método preferido para restauração da função ovárica (não fertilidade)
Desvantagens	Risco de reintrodução de células malignas Risco de isquemia pós-transplante	Risco de reintrodução de células malignas Risco de isquemia pós-transplante Requer FIV (para gravidez) Ambiente menos favorável para o desenvolvimento folicular
Evidência de restauração da função endócrina	Existe. Função ovárica restaurada cerca de 4 meses após o transplante. Tecido funcional durante tempo variável, mas possível durante aproximadamente 7 anos	
Nascimentos documentados	Mais de 130	Sim. 2 nascimentos

No que diz respeito ao meio de abordagem para o acesso cirúrgico, a técnica laparoscópica é a mais aceite e utilizada.(17) Mas técnicas como a cirurgia robótica e a laparotomia também podem ser utilizadas.(23)

O intervalo médio de tempo até à restauração da função do tecido enxertado é cerca de 4 meses após o transplante, pelo que, pode estar recomendada a reposição hormonal para tentar baixar os níveis elevados de FSH, de modo a evitar a sobre-estimulação do enxerto e sua exaustão.(17)

O sucesso do enxerto também depende largamente da extensão e da velocidade de perfusão vascular. Geralmente, dado o tamanho dos fragmentos de tecido ovárico preservados, não há vasos sanguíneos distinguíveis para posterior reanastomose na fase de transplante, pelo que

há exposição a lesão isquêmica durante a fase inicial, até que sejam totalmente revascularizados. Dolmans *et al.* foi o primeiro grupo a mostrar que o período de hipóxia pode durar até 5 a 7 dias.(24) Durante este período, a perda de folículos pode superar os 60%, levando a uma massiva ativação folicular e, conseqüentemente, à sua exaustão. Desta forma, a melhoria no processo de revascularização é crucial para a sobrevivência folicular e, conseqüentemente, para a eficiência do transplante. Nesse sentido, têm sido conduzidos muitos estudos que sugerem abordagens que incluem o uso de fatores angiogênicos, anti-apoptóticos e anti-oxidantes e o recurso a células estaminais derivadas de tecido adiposo.(24,25) Outra técnica promissora consiste no transplante do ovário inteiro e inclui a anastomose do pedículo vascular, no entanto, apresenta algumas limitações, nomeadamente, o risco de trombose intravascular e a possibilidade de não permitir a penetração eficaz das soluções de criopreservação e aquecimento. Shehata apresentou uma técnica inovadora, com o objetivo de superar estes problemas, que inclui a cateterização do pedículo vascular e a perfusão do ovário *ex vivo*, e à qual deu o nome de *modelo Shehata*.(26)

1.2.3. Risco de reimplantação de células malignas

Alguns tumores têm a capacidade de metastizar e invadir o ovário. Uma vez que, na maioria das vezes, a recolha de tecido ovárico para criopreservar é feita antes de iniciar o tratamento anti-neoplásico, o risco de reimplantação de células malignas com o transplante do tecido preservado é alvo de preocupação.(22,27)

Atualmente, não existem métodos que detetem com grau de certeza a existência de células malignas no tecido a transplantar. Há vários métodos que têm sido aplicados (xenotransplante em ratinhos imunodeprimidos, métodos biológicos moleculares e imunohistoquímicos) mas nenhum é completamente efetivo.(28) Na maioria dos casos, cerca de um terço a metade do tecido cortical ovárico preservado é transplantado, o que torna impossível analisar todo o tecido na pesquisa de células malignas. Além disso, os testes são todos destrutivos e o tecido analisado não é transplantado, pelo que os fragmentos que vão ser efetivamente transplantados não são totalmente analisados.(29)

O risco de reintrodução de células malignas parece ser superior em malignidades hematológicas, como a leucemia, em comparação com tumores sólidos, como a neoplasia da mama.(29) Assim, consoante o tipo de cancro que a doente apresenta, a realização de transplante de tecido ovárico pode apresentar maior ou menor grau de segurança. Os tumores são normalmente classificados em risco baixo, moderado e alto de envolvimento ovárico.(24,27)

A leucemia apresenta alto risco de recorrência, uma vez que há células malignas em circulação. O uso de CTO com posterior reimplantação é assunto de controvérsia nestes casos, e é, muitas vezes, evitado. A análise do tecido com recurso a PCR identifica células malignas

em 75% dos casos, e tem levado à adoção de uma abordagem restritiva no que diz respeito ao transplante. No entanto, um resultado positivo na PCR não indica necessariamente que ocorrerá reimplantação da malignidade e recorrência da doença.(16,30) Tem sido proposto que a quimioterapia seja iniciada antes da colheita de tecido ovárico, de modo a reduzir o risco de células malignas circulantes, sem comprometer excessivamente a função ovárica.(29)

Shapira *et al.* relataram o primeiro caso de um nascimento após CTO seguida de auto-transplante em sobrevivente de leucemia. Trata-se de uma jovem de 19 anos diagnosticada com leucemia mielóide aguda, que foi sujeita a ooforectomia, quando estava em remissão completa da doença e antes de iniciar terapia mieloablativa para posterior transplante de medula óssea. Cerca de 11 anos depois, e depois de expresso o desejo de engravidar, o tecido ovárico criopreservado foi sujeito a análise para pesquisa de células cancerosas, incluindo microscopia, análise citogenética, sequenciação genómica e o xenotransplante. A análise não encontrou células malignas, ainda assim, não foi possível excluir por completo a possibilidade de existirem células leucémicas no tecido. A mulher, com 32 anos e em remissão total da doença, decidiu prosseguir e foi sujeita à reimplantação de fragmentos de tecido ovárico. Mais tarde, dois oócitos foram aspirados, fertilizados e, de novo, transferidos, resultando numa gravidez que culminou com o nascimento de um bebé saudável. Shapira *et al.* revelam ainda que, 28 meses depois do transplante, a mulher, livre da doença, voltou a engravidar, desta vez de forma espontânea.(30)

No caso do cancro da mama, podem existir micrometástases ováricas, apesar de esta não ser uma localização habitual. De facto, o desenvolvimento de um tumor ovárico após o diagnóstico de cancro da mama, é mais provavelmente um tumor primário do ovário do que uma metástase do cancro da mama. Rosendahl *et al.* referem que, numa amostra de 135 doentes com cancro da mama, a análise histológica do tecido ovárico não revelou evidência de envolvimento maligno e, das 4 mulheres a quem foi transplantado o tecido, nenhuma sofreu recidiva decorrente do enxerto. Estes resultados vêm confirmar o baixo risco de metastização ovárica por cancro da mama.(27)

Gellert *et al.* identificaram a ocorrência de 9 recidivas num total de 230 transplantes de tecido ovárico realizados em mulheres que tinham sido antes diagnosticadas com cancro e que, entretanto, entraram em remissão. No entanto, nenhuma destas recorrências pareceu estar ligada à reimplantação de tecido ovárico. Em dois desses casos, tratou-se de recidiva local do cancro da mama. Outro caso foi de uma recidiva de Sarcoma de Ewing no hemitórax.(28) Algumas mulheres foram sujeitas a segundo e terceiro transplantes, sendo que algumas acabaram por reimplantar todo o tecido preservado, e a taxa de recidiva não foi afetada. Desta forma, e apesar da subnotificação de casos de recidiva, não parece haver evidência que sugira que o método pode levar à reimplantação de células malignas.(31)

De uma forma geral, o transplante de tecido ovárico pode potencialmente conduzir à reintrodução de células malignas. No entanto, na sua globalidade, o risco é baixo. Em casos em que o risco de reimplantação de malignidade parece ser maior, como nas leucemias, é fulcral a realização de um “*follow-up*” apertado.(27)

Nos casos em que se considera que o risco de reimplantação é alto, pode pensar-se em abordagens alternativas, que se encontram ainda em estudo. Uma opção consiste em isolar folículos primordiais e promover a sua maturação *in vitro*. Outra opção promissora é a criação de um ovário artificial. Os folículos primordiais são isolados e encapsulados numa matriz que permite o seu desenvolvimento num ambiente semelhante ao ovárico.(24,29)

1.3. Indicações para a criopreservação de tecido ovárico

As indicações mais frequentes para CTO são as doenças malignas hematológicas, nomeadamente o linfoma de Hodgkin e a leucemia, seguidas pelo cancro da mama. Além das condições oncológicas, o método também pode ser oferecido em casos benignos e doenças sistémicas em que haja risco de insuficiência ovárica permanente. São exemplos disso a síndrome de Turner, a galactosemia e a endometriose.(24)

Desenvolvidos e estabelecidos numa discussão multidisciplinar em 1996, e revistos em 2000, os critérios de seleção de Edinburgo (tabela 2) recomendam que o autotransplante de tecido ovárico após a sua criopreservação deve ser oferecido a mulheres jovens, adolescentes e meninas pré-púberes que vão ser submetidas a tratamentos gonadotóxicos, apenas nos casos onde há possibilidade realística de sobrevivência de no mínimo 5 anos, risco de perda de fertilidade superior a 50%, baixo ou nenhum risco de reintrodução de células malignas, serologias negativas para doenças passíveis de transmissão hematológica, e consentimento informado assinado.(32,33)

Tabela 2 - Critérios de seleção de Edinburgo (adaptado de Wallace *et al.* (33))

<i>Critérios de Edinburgo</i>
<ul style="list-style-type: none">• Idade <35 anos• Sem quimioterapia ou radioterapia prévia se ≥ 15 anos (mas quimioterapia ligeira não-gonadotóxica é aceitável se <15 anos)• Sobrevida estimada > 5 anos• Alto risco de insuficiência ovárica prematura (>50%)• Consentimento informado• Serologias negativas para HIV, sífilis e hepatite B• Não grávida

Num estudo de coorte retrospectivo, Wallace *et al.* avaliaram o uso dos critérios de Edinburgh para a CTO em meninas e jovens de idade inferior a 18 anos com cancro para determinar se a técnica estaria a ser oferecida a quem apresenta maior risco de insuficiência ovárica prematura. Concluíram que, apesar de os critérios estarem sobretudo validados para mulheres adultas, podem ser aplicados em idades mais jovens, já que conseguem identificar de forma correta as raparigas em maior risco.(33)

