

Criopreservação e autotransplante de tecido ovárico como forma de terapia hormonal da menopausa-perspetivas futuras

Inês Isabel Pinto Veloso

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

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

Abril de 2023


Folha em branco

Declaração de integridade

Eu, **Inês Isabel Pinto Veloso**, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição **39543** de **Medicina** da Faculdade **Ciências da Saúde**, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã **17/04/2023**



Folha em branco

Dedicatória

Aos meus pais.
Ao meu irmão.
À minha afilhada.

Folha em branco

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Professor Doutor José Alberto Fonseca Moutinho, pela ajuda na escolha do tema, constante orientação, disponibilidade e espírito crítico.

Quero agradecer à minha família, especialmente, aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente ao longo da minha vida e me ajudaram nos momentos mais difíceis. Ao meu irmão, que sempre acreditou em mim. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim e pelo esforço e sacrifícios que fizeram para eu aqui chegar.

Quero agradecer ao Júlio, o meu pilar e porto seguro neste últimos 6 anos. Obrigada pelo amor, pela presença constante, incentivo e paciência, sem ti isto não era possível.

Quero agradecer ao meu grupo de amigos mais próximo, nomeadamente, a Beatriz, a Filipa, ao Francisco e a Luana, que compartilharam importantes conhecimentos comigo e me ensinaram muitas coisas. Um agradecimento em especial para a melhor colega de casa que podia pedir, tornaste os momentos mais difíceis sempre em momentos divertidos e leves.

Folha em branco

Prefácio

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é o oceano

Isaac Newton

Folha em branco

Resumo

Introdução

A menopausa corresponde à perda fisiológica ou iatrogénica da menstruação confirmada pela ausência desta após 12 meses, na ausência de causa patológica e é, frequentemente, acompanhada de sintomas transitórios como ondas de calor, sudorese noturna, distúrbios do sono, humor depressivo, entre outros.

Existem vários tratamentos disponíveis para o controlo destas manifestações como a mudança de estilos de vida e a terapia hormonal que consiste na administração das hormonas através de comprimidos, adesivos transdérmicos, cremes ou comprimidos de aplicação vaginal.

Mais recentemente, colocou-se a hipótese do uso de tecido ovárico autólogo, através de criopreservação e posterior transplante do mesmo, como forma de terapia hormonal. O transplante pode ser realizado de duas formas, ortotópicamente (cavidade pélvica) e heterotópicamente (extra-ovárico).

Objetivos

O objetivo desta dissertação é determinar se a criopreservação e posterior transplante de tecido ovárico, pode ser vir a usado como terapia hormonal na menopausa na prática corrente do tratamento dos sintomas da menopausa e num futuro próximo.

Metodologia

Foi realizada uma vasta pesquisa bibliográfica, com recurso à plataforma PubMed, durante outubro de 2022 a janeiro de 2023. Foram usadas as seguintes palavras-chave: menopausa, criopreservação e transplante tecido ovárico e terapia hormonal na menopausa. Adicionalmente, foram consultados pareceres de sociedades mundiais de relevo para o tema e *guidelines* atuais. Após a análise do material recolhido, foi realizada esta revisão.

Resultados e Discussão

O transplante de tecido ovárico criopreservado permite a restauração da função endócrina na maioria dos casos e seu efeito hormonal pode durar até 10 anos, se o excerto for substituído regularmente. Durante os processos de recolha de tecido, transplantação e revascularização parte da reserva folicular é perdida por processos de isquemia, o que pode resultar numa menopausa anos antes do que seria natural para

cada mulher. De forma a reduzir estes danos, moléculas como o VEGF e a S1F, permitem aumentar a densidade vascular e acelerar o processo de revascularização e assim tornar mais rentável esta técnica.

Conclusão

Apesar de ser uma solução mais fisiológica, esta técnica é dispendiosa e invasiva e, por isso, só indicada em casos específicos. A população alvo para este procedimento são mulheres que o usem quer para tratamento dos sintomas da menopausa induzida como para restauração da fertilidade, nas quais é mais apelativo e custo-efetivo.

Palavras-chave

Menopausa; criopreservação e transplante tecido ovárico; terapia hormonal de substituição; futuro.

Folha em branco

Abstract

Introduction

Menopause corresponds to the physiological or iatrogenic loss of menstruation confirmed by the absence of menstruation after 12 months, in the absence of a pathological cause, and is often accompanied by transient symptoms such as hot flashes, night sweats, sleep disorders, depressive mood, among others.

There are several treatments available to control these manifestations, such as changing lifestyles and hormone therapy, which consists of administering hormones through pills, transdermal patches, creams or pills for vaginal application.

More recently, the hypothesis of the use of autologous ovarian tissue, through cryopreservation and subsequent transplantation, as a form of hormone therapy, has been hypothesized. Transplantation can be performed in two ways, orthotopically (pelvic cavity) and heterotopically (extra-ovarian).

Objectives

The aim of this dissertation is to determine whether cryopreservation and subsequent transplantation of ovarian tissue can be used in future as an hormone replacement therapy in current practice in the treatment of menopausal symptoms.

Methods

An extensive bibliographical research was carried out, using the PubMed platform, from october 2022 to january 2023. The following keywords were used: menopause, cryopreservation and ovarian tissue transplantation and hormone therapy in menopause. Additionally, opinions from relevant world societies on the subject and current guidelines were consulted. After analyzing the collected material, this review was carried out.

Results and discussion

Transplantation of cryopreserved ovarian tissue allows the restoration of endocrine function in most cases and its hormonal effect can last up to 10 years if the tissue is replaced regularly. During tissue harvesting, transplantation and revascularization processes, part of the follicular reserve is lost due to ischemia processes, which can

result in menopause years before what would be natural for each woman. In order to reduce this damage, molecules such as VEGF and S1F allow the increase of vascular density and accelerate the revascularization process, thus making this technique more profitable.

Conclusion

Despite being a more physiological solution, this technique is expensive and invasive and, therefore, only indicated in specific cases. The target population for this procedure is women who use it both to treat medically induced menopausal symptoms and to restore fertility, and thus it is more appealing and cost-effective.

Keywords

Menopause; cryopreservation and transplantation of ovarian tissue; hormone replacement therapy; future.

Folha em branco

Índice

Declaração de integridade	iii
Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vii
Prefácio	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xiv
Índice	xvii
Lista de Figuras	xx
Lista de Tabelas	xxii
Lista de Acrónimos	xxiv
Capítulo 1. Introdução	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Menopausa: as mudanças físicas e emocionais	2
1.2.1 Definições e Fisiopatologia	2
1.2.2 Manifestações clínicas	3
1.2.3 Diagnóstico e tratamento	5
1.3 THM clássica: formulações e efeitos adversos	6
1.4 História do Transplante autólogo de tecido ovárico criopreservado.....	8
1.5 As várias aplicações da terapia hormonal na menopausa com tecido ovárico criopreservado.....	10
1.6 Criopreservação e transplante de tecido ovárico	11
1.6.1 As diferentes técnicas	11
1.6.2 Fatores que influenciam a função do excerto.....	13
Capítulo 2. Objetivos.....	15
Capítulo 3. Metodologia.....	16
Capítulo 4. Resultados e Discussão.....	17
4.1 Terapia Hormonal na menopausa farmacológica <i>vs</i> Terapia Hormonal na menopausa com tecido ovárico	17
4.2 O eficácia do transplante autólogo de tecido ovárico criopreservado na restauração da função endócrina	18
4.3 Influência da remoção de tecido ovárico na reserva ovárica e na idade natural da menopausa em mulheres saudáveis	20
4.4 Duração do transplante ovárico de tecido criopreservado	21

4.5 Recetividade da população feminina ao uso de tecido ovárico criopreservado como THM.....	22
4.6 Novas técnicas de criopreservação e transplante ovárico.....	23
Capítulo 5. Conclusão e Perspetivas futuras	26
Referências bibliográficas.....	30

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática das hormonas ováricas na idade reprodutiva, na pós-menopausa e sob THM. (3).....	8
Figura 2 - Linha cronológica representativa da evolução da criopreservação e transplante de tecido ovárico. (2).....	9
Figura 3- A restauração da reserva ovárica após o transplante de tecido ovárico criopreservado. (5).....	19

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1- THM farmacológica <i>vs</i> THM tecidual.....	17
---	----

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AVC	Acidente vascular cerebral
CTO	Criopreservação de tecido ovárico
EPO	Eritropoetina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormona de estimulação folicular (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
GHM	Gonadotrofina humana menopáusica
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IOP	Insuficiência ovárica prematura
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
LH	Hormona luteinizante (<i>Luteinizing Hormone</i>)
MPA	Midroxiprogesterona
OUL	Ooforectomia unilateral
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SGUM	Síndrome génito-urinária da menopausa
SVM	Sintomas vasomotores
TEV	Tromboembolismo venoso
TGL	Triglicédeos
THM	Terapia hormonal na menopausa
TTO	Transplante tecido ovárico
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
vs	<i>versus</i>
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