A idade cronológica nem sempre corresponde à idade biológica, e a avaliação da reserva ovárica é de extrema importância. Esta pode ser feita mediante marcadores hormonais, designadamente FSH, estradiol, inibina B, hormona anti-mulleriana (HAM), e marcadores ecográficos como o volume ovárico médio e a contagem de folículos antrais (CFA). As amplas flutuações da FSH, inibina B e estradiol, e a variação de volume ovárico durante o ciclo menstrual limitam a sua utilização. Por sua vez, a HAM é uma hormona ciclo-independente e não sofre variações significativas. No que diz respeito à CFA, esta parece ser o melhor indicador da reserva ovárica, com mínimas variações durante o ciclo menstrual, no entanto, o facto de ser uma medida subjetiva pode conduzir a viés considerável. Assim, Paradisi *et al.* recomendam a avaliação da HAM e a CFA na seleção de possíveis candidatas a CTO. Estabelecem que mulheres no percentil 25 (HAM 1,2-1,6ng/ml e CFA de 10 folículos) têm indicação para CTO. Entre o percentil 5 e 25 da HAM e CFA, a idade cronológica é o fator determinante e mulheres até aos 35 anos têm indicação para a técnica. Mulheres cujos valores se encontrem no percentil 5 ou inferior (HAM 0,31-0,40 ng/mL e CFA de 5 folículos) devem ser excluídas, independentemente da idade.(34)

Uma vez que a CTO não serve apenas para preservar a fertilidade, mas também para restaurar o estado hormonal, novas possíveis indicações têm sido debatidas, nomeadamente a indução da puberdade em meninas pré-púberes e o seu uso como terapia hormonal de substituição (THS) para protelar os sintomas e efeitos adversos negativos da menopausa precoce causada pela insuficiência ovárica prematura.(35)

1.4. Objetivos

O objetivo principal desta dissertação é analisar as possíveis aplicações clínicas do tecido ovárico criopreservado. Como objetivos específicos salientam-se:

- Contextualizar a técnica de CTO e definir quando pode ser uma opção a considerar em doentes oncológicas, tendo em conta a faixa etária e a sua fase do desenvolvimento;
- Avaliar a eficácia, as taxas de sucesso, as vantagens e desvantagens da CTO na preservação da fertilidade;

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

- Compreender a capacidade de restauração da função hormonal, para além da reprodutiva, e explorar os seus possíveis usos, nomeadamente, na indução da puberdade em meninas pré-púberes e no atraso da menopausa em mulheres com falência ovárica prematura.

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Capítulo 2. Metodologia

Foi realizada uma ampla pesquisa bibliográfica, com recurso à base de dados *PubMed*. A pesquisa foi efetuada de 9 de setembro de 2019 a 30 de novembro de 2019, e foram usadas as seguintes palavras-chave: “*ovarian tissue cryopreservation*”, “*cryopreservation of ovarian tissue*”, “*fertility preservation*” e “*cancer*”. Os artigos foram selecionados com base na relevância do conteúdo, data de publicação (artigos publicados nos últimos 5 anos), idioma (inglês e português) e tipo de artigo (revisões, artigos científicos originais, ensaios clínicos e meta-análises).

Sempre que nos artigos selecionados fosse feita referência a outros artigos considerados relevantes, esses foram também considerados. Adicionalmente, foram também consultadas guidelines, comunicados e pareceres da *American Society of Clinical Oncology*, *American Society of Reproductive Medicine*, *European Society of Medical Oncology* e *National Comprehensive Cancer Network*.

Após a análise do material recolhido, foi efetuada uma revisão descritiva.

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Capítulo 3. Resultados

3.1 Criopreservação de tecido ovárico em mulheres adultas

3.1.1 Interesse para a preservação da fertilidade

A quimioterapia e a radioterapia (ou uma combinação de ambas) são altamente tóxicas para as gónadas, colocando raparigas e mulheres em idade fértil em risco de insuficiência ovárica, devido a depleção folicular. Os agentes alquilantes como a ciclofosfamida são especialmente gonadotóxicos.(3)

A infertilidade associada ao tratamento oncológico pode estar associada a baixa auto-estima e levar a *stress* psicossocial. Assim, devem ser feitos esforços com o intuito de oferecer oportunidades para preservar o potencial fértil das mulheres com cancro. Este assunto tem vindo a ganhar relevância a nível mundial e muitas sociedades reconhecem a preservação da fertilidade como um assunto importante na qualidade de vida dos adultos sobreviventes de doença oncológica.(2,5,10,11)

A ASCO e a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) defendem que as opções de fertilidade devem ser discutidas com todas as doentes antes de iniciar os tratamentos e que, caso seja necessário, os profissionais de saúde devem iniciar a referência para centros especializados na preservação da fertilidade o mais rapidamente possível. (2,10) No entanto, o conhecimento dos médicos acerca das opções na preservação da fertilidade e da sua eficácia parece ser uma das barreiras na comunicação e aconselhamento.(3)

Os tratamentos anti-neoplásicos diminuem a reserva de folículos primordiais e podem causar atrofia do ovário. A extensão do dano é altamente variável entre mulheres e é difícil prever qual será o real impacto da terapêutica na fertilidade. Em alguns casos a mulher pode mesmo tornar-se infértil, noutros pode ocorrer apenas dano parcial do ovário e pode haver resolução espontânea.(24) A probabilidade de uma mulher desenvolver insuficiência ovárica é influenciada por muitos fatores, nomeadamente a reserva ovárica, a idade no momento do tratamento, o tipo de terapêutica, as suas doses e a duração da exposição. Assim, justifica-se que o aconselhamento para a preservação da fertilidade seja oferecido a quem faz tratamento. Por outro lado, a reserva ovárica varia de mulher para mulher, e portanto, torna-se fundamental que haja uma avaliação e aconselhamento personalizados.(24)

As indicações para a preservação da fertilidade não se baseiam apenas em condições oncológicas, principal foco desta revisão, mas também em condições não oncológicas ou benignas, e ainda, em razões pessoais.(24)

3.1.1.1. Opções técnicas para a preservação da fertilidade

As opções para a preservação da fertilidade em mulheres têm em conta a idade, a presença de parceiro, o método de tratamento e a possibilidade, ou não, de adiar o início do tratamento (figura 1). Os métodos mais estabelecidos são a criopreservação de oócitos e embriões, a transposição ovárica e a cirurgia ginecológica conservativa. (2,10)

Tanto a criopreservação de oócitos, como a de embriões só podem ser propostas a pós-púberes e requerem um período de aproximadamente duas semanas de estimulação ovárica. Assim, caso seja inadequado adiar o início do tratamento, é recomendado não esperar por um novo ciclo menstrual para iniciar o protocolo de estimulação clássica. E deve iniciar-se um protocolo de estimulação “random” que pode ser feito em fase lútea ou folicular e permite ultrapassar o obstáculo do tempo.(3,24) Ainda assim, é um processo que leva tempo e que pode ser comprometido caso seja urgente iniciar-se o tratamento oncológico.

A criopreservação de embriões é a técnica mais estudada e tem sido amplamente utilizada a nível mundial, sendo considerada a primeira linha. Estima-se que mais de meio milhão de bebés tenham sido concebidos com recurso ao uso de embriões criopreservados. Uma das principais desvantagens deste método é a necessidade da existência de um parceiro, e caso exista, a preservação de embriões que só serão usados a longo prazo.(3)

A criopreservação de oócitos também tem vindo a ganhar terreno ao longo dos anos e foi aceite como método estabelecido em 2013 nas guidelines da ASCO. É principalmente adequada para mulheres que não têm parceiro, que não querem recorrer a dador de esperma, ou que tenham objeções éticas e/ou religiosas para o congelamento de embriões.(24) Com a melhoria das técnicas de congelamento, nomeadamente com as técnicas de vitrificação, este método tem obtido melhores resultados, estimando-se que a taxa de gravidezes clínicas se situe em torno dos 55%. (3) Ainda assim, a ASRM estima que a taxa de gravidez/oócito se situe entre os 4,5% e 12%, o que significa que, em média, são necessários pelo menos dez oócitos para gerar uma gravidez.(24)

A transposição ovárica, ou ooforopexia, é uma técnica em que os ovários são fixados cirurgicamente numa zona mais longe do campo de irradiação, idealmente a mais de 3 centímetros do bordo superior do campo a irradiar. A técnica não é muito eficaz porque não confere proteção para o tratamento quimioterápico e os ovários podem migrar para o local de origem.(10)

A CTO é um método considerado ainda experimental pela maioria das sociedades, nomeadamente pela ASCO, ESMO e NCCN. No entanto, em países como a Dinamarca, Israel e Noruega já é uma técnica aceite e estabelecida, sendo prática corrente.(24)

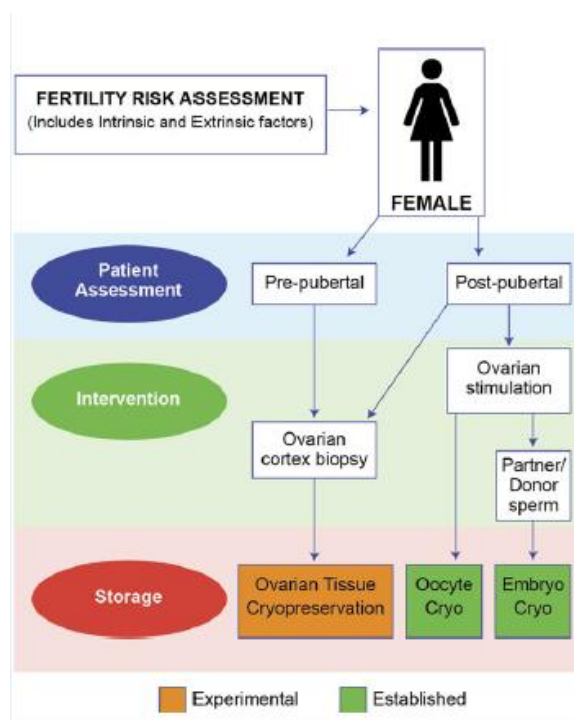


Figura 1 - A criopreservação de tecido ovárico no contexto da preservação da fertilidade.(29)

Entre as principais vantagens desta técnica está o facto de não precisar de um dador de esperma nem de estimulação ovárica, duas das principais barreiras à criopreservação de embriões. A CTO é a única opção disponível para raparigas pré-púberes e para casos em que não se pode atrasar o início do tratamento. Ao contrário do que acontece com o congelamento de oócitos ou embriões, a CTO permite preservar centenas de folículos primordiais numa só vez. E oferece a possibilidade de conceção quer *in vivo*, quer *in vitro*. No entanto, o procedimento levanta algumas preocupações e os principais desafios da CTO são após a reimplantação do tecido, nomeadamente o restabelecimento da vascularização, a longevidade do tecido enxertado e o risco de reimplantação de células malignas.(17,24)

3.1.1.2 Eficácia reprodutora da criopreservação e reimplantação de tecido ovárico

Apesar de a CTO ainda ser uma técnica considerada experimental, tem sido amplamente colocada em prática em alguns países, tal como já referido. No entanto, é difícil avaliar a eficácia da técnica e recolher dados sobre o seu sucesso na maioria dos centros e redes dedicados à sua prática. Amorim *et al.* defendem que esta limitação se deve a três fatores em particular.(17) Em primeiro lugar, existe um longo intervalo de tempo entre a recolha do tecido ovárico para criopreservação e o seu transplante. E sabe-se que o número de recolhas é bastante superior àquele que já foi efetivamente reimplantado.(28) Em segundo lugar, a população em que se aplica a CTO é muito heterogénea, no que diz respeito à indicação para a realização da técnica (oncológicas e não-oncológicas), à idade das mulheres, à sua reserva

ovárica e às co-morbilidades que apresentam. De facto, acredita-se que a gravidez em sobreviventes de cancro é mais difícil do que em mulheres saudáveis da mesma idade, devendo ser considerada como tendo alto risco obstétrico.(28) De igual forma, não existe consenso nos protocolos específicos de CTO e de transplante, o que faz das técnicas igualmente heterogêneas. Por último, e muito provavelmente em consequência dos pontos supracitados, não há relatos das taxas de sucesso em muitos centros, nem registo mundial dos transplantes efetuados.(17)

Efetivamente, são vários os fatores que impossibilitam o acesso ao cálculo da verdadeira taxa de eficácia. Algumas mulheres só querem sentir-se mulheres jovens normais e evitar sintomas da menopausa. Outras, no decurso do tratamento oncológico, podem ter sido histerectomizadas e, na impossibilidade de uma conceção natural, podem recorrer a barrigas de aluguer (algo não permitido em Portugal). Por outro lado, em mulheres que apresentem função ovárica residual após o insulto gonadotóxico, é difícil saber se a gravidez, caso tenha sido espontânea, se originou de folículos endógenos ou pelo tecido transplantado.(28)

A função ovárica após reimplantação de tecido ovárico pode ser avaliada pelo desenvolvimento folicular, pela recorrência da menstruação e, principalmente, pelas gravidezes conseguidas com sucesso.(17)

Em 2004, Donnez *et al.* relataram o primeiro nascimento após CTO. Uma mulher de 25 anos foi diagnosticada com linfoma de Hodgkin em estágio IV, em 1997. Antes de iniciar o tratamento com quimioterapia, foram colhidas cinco amostras de tecido ovárico para criopreservar. Pouco tempo depois de iniciar a quimioterapia, a doente tornou-se amenorreica e, mais tarde, iniciou THS farmacológica. Quase quatro anos depois, esta foi interrompida devido ao desejo de engravidar expresso pela mulher, agora em remissão da doença. O tecido ovárico foi reimplantado e, cinco meses depois, os ciclos menstruais, a ecografia vaginal e as concentrações hormonais sugeriam a restauração de ciclos ovulatórios regulares. Cerca de onze meses depois do transplante, os níveis de gonadotrofina coriônica humana e a ecografia endovaginal confirmaram a existência de uma gravidez intra-uterina, a qual culminou com o nascimento de uma bebé saudável.(36)

Gellert *et al.* analisaram todas as publicações a nível mundial com *peer-review* sobre mulheres que foram sujeitas a transplante de tecido ovárico após CTO até 2017, incluindo os resultados mais recentes do estudo de coorte dinamarquês, com o objetivo de avaliar a atividade global da CTO e do transplante, no que diz respeito à idade, diagnóstico, resultados no âmbito da fertilidade e eventuais efeitos adversos.(31) O grupo de trabalho constatou que aproximadamente 95% das mulheres apresentou restauração da função endócrina, com intervalo médio entre a realização do transplante e o retorno da função folicular a situar-se em torno dos 4 meses. Foram feitos mais de 360 transplantes em 318 mulheres, em, pelo menos, 21 países. E estima-se que este número seja superior, dada a elevada taxa de

subnotificação. A maioria dos transplantes foram ortotópicos e 170 das mulheres transplantadas queriam restaurar a fertilidade, com o intuito de engravidar. Destas, 95 engravidaram perfazendo um total de 131 gravidezes, da qual resultaram 87 nascimentos (e um total de 93 crianças, dado que 6 gravidezes eram gemelares). Cerca de metade das gravidezes foram atingidas de forma espontânea, e aproximadamente 84% dessas mulheres estavam na menopausa antes do transplante e da concepção. De acordo com os dados disponíveis da maioria destes nascimentos, não se verificaram alterações no peso à nascença nem da idade gestacional, comparativamente com gravidezes normais. Apenas uma das crianças nasceu com uma anormalidade cromossómica, no entanto, tratava-se de um caso com disposição familiar. Assim, a CTO e o seu transplante não parecem afetar o bem-estar geral das crianças de nascem após recurso a este método.(31) Sabe-se que o risco de anomalias fetais é semelhante ao da população geral e ronda os 1-2%. (37)

Há relatos de três casos de mulheres que se encontravam na menopausa antes do transplante de tecido ovárico e que tiveram três bebés saudáveis em três gravidezes consecutivas, cada uma. Na Bélgica, uma mulher foi sujeita a CTO quando tinha 17 anos, devido a um tumor da neuroectoderme, e teve três gestações após um único transplante ortotópico de tecido ovárico.(22) Em Israel, uma mulher de 24 anos engravidou quatro vezes após transplante ortotópico, no entanto, duas gravidezes foram mediante fertilização *in vitro*, tendo uma terminado em aborto.(38) O terceiro caso aconteceu na Dinamarca, onde uma mulher fez CTO aos 27 anos após ser diagnosticada com Sarcoma de Ewing, tendo feito posteriormente reimplantação de seis peças de tecido ovárico. Teve três gravidezes, e o último filho nasceu quase seis anos após o transplante.(39)

Em Portugal, há um caso de CTO relatado na literatura, que teve lugar no Hospital de São João, no Porto. Tratou-se de um caso cuja indicação para a prática da técnica foi inesperada e que foi realizado em condições extremas. Em 2004, uma mulher de 18 anos, previamente saudável, iniciou um quadro de dor pélvica aguda. Após realização de ecografia, foi identificada uma massa heterogénea de 82mm com características sólidas e com zonas quísticas no ovário esquerdo. A paciente foi submetida a cirurgia para ooforectomia e salpingectomia esquerdas e, na inspeção da cavidade pélvica, verificou-se a ausência de ovário direito e a presença de um útero de pequenas dimensões. No exame extemporâneo da peça excisada, foram identificados dois quistos. De forma a preservar a fertilidade, a equipa decidiu criopreservar uma parte intacta do parênquima do ovário excisado. Após a cirurgia, a doente entrou em estado menopáusico, com sintomas vasomotores e amenorreia. Em 2015, após pouco mais de 10 anos, e depois de manifestado o desejo de engravidar, a mulher fez transplante do tecido ovárico para duas localizações ortotópicas: região do ligamento largo esquerdo e fossa ovárica esquerda. Nos meses seguintes, teve ciclos menstruais regulares e os sintomas vasomotores desapareceram. Dada a impossibilidade de concepção natural, foi sujeita a ciclos de estimulação ovárica, com recolha de oócitos e criopreservação de embriões

resultantes.(40) Um outro caso é relatado na imprensa portuguesa. Tratou-se de uma mulher de 28 anos, a quem foi diagnosticado um linfoma, e feita recolha de tecido ovárico para criopreservar. Seis anos depois, esse tecido foi transplantado e a função ovárica foi restaurada.(41)

3.1.2 Eficácia hormonal da reimplantação de tecido ovárico

Apesar de a indicação mais comum para a CTO ser a preservação da fertilidade em raparigas e mulheres com diagnóstico oncológico ou outras condições que ameaçam a reserva ovárica, o facto de o tecido ovárico transplantado permitir restaurar a função hormonal e de a técnica permitir obter oócitos imaturos, tem evocado novas perspetivas de utilização do tecido criopreservado. Entre elas, encontram-se a THS baseada em tecido celular, em detrimento da THS farmacológica, e a possibilidade de o método ser proposto para adiar a menopausa em mulheres saudáveis.(17,35,42)

Há alguns séculos, era muito pouco provável a mulher viver tempo suficiente para experienciar a menopausa. Atualmente, o envelhecimento da população em conjunto com o aumento da esperança média de vida faz com que as mulheres vivam, em média, quase metade da vida num estado pós-menopausa.(17) Em combinação com o aumento da população sobrevivente de cancro que experiencia insuficiência ovárica, estes desenvolvimentos a nível social exigem estratégias preventivas para aliviar e diminuir as consequências a curto e a longo prazo do défice de função ovárica.(35)

A menopausa pode afetar o bem-estar da mulher, e o hipo-estrogenismo decorrente pode conduzir a diversas condições patológicas como a diminuição da densidade mineral óssea e osteoporose, sintomas vasomotores, depressão, incontinência urinária, disfunção sexual, declínio cognitivo, aumento do risco cardiovascular, entre outras.(9)

O uso de THS farmacológica é amplamente aceite para aligeirar os riscos a longo prazo da menopausa e aliviar os sintomas, no entanto, não é isenta de riscos. Em 1992, o *American College of Physicians* recomendou o seu uso para prevenir a doença coronária.(43) No entanto, em 2002, a sua utilização caiu significativamente após a divulgação de resultados de ensaios clínicos randomizados da *Women's Health Initiative* (WHI), que sugeriam um aumento do risco de neoplasia da mama com o uso de THS farmacológica.(44) Estudos posteriores mostraram que os resultados da WHI foram erradamente extrapolados de mulheres numa fase avançada da menopausa (idade superior a 60 anos) para mulheres mais jovens num estado inicial da menopausa (entre os 50 e os 59 anos). Nesta idade, a THS farmacológica apresenta benefícios na prevenção de doenças crónicas como a doença coronária, quando iniciada nos primeiros anos da menopausa. De facto, o momento em que se inicia a THS é crucial, sobretudo no que diz respeito aos benefícios sobre a doença coronária, o declínio cognitivo e a demência.(45,46) Por outro lado, para além do momento em que se inicia, a sua dose e a

frequência da toma devem ser também otimizadas, para que a THS com estrogénios ou combinada (estrogénios e progesterona) compense de forma efetiva o défice hormonal.(35)

Atualmente, sabe-se que a terapia baseada em estrogénios está associada a um alívio sintomático considerável, melhoria na qualidade de vida, com redução da incidência de osteoporose, e é uma medida custo-efetiva com um perfil de segurança e elevado benefício em mulheres com idade inferior a 60 anos.(35,47) Ainda assim, a THS continua a ter riscos associados, nomeadamente o risco tromboembólico, pelo que cada caso deve ser avaliado de forma individual.(48)

3.1.2.1 O uso de tecido ovárico criopreservado como THS endógena

A CTO pode ser usada como método alternativo à THS farmacológica. É uma opção fisiológica para fornecer níveis de hormonas femininas, promovendo o bem-estar e a qualidade de vida da mulher, constituindo, assim, uma técnica de THS baseada na produção endógena de hormonas. Durante a fase folicular, mais de 90% do estradiol é produzido por um único folículo pré-ovulatório, que posteriormente, na fase lútea, se transforma no corpo lúteo secretor de progesterona. A grande maioria os folículos “em repouso” encontram-se na região cortical e os folículos nos vários estádios do desenvolvimento estão na região medular mais interna do ovário. Assim, a arquitetura do ovário permite que, ao isolar a região cortical, que contém cerca de 90% da reserva folicular, se preserve a função do órgão sem ter que o congelar na sua totalidade.(35,47)