Folha em branco

Capítulo 1. Introdução

1.1 Contextualização

No passado século, devido a avanços significativos na saúde pública, a esperança média de vida passou de 48,3 anos para os 80 anos, significando que as mulheres passam agora um terço da sua vida na menopausa (5,7). Durante esta fase da vida, a mulher pode apresentar alguns sintomas desagradáveis, tanto físicos como psicológicos, e cabe ao médico tratar estes sintomas e prevenir doenças inerentes à falta de estrogénios, como a osteoporose e a aterosclerose. (3,10)

O aparecimento tardio da menopausa (acima dos 55 anos) está associado a um aumento da longevidade e diminuição da mortalidade, pelo menor risco cardiovascular e de osteoporose. (3) Assim, torna-se crucial desenvolver estratégias que prolonguem ao máximo a exposição da mulher às hormonas ováricas. A terapia hormonal na menopausa (THM) é o tratamento *standard*. (4) Esta terapêutica não é 100% eficaz e a sua eficácia depende de vários fatores como a frequência da toma, a dosagem e a hora de administração. No entanto, não depende da regulação do eixo hipotálamo-hipófise como as hormonas fisiológicas, pelo que a sua farmacocinética é diferente. (4)

Apesar de ajudar no controlo dos sintomas da menopausa, a THM não é capaz de substituir, na totalidade, a função endócrina de um ovário, que também produz testosterona, activina, inibina, hormona anti-mulleriana e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), tornando o ovário um órgão hormonalmente dinâmico. (3)

Deste modo, foi proposto por vários autores, o uso de tecido ovárico criopreservado para o tratamento dos sintomas da menopausa. Esta é já uma técnica amplamente utilizada para preservação da fertilidade em mulheres submetidas a tratamentos oncológicos, visto que, com o avanço tecnológico no diagnóstico e tratamento e com o aumento da esperança média de vida das sobreviventes, estas mulheres tem uma maior probabilidade de desenvolver insuficiência ovárica prematura (IOP) e infertilidade. (4,9). Esta técnica pode, assim, ser crucial nas doentes oncológicas para preservação da fertilidade e, provavelmente, como tratamento hormonal da menopausa precoce (4).

O ovário pode ser dividido em duas regiões: o córtex e a medula. Na região cortical está presente cerca de 90% da reserva folicular. (4) Esta distribuição folicular é conveniente

para a recolha do tecido ovárico, pois torna-o mais acessível. Em primeiro lugar, é removida a totalidade ou “pedaços” do córtex ovárico, e estes são criopreservados. Anos mais tarde, são descongelados e transplantados para um local ortotópico (pélvico) ou heterotópico (fora da pélvis: subcutâneo, extremidades, retroperitoneal ou na parede abdominal). (1)

Em raparigas pré-púberes que necessitem de técnicas de preservação de fertilidade, a criopreservação e transplante de tecido ovárico parecem ser a única opção, tendo em conta que estas ainda não conseguem produzir oócitos maduros, pelo que não são viáveis as técnicas convencionais de preservação de fertilidade. (17) Este novo procedimento consiste em “parar” o desenvolvimento folicular no estágio onde se encontram, e preservar folículos ainda em desenvolvimento. (4). O transplante do córtex ovárico, previamente criopreservado, mostrou restaurar a função ovárica em 95% dos casos e já permitiu o nascimento de pelo menos 130 nados vivos, e cerca de metade decorreram de gravidezes espontâneas. (4). Com transplante do córtex ovárico, mesmo na menopausa, o crescimento folicular é garantido e evitam-se fases de baixa concentração de estrogénio, ao contrário do que acontece na THM, que para além de necessitar de concentrações altas de estrogénio, é necessário que a administração hormonal seja prolongada (7). Para além disso, os efeitos favoráveis da THM dependem diretamente do momento em que a terapêutica é iniciada. Se na peri e pós menopausa inicial há uma diminuição do risco para aterosclerose, no entanto já se iniciada tardiamente (> 60 anos) este risco pode aumentar. (3,7)

1.2 Menopausa: as mudanças físicas e emocionais

1.2.1 Definições e Fisiopatologia

A menopausa corresponde à última menstruação, confirmada após 12 meses sucessivos de amenorreia, sem outra causa demonstrável. Esta pode ser espontânea/natural, ou seja, não estar associada à influência de agentes externos, ou secundária/induzida/artificial se após ooforectomia bilateral, radioterapia (RT) pélvica ou quimioterapia (QT). (10,12)

A perimenopausa é o período de transição, da idade fértil até um ano após a menopausa, caracterizado por alteração nos ciclos menstruais e sintomas vasomotores. (12) A pós-menopausa pode ser dividida em dois períodos: a menopausa precoce, nos primeiros 6 anos e a menopausa tardia no período posterior a esse. (10)

A classificação da menopausa varia de acordo com a idade de surgimento desta. Em 95% das mulheres, a menopausa surge entre os 45 e 55 anos, sendo que a idade média é aos 51 anos, e esta é determinada por fatores genéticos e pelo estilo de vida. Considera-se menopausa precoce quando ocorre antes dos 45 anos, mas se antes dos 40 anos é classificada de insuficiência ovárica prematura (IOP). A ocorrência da menopausa após os 55 anos é denominada de menopausa tardia. (10)

O folículo é a unidade funcional do ovário. (4,10) Durante a vida da mulher, tanto o número como a qualidade das células germinativas primordiais vão diminuindo consideravelmente e progressivamente. Uma recém-nascida possui, em média em cada ovário, 1 milhão de folículos primordiais, 100,000 aos 20 anos e 65,000 aos 25 anos. No momento da menopausa, a reserva folicular é baixa, com cerca de 1500 folículos primordiais estando a grande maioria inativa. (5,11). Durante a fase folicular, cerca de 90% do estrogénio é produzido pelo folículo dominante pré-ovulatório que na fase lútea, através do corpo amarelo, vai ser responsável pela produção de progesterona. (4)

A menopausa corresponde ao esgotamento do património folicular funcionante do ovário, ou seja, à falência ovárica definitiva, o que resulta numa diminuição de estrogénios e progesterona, e, conseqüente aumento de FSH e LH, com redução dos níveis de hormona anti-mulleriana, actina e inibina. (10)

1.2.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da menopausa dependem diretamente do hipostrogenismo que afeta os órgãos e sistemas dependentes de estrogénio, entre eles, a mama, o endométrio, a vulva, a vagina, o cérebro, a pele, o osso e o perfil lipídico. (10)

As primeiras manifestações clínicas do climatério e, simultaneamente, as mais comuns (75%) são os sintomas vasomotores (SVM), que surgem, habitualmente, na perimenopausa e na menopausa precoce. São comumente descritos como “calores, afrontamentos, suores noturnos” e retratam uma sensação de calor na extremidade superior do corpo acompanhada de vermelhidão da face, pescoço e tronco, seguido de sudorese. O início é súbito, dura 2 a 4 minutos, ocorre até 20 vezes por dia, é de predomínio noturno e apenas 20 a 30% dos casos são suficientemente intensos e requerem tratamento. (10,12) Em média, os sintomas vasomotores persistem por 4 a 5 anos e num quarto das mulheres podem manter-se por 10 anos. (14) Estes sintomas

são, por norma, mais intensos se a menopausa é secundária a uma ooforectomia bilateral ou se a mulher é de descendência afro-americana. (10,15)

Em consequência do predomínio noturno dos sintomas vasomotores, estes acabam por alterar a qualidade do sono (perturbações do sono) que, por sua vez, levam a alterações do humor como a ansiedade e, posteriormente, a depressão agravando a qualidade do sono. (10)

O hipoestrogenismo resulta na atrofia dos tecidos génito-urinários (4-47%) e à chamada síndrome génito-urinária da menopausa (SGUM). Esta é caracterizada pela secura vaginal, irritação, ardor, e prurido vulvar, dispareunia, disfunção sexual e sintomatologia urinária como a disúria, polaquiúria, incontinência urinária (26-40%) e infeções do trato urinário recorrentes. (3,12,13) Para a resolução da síndrome génito-urinária a Sociedade Portuguesa de Ginecologia, a *American College of Obstetricians and Gynaecologists* e a *North American Menopause Society* recomendam o uso de estrogénios tópicos de baixa dosagem. (19,20,55)

De acordo com a *American Heart Association*, a longo prazo, as baixas concentrações de estrogénio acarretam consequências metabólicas e cardiovasculares que são a principal causa de morte na pós-menopausa (16). O hipoestrogenismo influencia o perfil lipídico, aumentando a LDL e TGL e diminuindo a HDL séricas. Estas alterações provocam disfunção endotelial que está associada a várias patologias crónicas da menopausa. (10) A síndrome metabólica é uma delas e acarreta um risco cardiovascular seis vezes superior, comparativamente, às mulheres em idade fértil. (3) Adicionalmente, esta síndrome está associada à resistência à insulina, à diabetes *mellitus* tipo 2, à hipertensão, à obesidade central, à doença arterial periférica e à doença cerebrovascular. (55)

Durante a idade fértil, as mulheres têm um risco inferior ao dos homens de desenvolver doença arterial coronária. Com o surgimento da menopausa, este risco parece ser igual entre os sexos. A razão para tal acontecimento parece estar no estrogénio, que melhora a função endotelial e promove a vasodilatação. (3,55)