Como referido anteriormente, aproximadamente 95% das mulheres recupera a função endócrina ovárica, verificando-se uma elevação da concentração de estradiol e diminuição das concentrações de FSH e LH cerca de quatro a cinco meses após o transplante de tecido ovárico criopreservado.(28,31)

A possibilidade de usar tecido ovárico criopreservado para restaurar a função hormonal ovárica em casos de menopausa induzida e iatrogénica, tem levantado a possibilidade de o usar para a menopausa que ocorre de forma natural em mulheres saudáveis.(42,47,49)

3.1.2.1.1 Duração da atividade ovárica após o transplante

A longevidade do tecido ovárico, após o transplante, é variável, mas algumas mulheres têm mantido a função ovárica durante vários anos.(28) Donnez *et al.* e Andersen *et al.* demonstraram que a atividade ovárica pode persistir cerca de 6 a 7 anos, e, se o transplante for repetido, pode durar até 12 anos.(47,50)

Efetivamente, a duração da função endócrina varia amplamente entre pacientes e não é possível prever com rigor qual será a sua duração.(31,42) Acredita-se que dependa de vários

fatores, nomeadamente, a idade da mulher e a reserva ovárica no momento da CTO, história de tratamento gonadotóxico prévio, técnicas de preparação do tecido, protocolos de congelamento, volume do tecido enxertado, técnicas de transplante, grau de isquemia pós-transplante e a densidade folicular no tecido reimplantado.(3,42) Todas estas variáveis são difíceis de avaliar e classificar. Por exemplo, mulheres da mesma idade podem ter ovários com volumes diferentes, o que condicionará o número de fragmentos corticais removidos, criopreservados e transplantados, e conseqüentemente, o número de folículos.(31) Por outro lado, nem toda a zona cortical do ovário terá igual densidade folicular entre si, e é difícil prever qual o número de folículos efetivamente transplantados em cada peça.(28)

Caso a quantidade de tecido ovárico criopreservado seja suficiente, podem fazer-se repetidos transplantes, com o objetivo de aumentar a longevidade do tecido, e alargando o tempo de atividade endócrina ovárica em mais de uma década.(35)

3.1.2.1.2 Transplante heterotópico para restaurar exclusivamente a função endócrina

Em casos de mulheres cujo desejo seja apenas o de restaurar a função endócrina, e não a fertilidade, o transplante heterotópico é uma boa opção por várias razões: requer cirurgia menos invasiva e reduz a necessidade de anestesia geral, permite que o processo seja repetido com maior facilidade, previne a ocorrência de gravidezes numa idade tardia, pode ser realizado em caso de aderências pélvicas e oferece melhor acesso para monitorizar o risco de recorrência maligna.(35,47) No entanto, a principal desvantagem deste tipo de transplante está relacionada com fatores ambientais locais, já que a vascularização, temperatura, pressão local, fatores parácrinos podem não ser ótimos e influenciar a funcionalidade do tecido reimplantado.(51) Além disso, pode ser um local em que ocorre dor cíclica e desconforto no momento do desenvolvimento folicular.(42)

3.1.2.1.3 A THS baseada na CTO é superior à THS farmacológica? Os obstáculos, as dúvidas.

Os ovários produzem hormonas estrogénicas, progestagénicas e androgénicas, que são libertadas de forma pulsátil. Apesar de ainda não existir evidência científica que o sustente, acredita-se que o tecido ovárico transplantado produza o mesmo espetro de hormonas de forma pulsátil, constituindo, assim, uma fonte de hormonas endógenas, secretadas em concentrações fisiológicas, de forma cíclica.(49)

Sabe-se que a menopausa tardia está associada à diminuição do risco de doença coronária e da mortalidade cardiovascular, mas a um aumento do risco de neoplasia da mama. O que ainda não se sabe é se é mais benéfico manter perfil hormonal mais fisiológico ou usar uma combinação fixa de uma ou duas hormonas.(49) A produção de androgénios pelo tecido ovárico pode ser vantajosa em relação à THS farmacológica, uma vez que pode melhorar a função sexual da mulher, aliviar a síndrome genitourinária da menopausa e melhorar a

libido.(42,52) No entanto, ainda é preciso demonstrar que é a THS com tecido ovárico é benéfica, ou pelo menos, não inferior à THS farmacológica.(53)

A THS baseada na CTO levanta algumas dúvidas e gera incertezas sobre alguns potenciais riscos associados. Em primeiro lugar, surge a possibilidade de produção errática ou insuficiente de hormonas e o facto de a longevidade do tecido enxertado ser variável e imprevisível. Para que a THS tecidual compensasse, o tecido deveria estar ativo pelo menos cinco anos, com desenvolvimento folicular contínuo para evitar fases de baixos estrogénios, que condicionariam a existência de sintomas típicos da menopausa.(49)

Outra questão que se coloca prende-se com a segurança hormonal e a proteção do endométrio com a produção adequada de progesterona. Acredita-se que, mesmo com transplante heterotópico, o nível de progesterona é suficiente para a fase do endométrio secretor.(47) Em mulheres histerectomizadas, a THS farmacológica isolada com estrogénios seria a opção preferível, já que permite reduzir o risco de neoplasia da mama que a adição da progesterona acarreta.(42,49)

A THS baseada na CTO requer no mínimo duas intervenções cirúrgicas e exige o armazenamento do tecido a longo prazo. A cirurgia não só é mais cara como acresce de riscos cirúrgicos. E se, por algum motivo, fosse necessário interromper a produção hormonal, isso só seria possível com o recurso a nova cirurgia. Além disso, a THS tecidual pode exigir a toma simultânea de THS farmacológica numa fase inicial.(49)

As razões supracitadas levam autores, como Wolff *et al.*, a não considerar a CTO como uma alternativa adequada para atrasar a menopausa, caracterizando-a como dúbia do ponto vista endocrinológico. Ainda assim, é considerada uma opção interessante, que deve ser avaliada individualmente, caso, além de ter como objetivo único adiar o início da menopausa, seja usada e posta em prática para simultaneamente preservar a fertilidade, ou permitir gerar uma gravidez numa fase mais tardia da vida da mulher.(49)

Kristensen *et al.* consideram que a THS baseada em tecido ovárico tem potencial para ser usada para adiar a menopausa, quer seja natural ou induzida, constituindo uma estratégia preventiva que pode aumentar a qualidade de vida das mulheres. Mas realçam que, apesar de ser tecnicamente possível, ainda falta evidência científica que prove a superioridade nos níveis hormonais fisiológicos em relação à THS farmacológica.(35)

3.2. Criopreservação de tecido ovárico em adolescentes

3.2.1 O cancro em adolescentes

Os adolescentes com cancro devem ser reconhecidos como um grupo etário distinto, que tem necessidades médicas e psicossociais únicas.(2) Para efeitos sobretudo estatísticos, são

habitualmente considerados adolescentes os que iniciam um quadro oncológico entre os 15 e os 19 anos.(54) E o grupo mais heterogéneo de adolescentes e adultos jovens, os com idades entre os 15 e os 39 anos.(2)

Nos últimos anos, apesar de os avanços no tratamento oncológico terem melhorado as taxas de sobrevivência em crianças e adultos mais velhos, essa melhoria não se aplica a adolescentes e aos adultos mais jovens. A taxa de sobrevivência em adolescentes é semelhante à encontrada em crianças, mas em termos de evolução tem-se mantido constante. Uma das principais razões prende-se com a baixa taxa de participação desta faixa etária em ensaios clínicos. Além disso, fatores como a menor adesão, a intolerância ao tratamento e o atraso no diagnóstico têm contribuído para resultados menos bons neste grupo.(2) Estima-se que a sobrevida global a cinco anos das adolescentes do sexo feminino com cancro seja de 90%.(54)

O espetro de tipos de cancro mais prevalentes em adolescentes difere do que afeta mais crianças e adultos mais velhos. Cerca de 95% dos cancros neste grupo etário são linfomas, melanoma, cancro testicular, cancro do trato genital feminino, cancro da tiróide, sarcomas do tecido mole e cancro ósseo, leucemias, tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), cancro da mama e tumores de células germinativas.(2)

A qualidade do cuidado prestado a jovens com cancro está intimamente ligado ao tempo que leva a ser feito o diagnóstico e a ser iniciado o tratamento, à adesão ao tratamento, e ao acompanhamento por uma equipa multidisciplinar que saiba gerir as questões específicas do desenvolvimento e das suas necessidades psicossociais.(2,12)

3.2.2 Preservação da fertilidade

As *guidelines* para a prática clínica em oncologia da NCCN consideram a preservação da fertilidade como um elemento essencial na abordagem ao adolescente com cancro. No entanto, é um dos temas menos abordados com os doentes.(2) Quinn *et al.*, após a revisão de cerca de 230 registos médicos de adolescentes e adultos jovens com cancro da mama ou testículo, leucemia, linfoma e sarcoma, relataram que o risco de infertilidade foi apenas discutido em 26% dos casos e que apenas em 24% se discutiram as opções de preservação da fertilidade disponíveis.(55) Entre as várias razões para a ausência de abordagem encontram-se o constrangimento de tempo, a preocupação com o atraso no tratamento, o medo do impacto psicológico que pode criar no doente e mesmo o desconhecimento das opções e técnicas de preservação de fertilidade disponíveis.(12)

Ao contrário do que acontece, por exemplo, com a abordagem e avaliação geriátrica do idoso com cancro, envolvendo a compreensão das necessidades funcionais destes doentes, não existem grandes dados baseados na evidência de como deverá ser a abordagem ao

adolescente com cancro.(2) De facto, as conversas com adolescentes podem ser mais complicadas pela natureza sensível do assunto da fertilidade e sexualidade, e pela complexidade de incluir os pais na discussão do tema.(12)

A abordagem deve ser apropriada à idade, com sensibilidade para a natureza potencialmente embaraçosa do tópico para alguns adolescentes. Estes variam imenso entre si no que diz respeito ao conhecimento e experiência relacionados com a sexualidade e fertilidade, e são, na maioria das vezes, acompanhados pelos pais. O profissional de saúde que aborda o assunto deve sentir-se confortável para discutir o assunto e deve maximizar o conforto dos adolescentes e garantir-lhes que a preservação da fertilidade é um tema abordado com todos os recém-diagnosticados.(2,12)

Existem várias opções para a preservação da fertilidade em raparigas adolescentes e pós-púberes, e o médico deve ter o conhecimento suficiente para as propor, sabendo explicar as vantagens e desvantagens de cada método.(12)

A ooforopexia e a criopreservação de embriões após a fertilização *in vitro* são duas opções possíveis. A ooforopexia deve ser proposta sempre que esteja programado o tratamento com radioterapia e o campo de irradiação inclua o ovário. No entanto, como já referido anteriormente, não protege dos efeitos da quimioterapia. Já a criopreservação de embriões só é possível com a existência de um parceiro, o que é pouco provável nestas idades, ou, a existir, é pouco provável que a decisão passe por incluir o companheiro, dada a imaturidade própria da idade e o facto de ser uma decisão com efeitos a longo prazo.(2) Uma alternativa é a criopreservação de oócitos maduros, uma vez que não requer a existência de um parceiro. No entanto, na discussão sobre este método, as jovens devem ser avisadas que o processo requer a realização de ecografias endovaginais e a colheita de oócitos através da vagina, o que pode ser doloroso e desconfortável, particularmente nestas idades.(12)

A CTO é uma opção atrativa e promissora para preservar a fertilidade em adolescentes. O facto de a técnica não requerer estimulação ovárica, e portanto, evitar o atraso no início do tratamento, e sobretudo por não exigir a existência de um parceiro, tornam a CTO uma alternativa atrativa. Além disso, apresenta outras vantagens: permite restaurar a função ovárica, o que pode ser particularmente interessante nestas idades, já que os tratamentos podem causar insuficiência ovárica e menopausa numa idade muito precoce; permite adiar as decisões sobre a parentalidade (ao contrário da preservação de embriões); e não exige a realização de ecografias endovaginais em idades jovens (ao contrário da preservação de oócitos).(2,3)

3.2.3 THS farmacológica vs THS endógena

As jovens que sobreviveram ao cancro e que desenvolveram insuficiência ovárica são suscetíveis de sofrer de distúrbios mentais, nomeadamente stress pós-traumático, ansiedade e depressão.(48) Ao impacto psicológico junta-se a repercussão orgânica, como a ocorrência de sintomas vasomotores, distúrbio do sono, redução da densidade mineral óssea, doença cardiovascular e declínio cognitivo.(9) Várias destas condições podem ser melhoradas e prevenidas com a reposição hormonal.

Como já discutido anteriormente, a THS farmacológica é amplamente aceite como o pilar do tratamento da insuficiência ovárica prematura, pelo menos até à idade média da menopausa natural. No entanto, o seu uso é controverso e há que pesar os riscos e benefícios. Apesar de estes riscos já terem sido extensamente estudados em mulheres com idade igual ou superior a 50 anos, não existem dados acerca da segurança a longo prazo do uso de THS farmacológica em sobreviventes de cancro jovens. Tendo em conta cada caso em particular, deve ser avaliado o risco do uso de hormonas exógenas, pesquisando história familiar de cancro da mama (sobretudo mutações BRCA1/2), trombose venosa profunda e Fator V de Leiden e os antecedentes pessoais oncológicos.(35)

Sabe-se que sobreviventes de cancro têm um risco maior de cancro da mama, doença cardíaca e tromboembolismo, em comparação com a população geral. No caso de um linfoma de Hodgkin, por exemplo, as sobreviventes têm um risco elevado de cancro da mama, doença cardíaca e acidente vascular cerebral.(48) Estes riscos individuais devem ser tidos em conta e pesados com o benefício eventual da THS. As morbilidades associadas à ausência de tratamento com hormonas exógenas podem ser significativas, mas os riscos de aumento de mortalidade não se podem ignorar. Além disso, é imperativo que também a função ovárica seja cuidadosamente avaliada antes de iniciar terapia hormonal. E caso se suspeite que a amenorreia possa ser transitória, o seu uso deve mesmo ser evitado.(35,48)

Por outro lado, sabe-se que a THS com estrogénios isolados ou em combinação com progesterona resulta, muitas vezes, em concentrações hormonais séricas superiores às da função normal dos ovários, por não atuar de forma integrada com o eixo HHO.(35) A dose, a frequência e o momento da toma devem ser sempre otimizados.(46)

O uso de tecido ovárico criopreservado com a finalidade de THS parece ser uma alternativa promissora, pela libertação de hormonas de uma forma mais fisiológica e pela capacidade de restaurar a funcionalidade do eixo HHO. Além de levar à cessação dos sintomas menopáusicos e restaurar os ciclos menstruais, permite que as raparigas se sintam “normais”, numa fase da vida que é particularmente problemática.(35,48) Trata-se de um período crítico em termos emocionais e sociais que, além do desenvolvimento inerente à adolescência, tem a agravante do processo oncológico e das alterações que este condiciona na vida das doentes. Assim,

acredita-se que a THS com tecido ovárico possa ser benéfica quer fisicamente, quer psicologicamente, por permitir que a adolescente em falência ovárica decorrente do processo oncológico possa experienciar a fase da vida como outra adolescente da mesma idade, com um nível fisiológico hormonal equivalente.(35)

Ainda assim, tal como acontece na população de mulheres mais velhas, e apesar das potenciais vantagens, continua a usar-se a THS farmacológica, já que é mais barata, simples, e pode iniciar-se imediatamente sem requer procedimentos cirúrgicos. Além disso, a superioridade teórica do nível de hormonas endógenas em relação ao uso farmacológico ainda não foi provada clinicamente.(35)

3.3 Criopreservação de tecido ovárico na pré-puberdade

3.3.1. O cancro nestas idades - contextualização

O cancro infantil é a segunda causa de morte em crianças com idade inferior a 15 anos, sendo apenas ultrapassado pelos acidentes. É, assim, a primeira causa de morte por doença.(56,57)

O relatório da *International Agency for Research on Cancer* indica que são diagnosticados, em todo o mundo, cerca de 215 000 novos casos de cancro em crianças com idade inferior a 15 anos por ano.(58) Felizmente, as taxas de sobrevivência têm melhorado bastante nos últimos 50 anos e estima-se que atualmente sejam já superiores a 80%.(37,56,57)

Os tipos de cancro mais prevalentes nesta população diferem da população adulta, e se para a última existem vários fatores de risco bem identificados e estudados, essa relação é escassa na população mais nova. Na sua maioria, estes cancros não estão ligados a opções individuais do estilo de vida, nem à exposição ambiental, mas sim a fatores genéticos. Por outro lado, não há mecanismos de rastreio para deteção precoce e normalmente não são diagnosticados até haver sintomatologia associada.(57) Os tipos de cancro mais prevalentes são: leucemia (30%), tumores do SNC (26%), linfomas, neuroblastomas, tumor de Wilms, rabiomiossarcoma e cancros ósseos primários (nomeadamente o osteossarcoma e o sarcoma de Ewing).(57)

Estima-se que cerca de 60% das crianças que sobrevivem ao cancro sofram complicações a longo prazo, quer pela doença, quer pelos tratamentos anti-neoplásicos a que foram submetidas.(56) Um efeito a longo prazo conhecido do tratamento oncológico, quer em adultos, quer em sobreviventes de cancro infantil, é a disfunção gonadal que pode, por vezes, resultar em infertilidade.(37)

O *Childhood Cancer Survivor Study* indica que cerca de 6,3% das raparigas sujeitas a tratamento anti-neoplásico desenvolvem IOP nos cinco anos após o diagnóstico. Uma percentagem ainda maior experiencia insuficiência ovárica transitória durante o tratamento, que, à partida, resolverá nos meses subsequentes.(59) Consoante a fase do desenvolvimento

pubertário em que ocorre, a IOP pode ter diferentes manifestações. Se ocorre em pós-púberes, caracteriza-se pelo desaparecimento de ciclos menstruais (amenorreia secundária) e sintomas típicos da pós-menopausa. Se ocorrer em fase pré-púbere, pode traduzir-se pela ausência de menarca (amenorreia primária) e de caracteres sexuais secundários.(60)

3.3.2. Preservação da fertilidade

As raparigas pré-púberes parecem estar mais protegidas dos efeitos gonadotóxicos dos tratamentos, ao contrário do que se verifica, por exemplo, com a população masculina em que o risco é estável e sustentado independentemente da idade. No caso de os ovários estarem no campo de irradiação do tratamento, seria necessária uma dose superior a 15 Gy para existir risco de infertilidade em pré-púberes, enquanto que numa mulher adulta a dose necessária seria apenas de 6 Gy.(37)

A criopreservação de oócitos e embriões são duas técnicas estabelecidas para a preservação da fertilidade, mas nenhuma delas é possível em crianças pré-púberes. A ooforopexia é outra técnica possível, mas exhibe diversas limitações já mencionadas. Assim, apesar de ser ainda considerada experimental, a CTO é a única opção disponível para preservar a fertilidade em raparigas pré-púberes ou pós-púberes que não possam adiar o início do tratamento.(37)

Atualmente, a ooforectomia unilateral laparoscópica é a técnica preferida para a recolha de tecido para criopreservar. O volume médio do ovário numa rapariga pré-púbere é apenas cerca de 1 cm³ e outras técnicas como a biópsia ovárica ou a ooforectomia parcial podem associar-se a maior taxa de complicações (nomeadamente hemorragia) e podem não permitir a recolha de tecido suficiente.(61) Apesar de defender a técnica, Rowell *et al.* levanta a dúvida sobre a possibilidade de a remoção de um ovário inteiro causar por si IOP, em detrimento do tratamento oncológico. Vários estudos sugerem que ocorre um mecanismo compensatório no ovário contralateral e que, a remoção de um ovário apenas antecipa a menopausa em cerca de um ano.(62,63) Ainda assim, Rowell *et al.* consideram a extrapolação destes resultados para a população sujeita a tratamento gonadotóxico duvidosa e limitada, já que os estudos foram feitos em mulheres não expostas a essas terapias.(61)

A ooforectomia deve ser agendada em coordenação com outros procedimentos invasivos, caso estes sejam necessários, para evitar a exposição repetida da criança à anestesia. Por outro lado, torna-se imperativo realizar o procedimento laparoscópico com cuidado redobrado, não só pelos desafios anatómicos já mencionados, como pela necessidade de ser pouco invasivo e livre de complicações, por forma a não atrasar o início do tratamento anti-neoplásico.(61)

Também pode ser usada em casos em que já se iniciou quimioterapia, o que é uma vantagem já que, pode haver necessidade de escalar o tratamento e, crianças que inicialmente tinham

um baixo risco gonadotóxico, podem ter que ser sujeitas posteriormente a um tratamento com maior risco de gonadotoxicidade.(37)