Mais de 75 % da massa óssea perdida durante a menopausa parece ser atribuída ao declínio dos níveis de estrogénio e não ao envelhecimento por si só. (3,18) Os estrogénios exercem uma ação supressiva constante na remodelação óssea. O risco de sofrer uma fratura na pós-menopausa chega a ser o dobro de desenvolver cancro da

mama durante a vida inteira. No entanto, é importante salientar que a THM não é tratamento de primeira linha para a prevenção de fraturas relacionadas com a diminuição da densidade óssea e osteoporose da menopausa, mas parece diminuir este risco quando comparada com placebo. (3)

1.2.3 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da menopausa é clínico. Por esta razão, não são realizados doseamentos hormonais por rotina. Deste modo, se estamos perante uma mulher saudável com idade superior a 45 anos, com 12 meses de amenorreia e estando ou não associado a outros sintomas da menopausa, e sem outras patologias, é seguro fazer-se o diagnóstico de menopausa, no entanto, há que excluir causas secundárias como a gravidez, disfunção tiroidea e hiperprolactinemia. (10)

Para o tratamento dos sintomas da menopausa, a administração de estrogénio é essencial, mas se usado isoladamente, aumenta o risco de hiperplasia endometrial e cancro do endométrio e, por isso, na mulher pós-menopausa com útero deve ser adicionado um progestativo que contrarie os efeitos proliferativos dos estrogénios no endométrio, oferecendo, deste modo, proteção endometrial. (3,10).

Existem vários tipos de tratamento dos sintomas da menopausa: as preparações hormonais e as não hormonais, como os fitoestrogénios (derivados de plantas com efeitos estrogénicos), extratos de pólen, mudanças de estilo de vida e até antidepressivos, como a paroxetina, podem ajudar no controlo dos sintomas vasomotores da menopausa. (10,12)

A THM é a terapêutica mais eficaz no controlo dos SVM e SGUM. (12) Esta parece reduzir a frequência e severidade dos SVM, que estão presentes em 60 a 80% das mulheres pós-menopausa e causam uma redução significativa do bem-estar e qualidade de vida. (3) Esta terapêutica é segura e eficaz em mulheres de baixo risco, sem doença coronária de base, história de cancro da mama, idade inferior a 60 anos e cuja menopausa se instalou há menos de 10 anos. (21)

Existem várias vias de administração da THM, que podem variar conforme os sintomas da mulher, as suas preferências, contraindicações, idade, tempo de menopausa e a estratificação de risco cardiovascular e de cancro da mama. (10) A via oral é a mais

utilizada, mas a transdérmica é preferível, por estar associada a um risco de TEV inferior. (22) Por outro lado, a via vaginal é mais eficaz no tratamento da SGUM. (12)

1.3 THM clássica: formulações e efeitos adversos

A THM era amplamente usada nos anos 90, mas um estudo de 2002, o *Women's Health Initiative* (WHI) determinou haver um risco acrescido para cancro da mama, nas mulheres que usavam THM com progestativo. (32) No entanto, este estudo continha um viés pois a maioria da amostra que desenvolveu cancro tinha idade superior a 60 anos. A análise posterior deste estudo veio a demonstrar que o *timing* de início da THM influencia os seus efeitos clínicos. Se iniciada aquando do início da menopausa, e antes dos 60 anos, oferece maior proteção para demência e doença cardíaca. (4,32)

Em 1992, a *American College of Physicians* recomendou a THM para a prevenção da doença coronária, mas estudos realizados nos anos posteriores demonstraram haver mais riscos do que benefícios no uso deste tratamento com fins preventivos. (5,33) Já em 2013, Lobo *et al* concluíram, com a análise de estudos mais recentes, que o uso prolongado de THM não só diminui o risco de doença coronária e de todas as causas de mortalidade, como também não aumenta significativamente os riscos para a saúde da mulher. (34)

Existem várias preparações de THM à base de estrogénio e combinada com progestativo que variam nas preparações, dosagens e formas de administração, cada uma com os seus riscos e benefícios, mas nunca substituindo a função de um ovário. Não há forma de determinar a quantidade ótima de hormonas a administrar porque a fisiologia ovárica é dinâmica e cada mulher desenvolve sintomas de forma independente do seu clima hormonal. (3)

Parece haver benefícios superiores na terapêutica hormonal apenas com estrogénio *vs* terapêutica combinada. O uso singular de estrogénio, usado em mulheres sem útero, aumenta a qualidade de vida, reduz sintomas da menopausa, reduz a osteoporose e o risco cardiovascular em cerca de 40%, para além de reduzir em 20% o risco de desenvolver cancro, em mulheres dos 50 aos 59 anos. (4,35,36)

O tipo de progestativo usado na THM também parece ter importância clínica, visto que o uso de Medroxiprogesterona (MPA) parece aumentar o risco de AVC, demência,

embolia pulmonar e cancro da mama, o que já não se sucede tanto com o uso de Acetato Noretisterona e Progesterona micronizada. (3,7,36)

Mais recentemente, começaram a ser produzidas as chamadas hormonas bio-idênticas que derivam de extratos naturais, por exemplo plantas, e são modificadas em laboratório para obter a função das hormonas endógenas. No entanto, ainda não há estudos suficientes que comprovem a eficácia superior desta terapia em comparação com a THM clássica. (3)

Existem vários efeitos adversos com o uso de THM farmacológica. O tromboembolismo venoso (TEV) é um deles e neste há formação de trombos nas veias profundas dos membros inferiores e no caso de embolização pulmonar pode apresentar sério risco de vida. Nos primeiros dois anos de uso de THM, o risco de desenvolver TEV é o dobro da população em geral. O uso de estrogénio transdérmico acarreta um risco inferior e a sua adição na terapia à base de progesterona micronizada não parece aumentar o risco. Assim, antes da administração da THM a avaliação do risco tromboembólico deve ser sempre ponderado. (3,37)

Também o risco de desenvolver cancro da mama parece variar conforme a formulação da THM. Terapêuticas à base de estrogénio estão associadas a um risco inferior quando comparadas com terapêuticas combinadas. Ademais, o progestativo usado tem influência neste risco, sendo preferível a progesterona micronizada. Deste modo, a THM não parece estar associada a um risco importante de cancro da mama mas deve ser evitada em mulheres de elevada suscetibilidade para a patologia. (44)

Durante a sua vida, a mulher tem um risco de 1-1,5% de ser diagnosticada com cancro ovárico, mas este aumenta com o uso THM, mesmo que por curtos períodos de tempo (inferior a cinco anos) e prolonga-se por dez anos após a descontinuação da terapêutica. (39) Já o cancro do endométrio é o carcinoma ginecológico com maior prevalência na vida da mulher, nos países desenvolvidos, (2-3%) e o risco aumenta com o uso de estrogénios mas é praticamente anulado se aliado à progesterona. (3,40)

Existem várias contraindicações absolutas para o uso de THM, como o enfarte do miocárdio e AVC recente, cancro da mama, entre outras, e contraindicações relativas, tais como: porfíria, antecedente de TEV, doença hepática ativa, doença da vesícula biliar, hipertriglicidémia. (3)

Para além de a THM apenas providenciar duas hormonas, o estrogénio e a progesterona, a farmacocinética desta terapêutica deixa muito a desejar quando comparada com a de um ovário na pré-menopausa. (3) Como podemos verificar na figura 1, os níveis hormonais sob THM são estáveis, ao contrário dos produzidos pelo ovário na idade reprodutiva, sendo estes pulsáteis.

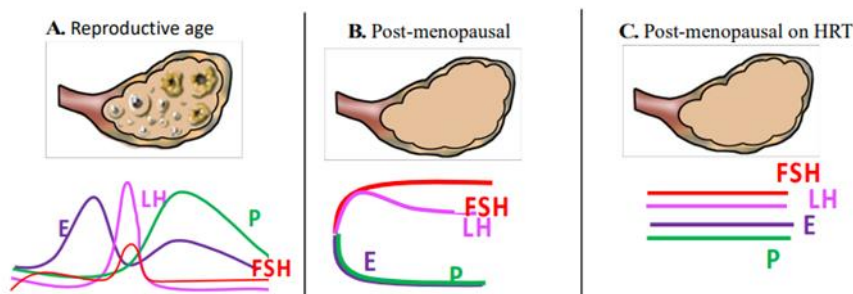


Figura 1- Representação esquemática das hormonas ováricas na idade reprodutiva, na pós-menopausa e sob THM. (3)

O transplante de tecido ovárico afigura-se uma técnica promissora na terapêutica hormonal da menopausa por, teoricamente, respeitar a normal fisiologia hormonal da mulher, sendo potencialmente menos suscetível a efeitos secundários.