Há dois relatos de gravidezes em mulheres que fizeram CTO antes de atingirem a menarca, com posterior transplante. Ambos os casos eram não oncológicos. Um caso descrito por Demeestere *et al.* tratava-se de uma rapariga de 13 anos, com anemia falciforme, pré-púbere, que foi sujeita a ooforectomia direita antes de realizar tratamento com mieloablação para posterior transplante de células hematopoiéticas. Dez anos depois, recebeu aconselhamento por demonstrar o desejo de engravidar e foi feito o transplante de tecido ovárico, num procedimento laparoscópico faseado, após a confirmação da IOP. Cerca de cinco meses depois menstruou e manteve ciclos menstruais regulares a partir daí. Dois anos após o transplante, teve uma gravidez espontânea, que culminou com o nascimento de um bebé saudável.(64) O segundo caso é de uma menina de 9 anos, com beta-talassemia, que foi sujeita a ooforectomia direita para criopreservação de tecido ovárico, antes de fazer transplante de medula óssea. Aos 23 anos de idade, foi submetida à reimplantação do tecido ovárico e cerca de três meses depois começou a menstruar, mantendo ciclos regulares. Posteriormente, foi feita fertilização *in vitro*. O processo culminou com o nascimento de um menino saudável.(65)

Uma das questões que se coloca é saber a quem se deve propor a CTO, isto é, como identificar as raparigas em risco de IOP que poderiam beneficiar desta técnica ainda experimental. No caso de mulheres adultas, esses critérios estão estabelecidos. Num estudo de coorte, Wallace *et al.* mostraram que os critérios específicos de selecção de Edinburgh podem ser também aplicados a raparigas para identificar as que apresentam alto risco de IOP.(33)

A avaliação da reserva ovárica em mulheres adultas requer o doseamento de FSH e estradiol, o que não é informativo em raparigas pré-púberes, uma vez que o eixo HHO ainda não foi ativado. A HAM foi sugerida como potencial biomarcador sérico indireto e fiável da função ovárica em pré- e pós-púberes saudáveis, tal como em raparigas com cancro, antes e durante e após o tratamento.(66)

Sabe-se que até aos 25 anos de idade os níveis de HAM aumentam lenta e progressivamente, ocorrendo uma diminuição linear e igualmente lenta nos anos seguintes, até atingir níveis praticamente indetetáveis na menopausa. Dorp *et al.* compararam os níveis da hormona em meninas diagnosticadas com cancro com os níveis em meninas saudáveis de idade correspondente e concluíram que os níveis de HAM estão diminuídos em meninas recém-diagnosticadas em comparação com controlo, mesmo antes de se iniciar quimioterapia ou radioterapia. Isto sugere que o estado geral de saúde compromete os níveis da hormona, e que estes dependem de outros fatores além do número de folículos.(66)

3.3.3. Indução da puberdade

Num estudo de coorte retrospectivo, Jensen *et al.* concluíram que há uma associação clara entre a agressividade do tratamento oncológico recebido e a necessidade de indução médica da puberdade.(60) A THS com estrogénios pode ser uma opção viável para crianças com hipogonadismo, em que se pretenda impulsionar o crescimento púbere e o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários.(35,67) O processo inclui o desenvolvimento mamário, a indução da menarca e a obtenção de uma estatura apropriada. Além disso, há evidência crescente de que um meio hormonal apropriado é necessário para o desenvolvimento cerebral normal e adequado à idade.(67)

Enquanto que em raparigas pós-púberes os riscos associados à terapia farmacológica com hormonas exógenas (nomeadamente risco trombótico e neoplásico) devem ser cuidadosamente avaliados e pesados tendo em conta potenciais benefícios, no caso de meninas pré-púberes o benefício total parece ultrapassar os riscos.(48) Ainda assim, o tratamento deve ser cuidadoso e com ponderação cautelosa das doses, uma vez que, doses baixas estimulam o crescimento longitudinal e doses altas podem levar a fecho prematuro das epífises dos ossos.(67) Estudos como o de DiVasta e Gordon estabelecem regimes faseados de terapia hormonal exógena para mimetizar ao máximo a puberdade fisiológica e tentar evitar complicações.(68)

Apesar de os riscos inerentes ao uso de hormonas exógenas estarem “exaustivamente” estudados em mulheres com idade superior a 50 anos, o mesmo não acontece para sobreviventes oncológicos em idade pediátrica.(48) Há pouca evidência sobre quais serão os regimes de tratamento hormonal de substituição mais adequados nestas faixas etárias, pelo que se considera necessário um maior estudo sobre a otimização de doses, a sua segurança e os efeitos a longo prazo, nomeadamente o risco de desenvolvimento de tumores dependentes de estrogénios. (67)

A THS baseada em tecido pode ser uma abordagem atrativa para induzir a puberdade em jovens pré-púberes, promovendo o suporte hormonal fisiológico adequado. (35) Como referido anteriormente, a CTO é a única opção para preservação da fertilidade em raparigas que ainda não atingiram a puberdade, e, além de ser usada para esse fim, é capaz de restaurar a função endócrina ovárica, pela produção de hormonas endógenas. Assim, a THS baseada em tecido ovárico criopreservado pode constituir uma opção alternativa à terapia de substituição farmacológica.(35,60)

A reserva folicular é maior nos primeiros anos de vida e o transplante autólogo de uma fração do tecido ovárico criopreservado pode ser realizado para a indução da puberdade, permitindo que as raparigas possam experienciar esta fase da vida de uma forma mais semelhante ao fisiológico e espontâneo. O facto de se usar uma pequena fração do total de tecido

criopreservado não inviabiliza a possibilidade de um dia mais tarde se poder reimplantar o restante com o objetivo de permitir a fertilidade e a gestação, uma vez que, já que é feita em idades precoces, a reserva folicular desse tecido será maior. (60)

Existem dois casos relatados de indução da puberdade através de tecido ovárico recolhido por ooforectomia unilateral, que foi criopreservado e posteriormente sujeito a transplante heterotópico num caso, e transplante para o ovário remanescente no outro. Poirot *et al.* relataram o primeiro caso de puberdade induzida por autotransplante de tecido ovárico criopreservado com alguns fragmentos de tecido ovárico com uma densidade normal de folículos primordiais, numa rapariga cujo diagnóstico não era uma condição oncológica. O tecido ovárico foi criopreservado antes dos tratamentos, numa altura em que não existiam sinais de puberdade. Foi realizada ooforectomia unilateral e, cerca de quatro anos depois e após a remissão da doença, fragmentos do tecido foram transplantados para um local heterotópico, na parede abdominal, com o objetivo de induzir a puberdade. Aos quatro meses, atingiu o estadio II de Tanner. Após oito meses teve a sua primeira menstruação (menarca) e os ciclos foram regulares nos dois anos seguintes ao transplante. A função ovárica cessou após cerca de dois anos, apesar do sucesso na indução da puberdade. (69) Ernst *et al.* relataram o outro caso de indução da puberdade após transplante de tecido ovárico criopreservado numa sobrevivente de doente oncológica (sarcoma de Ewing). O tecido foi colhido quando a rapariga tinha nove anos, numa fase prévia ao tratamento, e transplantado após quatro anos e meio, quando esta se encontrava saudável e ainda se mantinha em fase pré-púbere. A menarca ocorreu um ano após o transplante e os ciclos menstruais foram regulares durante cerca de meio ano, altura em que o nível de FSH aumentou para valores pós-menopáusicos. A atividade do tecido ovárico cessou aproximadamente dezanove meses depois do transplante. (70)

Uma das vantagens do uso de tecido ovárico apenas para restaurar a função endócrina de modo a permitir a indução da puberdade é a possibilidade de fazer o transplante sem necessitar de realizar uma intervenção laparoscópica, pois pode ser implantado de forma heterotópica, subcutaneamente, com anestesia local, tal como já referido. Além disso, essa localização permite uma melhor observação e deteção precoce de recorrência, caso esta ocorra. (35)

No entanto, este método tem algumas desvantagens. Uma vez que a longevidade do tecido é limitada, o transplante de tecido ovárico não substitui a terapia hormonal de reposição. E após a indução da puberdade, as mulheres vão necessitar dessa reposição durante vários anos e até décadas. Por outro lado, em alguns casos, a atividade do tecido dura ainda menos do que um ano, exigindo mais do que um transplante. No caso de uma rapariga que pretenda um dia mais tarde engravidar, pode ser aceitável correr os riscos, já que é o único método disponível em pré-púberes. Ao contrário, para a indução da puberdade, há algoritmos

estabelecidos de reposição hormonal exógena que são mais baratos, fáceis e eficazes, ainda que escasseiem estudos que concluam acerca da sua segurança.(35,71)

Na puberdade fisiológica e espontânea os estrogénios vão aumentando gradualmente. Em casos de transplante de tecido ovárico em que a FSH está muito elevada numa fase pré-transplante, vai haver recrutamento e ativação de vários folículos e uma produção exagerada de estrogénios numa fase inicial, o que pode provocar um desenvolvimento pubertário demasiado rápido e trazer consequências como ganho de peso, cefaleias, náuseas e desconforto mamário. Pontos fracos como os acima mencionados levam alguns autores, como Wolff *et al.*, a não o considerar como uma opção viável para a indução médica da puberdade, nem uma alternativa à terapia de reposição hormonal.(71) Dorp *et al.* também não apoiam o uso de tecido ovárico de forma exclusiva para a indução da puberdade, considerando que o uso de um recurso tão escasso não é adequado para esse propósito.(66)

Capítulo 4. Discussão

A CTO é considerada experimental pela maioria das sociedades, apesar de ser uma técnica estabelecida em alguns países, nomeadamente em Israel, Noruega e Dinamarca. A principal indicação para a CTO e a sua posterior reimplantação é a restauração da fertilidade. Sabe-se que o tecido criopreservado tem capacidade de sustentar desenvolvimento folicular e a maioria das mulheres apresenta restabelecimento da função ovárica cerca de quatro meses após o transplante.

A CTO apresenta vantagem em relação à criopreservação de oócitos e embriões porque preserva tanto a função reprodutiva como a hormonal. E além disso, as últimas duas técnicas nem sempre são possíveis de realizar antes do tratamento, em tumores hormono-sensíveis, ou pela ausência de parceiro. E não podem ser aplicados em raparigas pré-púberes. Por outro lado, a CTO obriga à realização de procedimentos invasivos adicionais, num momento de peculiar dificuldade e incertezas.

Atualmente, já foram notificadas mais de 130 gravidezes após CTO e em mais de 95% casos ocorreu recuperação da função ovárica após o transplante. Uma meta-análise relatou uma taxa de nascimentos e gravidezes em curso de 37,7%, o que é comparável a outros métodos para a preservação da fertilidade.(72) No entanto, a verdadeira taxa de eficácia do método é desconhecida, dada a existência de determinadas limitações para o seu cálculo, entre as quais se destacam: a impossibilidade de ter a certeza que as gravidezes espontâneas após transplante ortotópico resultaram do tecido reimplantado e não do ovário remanescente que, eventualmente, tivesse alguma função residual; o facto de existir um grande intervalo de tempo entre a criopreservação do tecido e o transplante, a conseqüente subnotificação dos casos; e a heterogeneidade da população em que se tem aplicado a técnica (condição que leva à indicação para CTO, idade e reserva folicular).