1.4 História do Transplante autólogo de tecido ovárico criopreservado

Durante a década de 50, começou a ser testado, em modelos animais (ratos), a técnica de CTO, mas por falta de criopreservantes eficazes, obtiveram-se resultados muito aquém do esperado. Até 1970, o único criopreservante disponível era o glicerol, que provocava a morte de cerca de 90% dos folículos primordiais recolhidos, tornando assim a técnica não rentável. Foi então que surgiram novos criopreservantes como o propanediol, o etilenoglicol e o sulfóxido de dimetilo.(2)

Em 1990, através do uso de melhores técnicas e de criopreservantes mais modernos, foi possível, em roedores, restaurar a fertilidade e a função endócrina através do uso de fragmentos de córtex ovárico. (2) Devido à sua maior semelhança com o ovário humano, foram usados ovários de ovelhas e, com recurso a sulfóxido de dimetilo, foi alcançada a primeira gravidez após transplante ovárico em animais no ano de 1994. (25)

Em 1996, Hovatta *et al.* com recurso a sulfóxido de dimetilo e propanediol provaram que os folículos primordiais conseguem sobreviver um tempo prolongado considerável. (26). Também Oktay *et al.* demonstraram através de um estudo *in vitro*, que o uso de criopreservantes modernos permite a sobrevivência e viabilidade dos folículos primordiais do tecido ovárico criopreservado. (27)

Em 1997, o Dr. Oktay começou a criopreservar tecido ovárico de pacientes com cancro e no ano seguinte, a pedido de uma paciente que já tinha tecido ovárico criopreservado e que queria reaver a sua função endócrina ovárica, este médico começou a aperfeiçoar a sua técnica laparoscópica para a cirurgia de transplante. Mas foi só no ano seguinte, que com recurso ao primeiro protótipo de um robô cirúrgico (AESOP), o Dr. Oktay conseguiu realizar o transplante de ovário com sucesso e com a administração diária de gonadotrofinas (FSH e LH), nos primeiros 15 dias, foi possível atingir o crescimento folicular e a ovulação e manter a função endócrina nos 6 meses seguintes. (2)

Depois de provar que o transplante ovárico era possível em humanos, Oktay *et al.* decidiram aplicar esta tecnologia de forma heterotópica, pois a transplantação pélvica nem sempre é possível e acarreta mais riscos. Em primeiro lugar, foi transplantado tecido ovárico para o antebraço e posteriormente para o tecido subcutâneo da parede abdominal anterior. (2) Em ambos os casos, foi restaurada a função ovárica, o desenvolvimento folicular e foi possível a recolha de óocitos e o desenvolvimento de embriões, este último apenas em 2004. (28) Todos estes marcos importantes, que representam a evolução da criopreservação e transplante de tecido ovárico estão representados na figura 2.

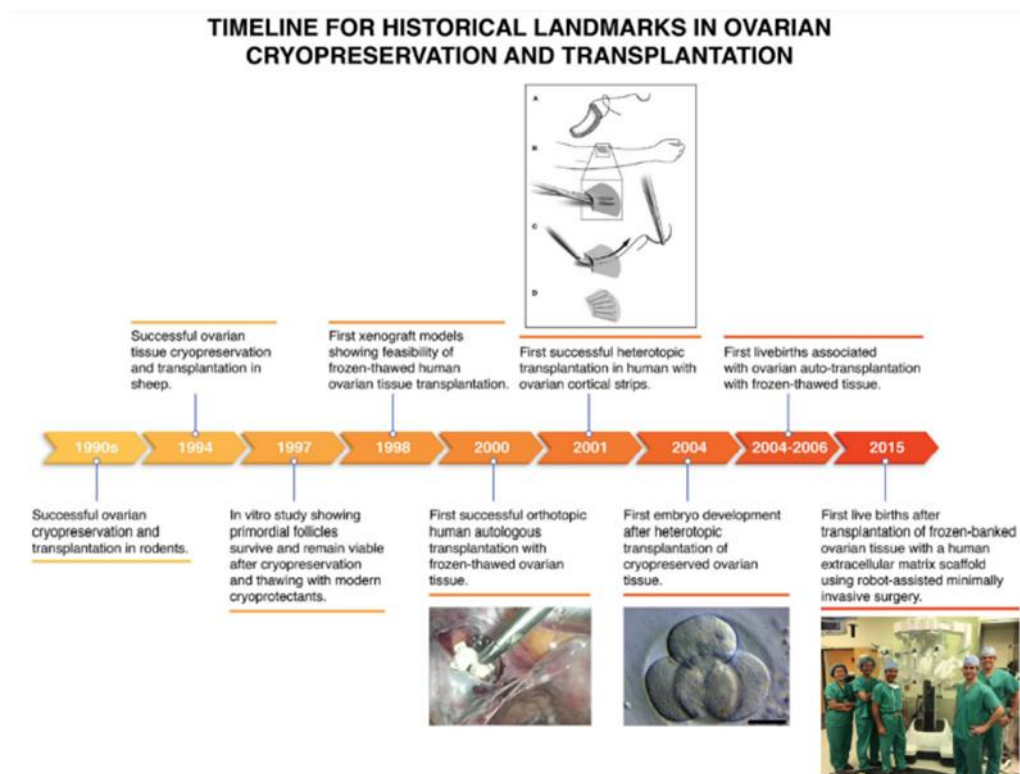


Figura 2 -Linha cronológica representativa da evolução da criopreservação e transplante de tecido ovárico.(2)

O número exato de transplantes de tecido ovárico (fresco ou criopreservado) parece incerto, mas esta técnica já foi replicada em vários pontos do globo, como por exemplo: EUA, Israel, França, Japão e até mesmo em Portugal. (8)

Em 2004, no Hospital de São João foi realizada, pela primeira vez em Portugal, a recolha de tecido ovárico e criopreservação do mesmo. Esta técnica foi aplicada numa jovem de 18 anos, submetida a uma anexectomia do lado esquerdo para tratamento de quisto ovárico de grandes dimensões. Durante a exploração do campo cirúrgico pélvico notou-se a ausência de ovário direito. Deste modo, após a cirurgia esta jovem entrou em IOP, e surgiu a vantagem de preservar parte do córtex ovárico, com vista a futura implantação do mesmo. (30). Após confirmação da menopausa, com os doseamentos de FSH e estradiol, foi iniciada a pilula contraceptiva para tratamento dos sintomas vasomotores experienciados. Em janeiro de 2015, ocorreu a transferência do tecido ovárico para local ortotópico (bolsa no peritoneu). Uma semana depois, os níveis de FSH tinham diminuído e os de estradiol aumentado. Os sintomas vasomotores desapareceram e o período menstrual retomou e foi possível a criopreservação de um embrião. (30)

A evolução das técnicas cirúrgicas parece ser a chave para o aumento da eficácia do transplante ovárico. Contudo, devido ao escasso número de procedimentos realizados muitas das abordagens permanecem ainda experimentais.

1.5 As várias aplicações da terapia hormonal na menopausa com tecido ovárico criopreservado

Com recurso à criopreservação e autotransplante de tecido ovárico esta técnica pode ser aplicada para várias finalidades, o restauro da fertilidade, o atraso da menopausa, a indução da puberdade, e também o uso como THM (1).

As principais vantagens no uso de tecido ovárico para restauração de fertilidade, prendem-se no facto de não serem necessários tratamentos de estimulação ovárica antes da recolha de tecido e este procedimento ser independente da idade da doente, sendo por isso possível também preservar a fertilidade de doentes pré-púberes (17).

Esta técnica, pode ser usada, ao invés da THM farmacológica, para a indução da puberdade, permitindo alcançar o surto de crescimento e caracteres sexuais

secundários, característicos desta fase hormonal tão crítica no desenvolvimento físico e psicológico da mulher. Para a indução da puberdade são necessários apenas 10 a 20% de um ovário. Assim, parece óbvia a indicação de THM, farmacológica ou com tecido ovárico criopreservado, em raparigas pré púberes que por motivos variados (induzidos, genéticos....) não conseguem atingir a puberdade espontaneamente e necessitam de atingir níveis fisiológicos de hormonas sexuais. Um estudo de Ernst *et al.* de 2013, provaram que o tecido ovárico transplantado produz concentrações altas e constantes o suficiente para induzir e manter na puberdade raparigas submetidas a tratamentos oncológicos. (7,31). No entanto, atualmente, ainda parece ser preferível a THM farmacológica, por ser mais barata, segura e dispensar procedimentos cirúrgicos. (4)

1.6 Criopreservação e transplante de tecido ovárico

1.6.1 As diferentes técnicas

A criopreservação de tecido ovárico recolhe excertos de tecido ovárico com folículos no estágio primordial. Posteriormente, alguns destes folículos sobrevivem à fase de congelamento e descongelamento e progridem para a fase folicular. Os excertos de tecido ovárico possuem um tempo de vida útil muito reduzido, pois são sensíveis a processos de isquemia aquando do descongelamento e transplante, o que provoca atresia folicular. (8)

Devido há presença de fatores angiogénicos endógenos e a um processo de fácil neovascularização, o ovário é um órgão simples de transplantar. Idealmente, o tecido é colhido, por via laparoscópica, numa mulher em idade jovem (20-25 anos) visto que é a altura em que a reserva ovárica está mais alta. (5) Posteriormente, os fragmentos de córtex ovárico recolhidos são transplantadas para um dos diferentes locais possíveis: heterotópico e ortotópico, aquando do surgimento natural da menopausa. (1,8,9)

O transplante ortotópico implica a implantação de tecido ovárico no local de origem ou na cavidade pélvica. Este método é o preferido se o objetivo for a restauração da fertilidade e uma gravidez sem recurso a técnicas de reprodução assistida. (8) Com base num estudo de Donnez & Dolmans *et al.* foi possível comprovar que a cavidade pélvica reúne as condições de temperatura, pressão e fornecimento sanguíneo ótimos para o desenvolvimento folicular, ainda que dependa de um procedimento cirúrgico que não está isento de riscos, como a formação de adesões cirúrgicas. (41)

O transplante heterotópico baseia-se na implantação do tecido ovárico numa região extra-ovárica, como por exemplo: a parede abdominal, o antebraço, a cápsula do rim e a mama Kim *et al.* demonstraram que se o objetivo for a restauração de função endócrina e não de fertilidade, a reimplantação em local heterotópico é mais fácil e efetiva, sendo também capaz de produzir níveis altos de progesterona. (4,5,56). A cápsula do rim é um excelente local de implantação, devido à excelente irrigação sanguínea deste órgão, apesar dos folículos terem grande capacidade de adaptação à isquemia e atresia folicular, inerente do tempo necessário para a revascularização. Contudo, a implantação subcutânea é aquela com mais vantagens, se o objetivo for a restauração da função hormonal e não da fertilidade. O facto de ser subcutâneo, facilita o processo de renovação, por ser feito apenas com anestesia local e no caso de crescimento de células anómalas, a tira pode ser facilmente removida. (1,8) As vantagens deste tipo de transplante incluem a fácil acessibilidade ao excerto, menor risco cirúrgico, capacidade melhorada de recolha de tecido cortical e não há necessidade para anestesia geral. Ao contrário do transplante intraperitoneal, a implantação em locais extra ováricos não permite condições de temperatura, pressão, fatores parácrinos e irrigação ótimos para o melhor desempenho endócrino do tecido ovárico, mas não permite uma conceção espontânea, como no transplante ortotópico. (8) Uma vantagem partilhada pelas técnicas ortotópica e heterotópica é a produção de concentrações hormonais mais baixas que na THM farmacológica, para surtir o mesmo efeito. (4)

Para realizar a implantação subcutânea é transferida uma única tira de tecido ovárico criopreservado sendo esta, regularmente, substituída quando a sua função hormonal começa a dissipar-se. (1) As dimensões ideais do excerto ainda não são conhecidas, pois os valores são díspares entre estudos, mas um tamanho inferior a 2x2 mm não permite uma boa função. (42) Após 4 a 5 meses do transplante de tecido ovárico os níveis de estradiol aumentam e os de FSH e LH diminuem para valores pré menopausa, juntamente com o desaparecimento de SVM e aparecimento de um ciclo menstrual regular. (4)

Em pacientes com doenças autoimunes ou genéticas, o transplante autólogo não é possível e estas mulheres tem de recorrer a tecido alogénico, ou seja, de outras mulheres. (8) Silber *et al.* demonstraram, num par de gémeas monozigóticas, o início do ciclo menstrual ovulatório e nível normal de FSH, 77-142 dias após o transplante de tecido ovárico fresco entre as irmãs. Adicionalmente, foram reportados dois nados

vivos após o transplante de tecido ovárico fresco e outro com recurso a tecido ovárico criopreservado. (43)

1.6.2 Fatores que influenciam a função do excerto

Vários fatores exercem influência sobre a função endócrina do excerto de tecido ovárico, entre eles o tempo de revascularização e, conseqüente período de isquemia, a grossura do excerto, a quantidade de tecido utilizado, entre outros.

Vários estudos confirmam uma perda de menos de 10% da reserva folicular no processo de congelamento e descongelamento do tecido ovárico. Contudo, a maioria das perdas ocorre no processo de revascularização. Menos de um quarto dos folículos recolhidos tornam-se funcionais depois da transplantação, ou seja, o autotransplante não permite um retorno total à fertilidade do momento da recolha. (1)

A isquemia, resultante do período necessário para a revascularização, é a perfusão insuficiente, redução do fluxo sanguíneo, depleção do armazenamento de energia celular e acumulação de tóxicos do metabolismo, que podem levar à morte celular. (45) O principal mecanismo que explica a lesão por isquemia são os danos nos lípidos, DNA, enzimas e proteínas estruturais que ativam uma resposta isquémica-inflamatória com migração de macrófagos e neutrófilos, resultando em destruição e fibrose do tecido. Se os tempos de isquemia forem superiores a vários dias, o dano provocado nos folículos pode ser irreversível. (8) Um estudo em ratos permitiu demonstrar o papel da isquemia na depleção da reserva ovárica, já que esta diminuiu quando foi usado tecido ovárico criopreservado *vs* tecido fresco, para o posterior transplante nestes animais. (46)

A posição anatómica dos folículos em relação ao ovário, na camada superficial, permite que estes beneficiem de imediato com a formação de novos vasos. Assim, avanços científicos na neovascularização parecem ser o melhor mecanismo para prevenção da isquemia e subseqüente perda de reserva folicular. (8)

Por outro lado, a grossura do excerto deve ser a conveniente, de maneira a permitir a penetração completa dos criopreservantes e, deste modo, aumentar a sobrevivência do excerto e minimizar o número de folículos perdidos. Protocolos recentes apontam para uma espessura de 1 a 2 mm como sendo a ideal para os processos de congelamento lento ou vitrificação, e impedir a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento. Uma espessura inferior a 1 mm mostrou não

aumentar a perfusão de oxigénio pelo excerto mas pelo contrário, aumentou a perda de folículos primordiais e não melhorou o processo de neovascularização. (8)

Adicionalmente, a quantidade de tecido usado exerce influência na reserva folicular preservada e conseqüente função endócrina pretendida. A técnica atual utiliza fragmentos do córtex do ovário o que apenas permite conservar uma parte da reserva folicular. O transplante de ovário inteiro pode ser uma solução para este problema, já que restaura a totalidade dos folículos primordiais. Além do mais, com esta técnica a revascularização torna-se mais fácil já que não envolve somente o córtex mas todo o pedículo vascular do ovário. (8)

Porém, o transplante do ovário como um todo tem várias desvantagens tais como:

- Risco superior de lesão no processo de criopreservação, visto que a espessura superior impede a difusão homogénea dos produtos criopreservantes.
- Lesão da vasculatura aquando da criopreservação.
- Dificuldade da anastomose cirúrgica devido ao tamanho reduzido da artéria ovárica (0,5mm de diâmetro) e do pedículo vascular (5 cm de comprimento).
- Risco superior de complicações vasculares pós-operatório como por exemplo: hemorragia na anastomose, pseudoaneurisma, estenose e trombos microvasculares.
- Risco de perda total do ovário.

Capítulo 2. Objetivos

Com este trabalho pretende-se investigar a eficácia da criopresevação do tecido ovárico na resolução dos sintomas vasomotores, nas seguintes vertentes:

- 1- Comparada com a THM farmacológica;
- 2- Possibilidade da restauração da função endócrina;
- 3- Influência da remoção de tecido ovárico na reserva ovárica e idade natural da menopausa;
- 4- Duração do transplante de tecido ovárico como THM;
- 5- Aceitabilidade da população feminina à técnica;
- 6- Novas formas de melhorar a criopreservação de tecido ovárico para resolução de SVM;

Capítulo 3. Metodologia

Foi realizada uma ampla pesquisa bibliográfica, recorrendo à plataforma digital PubMed. A pesquisa foi realizada entre outubro de 2022 e janeiro de 2023 e foram usadas as seguintes palavras-chave: menopausa; criopreservação e transplante tecido ovárico; terapia hormonal de substituição.

Como critérios de inclusão foram usados os seguintes: sexo feminino, artigos dos últimos 5 anos, estudos apenas em humanos e idioma inglês ou português. Foram definidos como critérios de exclusão artigos referentes maioritariamente a pacientes oncológicos e sobre a preservação da fertilidade.

Adicionalmente, foram consultados pareceres e *guidelines* do Consenso de menopausa da Sociedade Portuguesa de Ginecologia, da *American Society of Reproductive Medicine*, *American College of Physicians*, *American College of Obstetricians and Gynaecologists* e *North American Menopause Society*.

Capítulo 4. Resultados e Discussão

4.1 Terapia Hormonal na menopausa farmacológica vs Terapia Hormonal na menopausa com tecido ovárico

A THM farmacológica é uma terapêutica amplamente utilizada há várias décadas, por ser tão eficaz no tratamento de SVM e não apresentar efeitos adversos significativos. Esta é também barata e as diferentes formulações existentes permitem uma boa adaptação para cada mulher. A THM tecidual tenciona tornar-se uma técnica mais fisiológica e resolver falhas da THM farmacológica. Com a tabela 1 pretende-se comparar a THM farmacológica com a THM tecidual, avaliando as duas técnicas em diferentes parâmetros e, desta forma, concluir qual será o procedimento com melhor relação risco-benefício.