Os principais desafios da técnica surgem sobretudo numa fase pós-transplante. Destaca-se o risco de reintrodução de células malignas que, na sua globalidade, parece ser baixo. No entanto, sabe-se que o grau de segurança depende do tipo de cancro que a doente apresenta, e que é superior no cancro hematológico, em comparação com tumores sólidos. A maioria dos estudos são consensuais na necessidade de utilizar e melhorar métodos que permitam identificar células malignas no tecido a reimplantar, assim como na realização de um “*follow-up*” apertado.(27,29)

Apesar das crescentes taxas de sucesso e melhores resultados clínicos no âmbito da preservação da fertilidade com CTO, ainda há muito que investigar. E espera-se que os avanços futuros surjam sobretudo no que diz respeito aos processos de revascularização do

tecido enxertado, à melhoria dos métodos de pesquisa de células malignas no ovário preservado, e à avaliação da funcionalidade hormonal derivada do ovário transplantado. Uma vez que também não existe consenso nos protocolos, a sua otimização e standardização entre a maioria das redes dedicadas à realização da técnica seria vantajosa, já que também permitiria uma avaliação e comparação mais fiável e válida dos resultados.

O ovário é um órgão endócrino e a restauração da função hormonal também pode ser uma indicação válida. Já foi descrito o seu uso para a indução da puberdade em dois casos e em ambos ocorreu desenvolvimento pubertário e início da menstruação. Por outro lado, o transplante de tecido ovárico criopreservado pode ser feito exclusivamente com o intuito de restaurar a função endócrina e ser usado como método alternativo à THS farmacológica, em casos de menopausa precoce induzida pelo tratamento anti-neoplásico. É uma opção fisiológica para fornecer níveis de hormonas femininas mais fisiológicos, promovendo o bem-estar e a qualidade de vida da mulher, e evitando os efeitos deletérios do hipoestrogenismo. No entanto, o seu uso gera dúvidas pela possibilidade de produção insuficiente de hormonas, pela eventual falta de proteção do endométrio e pela necessidade de duas intervenções cirúrgicas e de armazenamento prolongado do tecido ovárico, o que não só acresce custos como lhe associa os riscos cirúrgicos. Os autores dividem-se, e enquanto alguns consideram que a técnica não deve ser usada exclusivamente para adiar a menopausa, outros consideram-na válida, apesar de ainda não haver evidência científica suficiente que a suporte. (35,49)

A questão que o uso exclusivo da técnica para adiar a menopausa induzida e iatrogénica levanta é se será possível propô-la a mulheres saudáveis após o início da menopausa natural. Consequentemente, a questão seguinte que se coloca é se é mais vantajoso o uso de tecido ovárico em relação à THS farmacológica. (47) A superioridade das hormonas endógenas em relação às exógenas ainda não foi provada. E em mulheres histerectomizadas pode ser realmente mais benéfico o uso de estrogénios isolado, enquanto que o uso de tecido ovárico pode ser preferido em mulheres que tenham o útero intacto. Além de atrasar a sintomatologia e os riscos associados à menopausa, seria legítimo pensar também em utilizar a CTO em mulheres saudáveis que pretendem ter filhos mais tarde? De facto, o chamado “congelamento social” é um tópico que também tem vindo a ganhar terreno na discussão sobre a possibilidade de as mulheres terem filhos numa fase mais tardia da sua vida. Apesar de o termo ser empregue, na maioria das vezes, em relação ao congelamento de oócitos, seguido de FIV, pode também abrir-se caminho para o uso de tecido ovárico criopreservado em idades mais jovens, com o objetivo de adiar a maternidade. A maior dúvida que se coloca é a possibilidade de ocorrência de gravidez com maiores riscos obstétricos e o hipotético aumento do risco de malformações fetais. Várias questões teriam de ser analisadas, desde a segurança e eficácia do procedimento, à maior exigência técnica e maiores custos associados. Ainda são necessários ensaios clínicos para esclarecer as dúvidas médicas e éticas que o processo acarreta.

A CTO é a única técnica disponível que permite preservar a fertilidade em meninas pré-púberes. E no que diz respeito a doentes mais jovens, há importantes questões a ser exploradas e aceites antes de ponderar o seu uso. No momento do diagnóstico, a criança encontra-se, muitas vezes, numa fase de mal-estar generalizado, e a família está a enfrentar um período emocionalmente difícil. Entre procedimentos diagnósticos, investigação e a discussão do tratamento, a discussão sobre o prognóstico do ponto de vista da fertilidade pode ser um assunto difícil de abordar para o médico e para a família. Efetivamente, os estudos mostram que a informação sobre os possíveis efeitos do tratamento anti-neoplásico é fornecida numa pequena percentagem de casos, e que a discussão é menos comum em meninas do que com rapazes.(73) No entanto, sabe-se também que, na sua maioria, os cancros infantis estão ligados a alterações genéticas com que a criança já nasceu. Para a preservação da fertilidade há também que entrar em linha de conta com o risco de transmissão genética à descendência.

A maioria das pacientes jovens com cancro não terão a sua fertilidade significativamente comprometida e, então, a seleção correta das candidatas a CTO é fundamental. Os critérios de Edinburgh foram recentemente validados para crianças pré-púberes e jovens.(33) Atualmente, há relatos de casos de sucesso de gravidezes em mulheres que criopreservaram tecido ovárico antes de atingirem a menarca e também casos em que a puberdade foi induzida com sucesso com recurso à reimplantação de fragmentos ováricos. (69,70)

De uma forma geral, e considerando o sucesso crescente da CTO surge a dúvida sobre o seu estatuto de técnica experimental. Wolff *et al.* defendem que a categorização entre experimental e estabelecida deve ser substituída por uma classificação que tenha em consideração a idade da doente e o tipo de cancro. Se os critérios de eficácia, segurança, procedimento e eficiência forem preenchidos, a técnica poderia ser classificada como estabelecida. Assim, em crianças, onde todos estes critérios ainda ficam aquém do esperado, a técnica seria classificada como experimental. Já em mulheres adultas com doenças que apresentem baixo risco de metastização ovárica e, portanto, maior segurança, a técnica poderia ser considerada estabelecida. Por sua vez, em casos de doenças como a leucemia, o critério da segurança está ainda pouco assegurado, e apesar de já haver inclusivamente relato de um caso de sucesso de uma criança nascida após CTO numa mulher com leucemia, a técnica ainda teria que ser considerada experimental.(30) Naturalmente, esta classificação refere-se mais à utilização da CTO com fim à manutenção da fertilidade, uma vez que é a área mais explorada. Ainda assim, há muito espaço para a investigação e para o aperfeiçoamento das técnicas. De igual forma, também a sua aplicação exclusivamente para restaurar a função endócrina, quer para induzir a puberdade, quer para o seu uso enquanto THS celular, ainda precisam de maior evidência científica para sejam consideradas boas alternativas às técnicas convencionais e estabelecidas, que são também, mais baratas e fáceis de executar.

Em Portugal, não existem orientações nacionais sobre a preservação da fertilidade em doentes oncológicos. A CTO é ainda considerada uma técnica experimental, não obstante é realizada no Centro de Preservação da Fertilidade (CPF) do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. Os profissionais de saúde devem referenciar atempadamente os doentes oncológicos que pretendam assegurar a preservação da fertilidade e o CPF compromete-se a marcar consulta no espaço máximo de uma semana. No que diz respeito aos custos da CTO e da sua manutenção, estes não assegurados pelo Serviço Nacional de Saúde e não são um encargo para as doentes. De acordo com a lei em vigor, o tecido ovárico permanece criopreservado durante três anos, findo o qual a mulher deverá assinar um consentimento para a sua manutenção. Caso isso não aconteça, e decorrido o prazo, o tecido preservado será eliminado ou, será usado em projetos de investigação científica, caso a sua autorização tenha sido expressa no consentimento inicialmente assinado.

Capítulo 5. Conclusão

O aumento da sobrevivência das crianças e adultos jovens com cancro faz com que haja cada vez mais sobreviventes em idade reprodutiva. Assim, e dada a maior ênfase na preocupação com a qualidade de vida das sobreviventes, as questões relacionadas com a fertilidade começam a ser cada vez mais valorizadas.

Da revisão da literatura que efetuámos, podemos concluir que é conveniente que as crianças, adolescentes e adultos jovens com cancro sejam referenciados para discussão da preservação da fertilidade. A análise dos casos deve ser efetuada por equipas próprias, multidisciplinares e preparadas para entender o impacto da preservação da fertilidade na qualidade de vida do doente e na sua família. Deve ser avaliado o risco individual de cada doente e selecionada a técnica mais adequada em cada caso. A equipa deve também ser capaz de executar as técnicas médicas propostas.

A nível mundial, a CTO tem sido aplicada com sucesso para preservar a fertilidade em doentes oncológicas. E, além de conservar o potencial reprodutivo, a preservação ovárica pode ser também utilizada para o tratamento da IOP induzida pelos tratamentos oncológicos, uma vez que possibilita a restauração da função endócrina. Assim, pode ser usada para melhorar os sintomas causados pelo défice de estrogénios e prevenir patologias que advêm da menopausa.

Nas meninas na pré-puberdade, a preservação de tecido ovárico é a única técnica possível para preservar a fertilidade. Adicionalmente, o tecido pode ser utilizado para induzir a puberdade em meninas que sofrem que IOP induzida pela terapêutica gonadotóxica. Apesar de ser uma hipótese teórica e um tópico de discussão, já foi clinicamente demonstrado.

Espera-se que, no futuro, os métodos de CTO sejam otimizados. Seria pertinente a criação de uma rede de registos de CTO para que fosse possível estandardizar resultados e determinar a verdadeira taxa de eficácia do método. A evolução da técnica pode permitir a expansão do seu campo de aplicabilidade, podendo potencialmente ser usada como tratamento “anti-envelhecimento” e como uma alternativa a mulheres que desejam ser mães numa fase mais tardia da sua vida.

Criopreservação de tecido ovárico em doentes oncológicas: qual a aplicabilidade clínica?

Referências Bibliográficas

1. Teresa A, Santos A, Sousa G. Recomendações Clínicas para a Preservação da Fertilidade no Doente Oncológico. 2015;
2. National Comprehensive Cancer Network. Adolescent and Young Adult (AYA) Oncology. 2018;
3. Kim S, Lee Y, Lee S, Kim T. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. *Obs Gynecol Sci*. 2018;61(4):431-42.
4. Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol*. 2005;(31):209-18.
5. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: an Ethics Committee opinion. *Fertil Steril* [Internet]. 2018;110(3):380-6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.034>
6. Vassilakopoulou M, Boostandoost E, Papaxoinis G, de La Motte Rouge T, Khayat D, Psyrris A. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2016;97(2015):328-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.002>
7. Vuković P. Fertility Preservation in Young Women with Early-Stage Breast Cancer. *Acta Clin Croat*. 2019;147-56.
8. Cristina E, Leonel R, Lucci M, Amorim CA. Cryopreservation of Human Ovarian Tissue : A Review. 2019;173-81.
9. Shuster L, Rhodes DJ, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA. Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. 2011;65(2):1-11.
10. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, Quinn GP, Reinecke J, Taylor HS, et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer : ASCO Clinical Practice Guideline Update. 2019;36(19).
11. Peccatori FA, Azim JA, Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6).
12. Johnson RH, Kroon L. Optimizing fertility preservation practices for adolescent and young adult cancer patients. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2013;11(1):71-7.
13. Trudgen K, Ayensu-coker L. Fertility preservation and reproductive health in the pediatric , adolescent , and young adult female cancer patient. 2014;26(5):372-80.

14. Fathi R, Ph D, Valojerdi MR, Ph D, Ebrahimi B, Ph D. Fertility Preservation in Cancer Patients : In Vivo and In Vitro Options. 2017;19(2):173-83.
15. Lee S, Ryu K, Kim B, Kang D, Kim YY, Kim T. Comparison between Slow Freezing and Vitrification for Human Ovarian Tissue Cryopreservation and Xenotransplantation. 2019;
16. Ladanyi C, Mor A, Christianson MS, Dhillon N, Segars JH. Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research. 2017;709-22.
17. Amorim CA, Cristina E, Leonel R, Afifi Y, Coomarasamy A, Fishel S. Cryostorage and retransplantation of ovarian tissue as an infertility treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.09.002>
18. Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2011;23(2):160-86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.04.005>
19. Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. 2009;24(7):1670-83.
20. Gosden RG, Baird DT, Wade JC WR. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. 1994;9(4):597-603.
21. Kim SK, Lee JR, Kim SS. Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos. 2017;1568:23-31. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6828-2>
22. Donnez J, Ph D, Dolmans M, Ph D, Pellicer A, Ph D. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue : a review of 60 cases of reimplantation. 2013;(8):1503-13.
23. Oktay K, Taylan E, Sugishita Y, Goldberg GM. Robot-assisted Laparoscopic Transplantation of Frozen-thawed Ovarian Tissue. *J Minim Invasive Gynecol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmig.2017.02.021>
24. Dolmans M, Manavella DD. Recent advances in fertility preservation. 2018;1-14.
25. Manavella DD, Cacciottola L, Desmet CM, Jordan BF, Donnez J, Amorim CA, et al. Adipose tissue-derived stem cells in a fibrin implant enhance neovascularization in a peritoneal grafting site : a potential way to improve ovarian tissue transplantation. 2018;33(2):270-9.
26. Shehata M. A new strategy and system for the ex vivo ovary perfusion and cryopreservation: An innovation. 2017;15(6):323-30.
27. Rosendahl M, Greve T, Andersen CY. The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients : a review of the literature. 2013;11-24.

28. Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, Jeppesen J V, Fedder J, Ernst E, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. 2015;30(12):2838-45.
29. Anderson RA, Wallace WHB, Telfer EE. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation : clinical and research perspectives. 2017;1-9.
30. Shapira M, Raanani H, Barshack I, Amariglio N, Derech-Haim S, Marciano MN, et al. First delivery in a leukemia survivor after transplantation of cryopreserved ovarian tissue, evaluated for leukemia cells contamination. *Fertil Steril* [Internet]. 2018;109(1):48-53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.09.001>
31. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Ernst E, Andersen CY. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue : an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. 2018;561-70.
32. Salama M, Woodruff TK. New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients. 2016;34(4):807-22.
33. Wallace WHB, Smith AG, Kelsey TW, Edgar AE, Anderson RA. Fertility preservation for girls and young women with cancer : population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(10):1129-36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70334-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70334-1)
34. Paradisi R, Macciocca M, Vicenti R, Rossi S, Mastroberto M, Seracchioli R, et al. New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation New insights in the selection and management of cancer patients. 2016;3590(June).
35. Kristensen SG, Andersen CY. Cryopreservation of ovarian tissue: Opportunities beyond fertility preservation and a positive view into the future. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(JUL):1-10.
36. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved. 2004;1405-10.
37. Burns KC, Hoefgen H, Strine A, Dasgupta R. Fertility Preservation Options in Pediatric and Adolescent Patients With Cancer. 2018;
38. Meirow D, Shapira M, Brenghausen M, Ph D. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil Steril* [Internet]. 2016;106(2):467-74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.031>
39. Yding C, Silber SJ, Stener J, Ernst E. Long-term duration of function of ovarian tissue transplants: case reports. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2012;25(2):128-32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.03.014>

40. Póvoa A, Xavier P, Calejo L, Soares S, Sousa M, Silva J, et al. First transplantation of cryopreserved ovarian tissue in Portugal , stored for 10 years : an unexpected indication. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2016;32(3):334-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.12.002>
41. Midões M. Primeiro transplante de ovário criopreservado em Coimbra [Internet]. 2015 [cited 2020 Jan 27]. Available from: <https://www.tsf.pt/sociedade/saude/primeiro-transplante-de-ovario-criopreservado-em-coimbra-4897953.html>
42. Vuković P, Kasum M, Orešković D, Čehić E, Raguž J, Elezaj S, et al. Importance of ovarian tissue cryopreservation in fertility preservation and anti-aging treatment. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2019;0(0):1-5. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1611763>
43. American College of Physicians. Guidelines for Counseling Postmenopausal Women about Preventive Hormone Therapy. 1992;1038-41.
44. Rossouw JE; Andersen, Garnet L.; LaCroix, Andrea Z.; Kooperberg, Charles; Stefanick, Marcia; Jackson, Rebecca; Beresford, Shirley; Hutchinson, Fred; Howard, Barbara; Johnson, Karen; Kotchen, Jane; Ockene J. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. 2002;288(3):321-33.
45. Lobo RA. Where Are We 10 Years After the Women's Health Initiative? 2013;98(May):1771-80.
46. Lobo RA. Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.164>
47. Donnez J, Dolmans M. Natural hormone replacement therapy with a functioning ovary after the menopause: dream or reality? *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2018;37(3):359-66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.018>
48. Appelbaum H, Editor S, Fish JD. Should Ovarian Failure in Survivors of Childhood Cancers Be Treated with Hormonal Therapy? Part 1: Hormone Replacement for Survivors of Childhood Cancer with Ovarian Failure – When Is It Worth the Risk? *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2011;24(2):98-101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2010.11.001>
49. Von Wolff M, Stute P. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue exclusively to postpone menopause: Technically possible but endocrinologically doubtful. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2015;31(6):718-21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.010>
50. Andersen, Claus Yding; Kristensen S. Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. 2015;

51. Kim SS. Revisiting the role of heterotopic ovarian transplantation : futility or fertility. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2014;28(2):141-5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.09.028>
52. Simon JA, Goldstein I, Kim NN, Davis SR, Kellogg-spadt S, Lowenstein L, et al. The role of androgens in the treatment of genitourinary syndrome of menopause (GSM): International Society for the Study of Women's Sexual Health (ISSWSH) expert consensus panel review. 2018;25(7):1-11.
53. Anderson RA, Fauser B. Ovarian tissue transplantation for hormone replacement. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2018;37(3):251-2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.07.002>
54. American Cancer Society. Cancer in adolescents [Internet]. [cited 2020 Jan 30]. Available from: <https://www.cancer.org>
55. Quinn BGP, Block RG, Clayman ML, Kelvin J, Arvey SR, Lee J, et al. If You Did Not Document It , It Did Not Happen : Rates of Documentation of Discussion of Infertility Risk in Adolescent and Young Adult Oncology Patients ' Medical Records. 2015;
56. CureSearch. Childhood cancer statistics [Internet]. [cited 2020 Jan 21]. Available from: <https://curesearch.org>
57. American Childhood Cancer Organization (ACCO). Childhood cancer statistics [Internet]. [cited 2020 Jan 21]. Available from: <https://www.acco.org/childhood-cancer-statistics/>
58. Wild C. Press Release-International Childhood Cancer Day : Much remains to be done to fight childhood cancer. 2016.
59. Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of Female Survivors of Childhood Cancer : A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 2009;27(16):2677-85.
60. Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT, Ifversen MRS, Birkebæk N, Clausen N, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls : focus on pubertal development. 2016;1-11.
61. Rowell EE, Corkum KS, Lautz TB, Laronda M, Walz AL, Madonna MB, et al. Laparoscopic unilateral oophorectomy for ovarian tissue cryopreservation in children. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2018;#pagerange#. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.06.005>
62. Khan Z, Gada RP, Tabbaa ZM, Laughlin-tommaso SK. Unilateral oophorectomy results in compensatory follicular recruitment in the remaining ovary at time of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2014;101(3):722-7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.019>

63. Bjelland EK, Wilkosz P, Tanbo TG, Eskild A. Is unilateral oophorectomy associated with age at menopause? A population study. 2014;29(4):835-41.
64. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Brachet C, Moffa F, Tse S, et al. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. 2015;30(9):2107-9.
65. Walsh F. Woman has baby using ovary frozen in childhood [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.bbc.com/news/health-38312995>
66. Dorp W Van, Vries ACH De, Pluijm SMF, Visser JA, Pieters R, Laven JSE. Decreased serum anti-Mu hormone levels in girls with newly diagnosed cancer. 2014;29(2):337-42.
67. Hershlag A, Rausch ME, Cohen M. Should Ovarian Failure in Survivors of Childhood Cancers Be Treated with Hormonal Therapy? Part 2 : Ovarian Failure in Adolescent Cancer Survivors should be Treated. J Pediatr Adolesc Gynecol [Internet]. 2011;24(2):101-3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2010.11.002>
68. DiVasta, Amy; Gordon C. Hormone Replacement Therapy for the Adolescent Patient. 2008;211:204-11.
69. Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P, et al. Case Report Induction of puberty by autograft of cryopreserved. Lancet [Internet]. 2012;379(9815):588. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61781-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61781-9)
70. Ernst E, Kj M, Birkeb NH, Clausen N, Yding C. Case report : Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen / thawed ovarian tissue. 2013;911-4.
71. von Wolff M, Stute P, Flück C. Autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue to induce puberty—the endocrinologists' view. Eur J Pediatr [Internet]. 2016;175(12):2007-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-016-2771-1>
72. Pacheco F, Oktay K. Current Success and Efficiency of Autologous Ovarian Transplantation : A Meta-Analysis. 2017;
73. Anderson RA, Weddell A, Spoudeas HA, Douglas C, Shalet SM, Levitt G, et al. Do doctors discuss fertility issues before they treat young patients with cancer? 2008;23(10):2246-51.