	THM farmacológica	THM tecidual
Hormonas secretadas	Estrogénio e progesterona	Estrogénio,progesterona,inibina,relaxina,an drogéneos,hormona antimulleriana, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
Tipo de secreção hormonal	Plateau	Pulsátil
Finalidades	Tratamento sintomas da menopausa, indução da puberdade.	Restauração da fertilidade, tratamento sintomas da menopausa, indução da puberdade e atraso da menopausa.
Idade ótima	Idealmente iniciada nos primeiros 10 anos da menopausa e não depois dos 60 anos.	A recolha de tecido deve ser realizada entre os 20 e 25 anos. A implantação deve ser feita aquando do início dos sintomas.
Duração	Enquanto for administrado o fármaco.	Incerta, depende mulher para mulher. Pode atingir os 10 anos.
Eficácia	Superior à THM tecidual.	Permite restaurar a função endócrina na maioria dos casos.
Riscos	Apresenta vários efeitos adversos: TEV, cancro do ovário, etc.	Associado a risco cirúrgico. São reportadas complicações sérias em 2 a 7,1 mulheres por cada 100 submetidas a laparoscopia de

		recolha de córtex ovárico.
Interrupção tratamento	Pode ser interrompida a qualquer momento.	Após recurso a técnicas cirúrgicas, processo mais demorado.
Custos	Terapêutica amplamente usada.Custo baixo.	Procedimento bastante dispendioso, inclui custos cirúrgicos, armazenamento de tecido criopreservado e, possivelmente, a reimplantação.

Tabela 1- THM farmacológica vs THM tecidual (3,4,5,7,9,21,47).

Outros tratamentos para a menopausa tem-se demonstrado eficazes e mais seguros que o uso de fármacos. São bons exemplos a terapia cognitiva e de comportamento, *mindfulness*, exercício físico regular entre outros. (48)

4.2 O eficácia do transplante autólogo de tecido ovárico criopreservado na restauração da função endócrina

Em 1999, Oktay *et al.* realizaram o primeiro autotransplante de tecido ovárico criopreservado, cujo objetivo era aliviar os sintomas da menopausa que não eram tratados com sucesso usando THM. (1,57) O primeiro ovário foi removido aos 17 anos e aos 28 anos foi retirado o outro, por complicações de endometriose, com subsequente insuficiência ovárica. O transplante teve lugar um ano após a recolha de tecido ovárico e restaurou o desenvolvimento folicular e a produção de estrogénio e progesterona. Contudo, não foi possível retirar conclusões a longo prazo porque, no ano seguinte, a densidade folicular já era baixa, consequência da insuficiência ovárica pré-transplante. No entanto, foi possível confirmar a possibilidade de reabilitação da função endócrina com recurso a esta técnica, mas não a longo prazo. (1,57)

De forma a provar que este efeito é possível a longo prazo, numa meta análise de 2017 foram estudados 309 casos de autotransplantes de tecido ovárico criopreservado, nos quais 246 mulheres queriam retomar ao período fértil e 9 desejavam, unicamente, um retorno da função endócrina ovárica. Cerca de 40% das mulheres foram capazes de produzir um nado vivo e 85,2% tinham a sua função endócrina ovárica prolongada cerca de 25,6 a 26,9 meses, por excerto, definida pelos níveis fisiológicos de Estradiol E2 e produção e desenvolvimento folicular. Se no momento do transplante a menopausa já se tivesse estabelecido a função endócrina era restaurada em apenas 63,9% destes casos. Existem três razões pelas quais a função endócrina não era

restaurada: a IOP estava presente antes da CTO, foi preservada uma quantidade inadequada de tecido ovárico ou a CTO realizou-se em idade avançada. (29)

Petrokovski, Zharov *et al.* submetem cinco mulheres de idades 28.2 ± 4.3 anos a transplantes heterotópicos de tecido ovárico com o intuito de controlar os sintomas da menopausa. Foi recolhido aproximadamente 20-25% de um ovário e aos 47.4 ± 5.1 anos foram realizados os autotransplantes, depois de ter ocorrido a menopausa de forma natural. Quatro dos transplantes funcionaram e um teve de ser removido devido a infecção. O excerto demorou cerca de 9 ± 2.6 semanas para adquirir função e, após seis meses, os quatro excertos continuavam com a produção hormonal e uma melhoria dos sintomas da menopausa. (1)

Com os dados fornecidos pelos estudos acima citados e a representação gráfica da reserva ovárica pós transplantação (figura 3) é possível afirmar que a função endócrina do ovário é restaurada após o transplante de tecido ovárico criopreservado, mas não é capaz de igualar a reserva do momento da recolha.

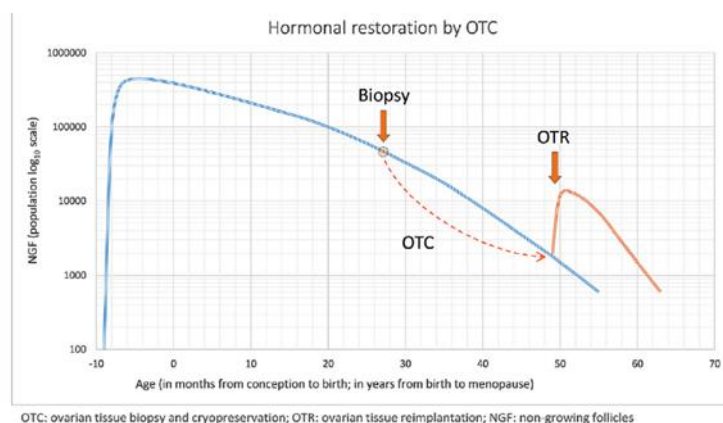


Figura 3- A restauração da reserva ovárica após o transplante de tecido ovárico criopreservado. (5)

Esta técnica está longe de ser perfeita. São necessários vários transplantes para obter um tempo ótimo de função endócrina, não se sabe ao certo a quantidade ótima de folículos primordiais e tecido ovárico a recolher e ainda não está bem determinado se a secreção hormonal é fisiológica, ou seja, pulsátil e sustentável em concentrações que tratem os sintomas da menopausa, em todas as mulheres.

Para além do mais, a idade de recolha do tecido é um fator crucial para o sucesso da técnica, porque a reserva ovárica diminui com a idade e o excerto perde folículos após o

transplante, devido a processos de isquemia temporária. São precisos cerca de 3 a 6 meses até à peça de tecido ovárica transplantada funcionar endocrinologicamente e, portanto, o alívio dos sintomas da menopausa não é imediato. (1)

4.3 Influência da remoção de tecido ovárico na reserva ovárica e na idade natural da menopausa em mulheres saudáveis

A fim de tornar o autotransplante ovárico um tratamento eletivo para controlar sintomas da menopausa e aumentar o tempo fértil, é necessário perceber se este procedimento pode provocar insuficiência ovárica prematura (IOP).

Para isto, vários estudos utilizando ooforectomias unilaterais (OUL) *vs* grupos controlo determinaram que a idade média do início da menopausa nas mulheres submetidas à cirurgia era, ligeiramente, menor. (1) A realização de OUL em 24,152 mulheres pré menopausa demonstrou um aumento de probabilidade do surgimento de IOP e menopausa precoce. (9) Já num estudo envolvendo 30 mulheres de idades inferiores a 46 anos, submetidas a OUL, estas atingiram a menopausa 4,4 anos mais cedo que as 227 mulheres hysterectomizadas com preservação bilateral dos ovários. (49)

Apenas dois estudos avaliaram a influência da idade de recolha de tecido ovárico e a idade de surgimento da menopausa. (1) Num destes estudos, se o tecido fosse recolhido aos 20,30 e 45 anos, a idade média da menopausa era aos 44,7, 46,3 e 48,7 anos, respetivamente. (50) Estudos mais recentes apontam para o aparecimento da menopausa um ano mais cedo em mulheres submetidas a OUL com idade média de 47,8 anos. (51)

No entanto, não é possível confirmar com certeza uma relação direta entre o risco de desenvolver IOP e a idade da paciente aquando da OUL, mas antes que, quanto mais cedo é realizado este procedimento, mais cedo é a menopausa. (1) Adicionalmente, a insuficiência ovárica primária parece ter uma base genética com cerca de 50 genes que podem ser mutados. (4)

A remoção de cinco a seis peças de 1 cm de largura e 0,5 mm de espessura não demonstrou ter impacto negativo na fertilidade ou idade de surgimento da menopausa. (5) Ainda não é claro a quantidade ótima de ovário a ser retirada ou a quantidade de tiras do córtex e as suas dimensões ideais, mas esta nunca será uma OUL, podendo resultar numa menopausa precoce, mas nunca induzir uma IOP. (1)

Vários estudos sugerem uma remoção de até 30% do ovário, como aquela que terá menor repercussão na reserva folicular da mulher. Todavia, a idade de recolha de tecido parece ser o fator que exerce maior influência na manutenção da reserva ovárica, sendo que quanto mais cedo é feita a recolha de tecido, mais anos férteis são perdidos. (1,5,9)

4.4 Duração do transplante ovárico de tecido criopreservado

A presença ou não de folículos primordiais aquando da recolha de tecido ovárico, para posterior reimplantação, é um fator decisivo para a duração do excerto, visto que quando presentes, a função ovárica foi restaurada na maioria dos casos. (5)

Como forma de prolongar a durabilidade do procedimento, o transplante tem de ser repetido passados alguns anos. (9) Através do uso desta técnica, é possível restabelecer função endócrina e esta ser mantida por um período igual ou superior a 4 ou 5 anos e atingir os 9 anos dependendo da densidade folicular no momento da recolha do tecido. (4,23,24)

No entanto, ainda não foi possível determinar ao certo a duração do transplante ovárico, porque estudos diferentes obtiveram períodos distintos. Um estudo realizado em cinco mulheres de idade média 19 anos submetidas a recolha de tecido ovárico e reimplante anos depois, reportaram atividade ovárica durante 6 a 7 anos, que podia ser estendida até aos 12 anos se o processo fosse repetido. (5)

Num pequeno estudo de descrição de casos clínicos, em duas mulheres de 46 e 49 anos, após 3-4 meses da transferência de tecido ovárico fresco para a parede abdominal, a função endócrina do excerto manteve-se por 2 a 4 meses. Num estudo semelhante, uma mulher de 47 anos submetida a um TTO, para o antebraço, a função endócrina ovárica permaneceu por 5 a 6 meses. (9,52)

Em 2017, foram realizados 309 transplantes com um terço de ovário criopreservado em mulheres de idade médias de 29,3 anos, com uma longevidade de 26,9 meses. (29) Num caso de uma mulher de 46 anos submetida a transplante de 10 tiras de córtex ovárico no tecido subcutâneo do músculo reto abdominal, foi possível manter função endócrina por 12 meses. (53)

Um estudo realizado, ao longo de um ano, em 49 mulheres com idade média de 30 anos, submetidas a transplantes ováricos ortotópicos, em 16 destas não se documentou função endócrina, ao fim de um ano. (54) De forma semelhante, num estudo envolvendo 92 mulheres com patologia oncológica, a função endócrina do excerto ovárico não estava presente em 31,5% dos casos, após um ano. (47)

Contudo, não podemos tirar conclusões diretas destes estudos, visto que todos obtêm resultados diferentes e a maioria deles são realizados em mulheres submetidas a tratamentos oncológicos e só posteriormente a criopreservação de tecido ovárico, com vista na preservação da fertilidade e não no tratamento dos sintomas associados à menopausa. Deste modo, a recolha de tecido ovárico é, por norma, realizado mais cedo, quando comparado com mulheres saudáveis que recorrem à técnica para atrasar a menopausa.

Adicionalmente, é importante relembrar que durante todo o processo de criopreservação e transplante, parte da reserva folicular é perdida para processos de isquemia, o que ainda reduz mais o tempo de semi vida do excerto ovárico. (8,9)

4.5 Recetividade da população feminina ao uso de tecido ovárico criopreservado como THM

Num estudo a uma população feminina (15-35 anos), tentou-se determinar a recetividade ao uso de criopreservação de tecido ovárico e de oócitos, para preservação de fertilidade e tratamento de SVM, usando um questionário. (6)

Este estudo demonstrou que quanto maior o grau de formação académica/literacia, mais suscetível à ideia de criopreservação de tecido ovárico as mulheres se encontram, já a idade não demonstrou ser um fator influenciador. (6)

Quando questionadas sobre o uso desta técnica para o tratamento dos sintomas da menopausa, a maioria das mulheres não se mostrou preocupada com o surgimento destes sintomas e cerca de 62,1% considerou usar a terapia hormonal para alívio sintomático, sendo que 41,1% preferia a THM tecidual e 19,8% a THM farmacológica. Ainda que a terapia natural se demonstrasse menos efetiva, 61% das mulheres continuavam a preferir esta técnica. No entanto, há considerar que cerca de 39,1% das mulheres rejeitaram qualquer THM. (6)

Um importante fator na decisão da recolha de tecido ovárico é o momento de realização deste procedimento cirúrgico. A recetividade à técnica aumentou substancialmente se esta fosse realizada aquando de uma cesariana ou outra cirurgia abdominal. (6)

A dupla possibilidade em usar a recolha e posterior criopreservação de tecido ovárico para preservação de fertilidade e para tratamento futuro dos sintomas da menopausa, tornou esta técnica mais apelativa, ainda que coloque, por esta mesma razão, a idade de recolha de tecido preferencialmente entre os 31-35 anos, que, como já referido anteriormente, não é a idade ótima de recolha de tecido ovárico. (6)

4.6 Novas técnicas de criopreservação e transplante ovárico

De forma a tornar o autotransplante de tecido ovárico criopreservado uma realidade corrente no tratamento dos sintomas da menopausa, é necessário progredir nas técnicas de congelamento, descongelamento, transplantação e revascularização.

Como referido anteriormente, durante o processo de congelação e descongelação perde-se uma pequena quantidade de folículos, mas é na revascularização que morre uma maior percentagem. Este é um processo que demora, em média, 10 dias. Para melhorar os *outcomes* desta técnica e prevenir os cerca de 2/3 de folículos que podem sofrer apoptose durante os 10 dias, devemos procurar novas técnicas para a redução deste tempo. (1)

O stress oxidativo e a isquemia podem ser reduzidos se forem injetados produtos que aumentem a revascularização como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou a esfingosina-1-fosfato (S1P). (23,38)

A Esfingosina-1-fosfato é um fosfolípido mensageiro e fator supressor da apoptose que parece melhorar o processo de revascularização e sobrevivência de folículos primordiais, para além de acelerar o processo completo de revascularização para apenas 2 a 3 dias e duplicar a densidade microvascular ao décimo dia. Contudo, esta molécula é ainda experimental e não está aprovada para uso clínico, mas o FTY-720 (Fingolimod), usado no tratamento da esclerose múltipla, pensa-se ter um efeito semelhante, encontrando-se ainda em estudo. (1,2,38)

Existem outras moléculas a serem estudadas que poderão ter a capacidade de aumentar a longevidade do excerto ovárico pós criopreservação e descongelamento, como por

exemplo: células estaminais, fatores de crescimento como a eritropoetina (EPO), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), antioxidantes (vitamina E) androgénios, entre outros. (1,38)

O VEGF permite reduzir o tempo de isquemia e aumentar a reserva folicular por ser a principal molécula envolvida na formação de novos vasos a partir de vasos pré existentes, aumentando desta forma a densidade vascular. (58) O uso de duas isoformas de VEGF, o VEGF₁₁₁ e o VEGF₁₆₅, já foram testadas em modelos animais. Estes, juntamente com uma matriz de colagénio, permitem aumentar o recrutamento de novos vasos e diminuir a hipóxia. (59,38)

Vários fatores estão envolvidos na expressão de genes de crescimento endotelial vascular, são estes o estímulo da hipoxia, as citocinas e os fatores de crescimento. Ainda há uma certa controvérsia à volta da estimulação da VEGF pelo FSH e LH, mas foi demonstrado, recentemente, que a cultura do tecido ovárico num meio rico em gonadotrofina humana de mulheres em menopausa (GHM) aumentou 1.6-6.5 vezes a expressão de VEGF e a sobrevivência dos folículos após TTO em 1.2-1.5 vezes. (38)

Também podemos aumentar a eficácia desta técnica melhorando as membranas de neovascularização. A *AlloDerm* é um biomaterial, mais propriamente, uma matriz de tecido extracelular descelularizado, que preserva o ambiente nativo do tecido, por ser imunologicamente inerte, promove a proliferação celular (fibroblastos) e reduz a resposta inflamatória. Esta membrana sintética já é amplamente usada na reparação de tecidos, reconstruções e na formação de pontes tecidulares, principalmente na medicina dentária e na reparação de feridas na pele. (1,2,60)

As lesões de isquémia-reperfusão causadas por vários radicais livres, representam um fator deletério para o tecido ovárico. O uso de antioxidantes naturais ou exógenos como o ácido ascórbico, manitol, vitamina E, melatonina e oxitetraciclina, permitem a neutralização destes radicais e aumentar a taxa de sobrevivência folicular.(38) Scalercio *et al.* recorreram a um análogo da vitamina E, o trolox, que permitiu melhorar a qualidade folicular e evitou a apoptose de células do estroma, ao injetá-lo no tecido ovárico antes da recolha do tecido.(8,61,62)

Avanços no desenvolvimento de moléculas que otimizem o processo de revascularização parece ser uma boa forma de melhorar a criopreservação e transplante

de tecido ovárico. Deste modo, são necessários mais estudos sobre estas moléculas com aplicação futura a esta técnica.

Capítulo 5. Conclusão e Perspetivas futuras

Com base na literatura consultada, a transplantação de tecido ovárico para tratamento hormonal na menopausa mostrou as seguintes vantagens:

1. Retorno da função endócrina na grande maioria dos casos;
2. Secreção hormonal pulsátil;
3. Produção mais fisiológica de hormonas que têm funções importantes na pós menopausa, como por exemplo, a supressão tumoral e o aumento da massa óssea saudável;
4. Outras finalidades, como a preservação de fertilidade e indução da puberdade;

Mas também mostrou ter inconvenientes como:

1. Usar métodos invasivos;
2. Riscos cirúrgicos;
3. Ter um custo elevado;
4. Ser uma técnica demorada;
5. Possuir janelas restritas para recolha de tecido (idealmente entre os 20-25 anos);
6. A quantidade concreta de tecido a recolher permanece incerta;
7. A remoção de tecido ovárico resulta numa perda de anos férteis;
8. Não garante eficácia a 100%;
9. A duração do excerto é imprevisível;
10. Necessitar de mais do que uma implantação tecidual, de forma a prolongar o tempo de substituição hormonal;
11. Efeitos da THM tecidual nos SVM, redução da libido, alterações do sono e prevenção da osteoporose, cancro da mama e aterosclerose, ainda com estudos insuficientes;

O transplante de tecido ovárico criopreservado é, sem dúvida, uma opção que poderá vir a ser muito útil e a única opção em determinadas situações para a restauração da função endócrina e da fertilidade. Contudo, o uso desta técnica, em mulheres saudáveis para tratar os sintomas da menopausa, está ainda muito longe de se tornar uma realidade corrente. Há, por isso, uma grande necessidade de se prosseguir a investigação científica para avaliar a eficácia, segurança e desenvolver novas técnicas que melhorem o rendimento deste procedimento, devendo a investigação incidir sobre:

1. Moléculas como o VEGF, vitamina E, S1P, AlloDerm, fatores de crescimento, antioxidantes, androgénios, entre outros, que permitem aumentar a densidade

vascular e diminuir os radicais livres, para desta forma, aumentar a taxa de sobrevivência folicular e diminuir os danos de isquemia inerentes do período de revascularização tecidual.

2. Novas técnicas cirúrgicas e aperfeiçoamento das existentes. Uma recente técnica laparoscópica constituída por dois passos e, teoricamente, induz processos de neovascularização mais precoces. Em primeiro lugar, é criada uma bolsa peritoneal com o objetivo principal de induzir a angiogénese uma semana antes do TTO e, posteriormente, é transplantado para o local o tecido ovárico criopreservado. (38)
3. Técnicas de imagem como a tomografia de coerência ótica (TCO) que permite com eficácia e precisão detetar e contar o número de folículos primordiais, em modelos humanos, e detetar a presença de células malignas no tecido ovárico, para desta forma tornar mais fácil a determinação da quantidade de tecido ótica a ser recolhido. (38)

A palavra-chave para a implementação desta técnica é a individualização. O transplante de tecido ovárico criopreservado poderá apenas ter benefícios tendo em conta alguns dos seguintes critérios: (1)

- Avaliar a reserva ovárica antes da recolha de tecido, de forma a evitar o procedimento em mulheres com a reserva já diminuída.
- Idade limite de recolha <40 anos.
- Informar as mulheres dos possíveis benefícios, riscos e alternativas a este procedimento e que este não traz garantias absolutas de funcionamento.
- Quando possível, a recolha de tecido deve ser realizada em simultâneo com uma cirurgia pélvica medicamente necessária.
- Preferir o transplante heterotópico se o objetivo é, unicamente, a restauração da função endócrina.
- De forma a minimizar o risco de indução de menopausa precoce, limitar a recolha de tecido a menos de 30% do ovário.

Apesar dos inúmeros benefícios do transplante de tecido ovárico criopreservado, penso que este não é uma técnica que vá ser usada na prática clínica corrente e num futuro próximo. Idealmente, deve apenas ser realizada a recolha, se a mulher for submetida a uma cirurgia pélvica por outras razões, como por exemplo, uma cesariana, o que reduz ainda mais o número de casos com indicação para a terapêutica. A população alvo para este procedimento poderão ser mulheres que o usem com duas finalidades: a

Criopreservação e autotransplante de tecido ovárico como forma de terapia hormonal da menopausa -
perspetivas futuras

restauração da fertilidade e da função endócrina, tornando-o desta forma custo-
rentável e apelativo.

Folha em branco

Referências bibliográficas

1. Oktay KH, Marin L, Petrikovsky B, Terrani M, Babayev SN. Delaying Reproductive Aging by Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation: Is it Prime Time? *Trends in Molecular Medicine*. 2021 Aug;27(8):753–61.
2. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. *Reproductive Sciences*. 2020 Jan 6;27(4):955–62.
3. Agarwal S, Alzahrani F, Ahmed A. Hormone Replacement Therapy: Would it be Possible to Replicate a Functional Ovary? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Oct 14;19(10):3160.
4. Kristensen SG, Andersen CY. Cryopreservation of Ovarian Tissue: Opportunities Beyond Fertility Preservation and a Positive View Into the Future. *Frontiers in Endocrinology*. 2018 Jun 28;9.
5. 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>
6. Woodtli N, von Wolff M, Bitterlich N, Stute P. Attitude towards ovarian tissue and oocyte cryopreservation for non-medical reasons: a cross-sectional study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2018 Apr 26;298(1):191–8.
7. Von Wolff M, Stute P. Cryopreservation and transplantation of ovarian tissue exclusively to postpone menopause: Technically possible but endocrinologically doubtful. *Reproductive Biomedicine Online* [Internet]. 2015;31(6):718–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.010>
8. Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Cordova A, Figueiredo JR, Smitz J, et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation [Internet]. Vol. 25, *Zygote*. Cambridge University Press (CUP); 2017. p. 391–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199417000338>
9. Kolibianaki EE, Goulis DG, Kolibianakis EM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation to delay menopause: facts and fiction [Internet]. Vol. 142, *Maturitas*. Elsevier BV; 2020. p. 64–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.07.007>
10. Casanova R, Chuang A, Goepfert AR, Hueppchen NA, Weiss PM, Beckmann CRB, et al. Beckmann and Ling's *Obstetrics and Gynecology*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019

11. Wallace WHB, Kelsey TW. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. *PLoS ONE* [Internet]. 2010 Jan 27;5(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811725/figure/pone-0008772-g001/>
12. Santoro N, Roeca C, Peters BA, Neal-Perry G. The Menopause Transition: Signs, Symptoms, and Management Options. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2020 Oct 23;106(1).
13. Portman DJ, Gass MLS. Genitourinary Syndrome of Menopause: New Terminology for Vulvovaginal Atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and The North American Menopause Society. *The Journal of Sexual Medicine*. 2014 Dec;11(12):2865–72.
14. Col NF, Guthrie JR, Politi M, Dennerstein L. Duration of vasomotor symptoms in middle-aged women. *Menopause*. 2009 May;16(3):453–7.
15. Avis NE, Crawford SL, Greendale G, Bromberger JT, Everson-Rose SA, Gold EB, et al. Duration of Menopausal Vasomotor Symptoms Over the Menopause Transition. *JAMA Internal Medicine* [Internet]. 2015 Apr 1;175(4):531. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2110996>
16. El Khoudary SR, Aggarwal B, Beckie TM, Hodis HN, Johnson AE, Langer RD, et al. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* [Internet]. 2020 Nov 30;142(25). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000912>
17. Meiwor D, Baum M, Yaron R, Levron J, Hardan I, Schiff E, et al. Ovarian tissue cryopreservation in hematologic malignancy: Ten years' experience. *Leukemia & Lymphoma*. 2007 Jan;48(8):1569–76
18. Cenci S, Toraldo G, Weitzmann MN, Roggia C, Gao Y, Qian WP, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN- γ -induced class II transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Aug 15;100(18):10405–10
19. American College of Obstetricians and Gynecologists Women's Health Care Physicians Sexual dysfunction. *Obstet. Gynecol.* 2004, 104, 85S–91S
20. The North American Menopause Society. Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2013, 20, 884–888.
21. Stuenkel CA, Davis SR, Gompel A, Lumsden MA, Murad MH, Pinkerton JV, et al. Treatment of Symptoms of the Menopause: An Endocrine Society Clinical

- Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2015 Nov;100(11):3975–4011. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/100/11/3975/2836060>
22. Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein GD, et al. Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010 Jul;95(7_supplement_1):s1–66.
 23. Donnez J, Dolmans M-M. Fertility preservation in women. *Nature Reviews Endocrinology*. 2013 Oct 29;9(12):735–49.
 24. Donnez J, Dolmans M-M. Transplantation of ovarian tissue. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2014 Nov;28(8):1188–97.
 25. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Human Reproduction*. 1994 Apr;9(4):597–603.
 26. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Human Reproduction*. 1996 Jun 1;11(6):1268–72.
 27. Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 1997 Mar;67(3):481–6.
 28. Donnez J, Dolmans M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*. 2004 Oct;364(9443):1405–10
 29. Pacheco F, Oktay K. Current Success and Efficiency of Autologous Ovarian Transplantation: A Meta-Analysis. *Reproductive Sciences*. 2017 Jul 13;24(8):1111–20.
 30. 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. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016 Mar;32(3):334–6.
 31. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. 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. *European Journal of Cancer* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2020 Dec 17];49(4):911–4. Available from: [https://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(12\)00762-9/fulltext](https://www.ejancer.com/article/S0959-8049(12)00762-9/fulltext)

32. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2002 Jul 17;288(3):321–33.
33. American College of Physicians. Guidelines for Counseling Postmenopausal Women about Preventive Hormone Therapy. 1992;1038–41.
34. Lobo RA. Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016 Oct 7;13(4):220–31.
35. Manson JE, Aragaki AK, Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, et al. Menopausal Hormone Therapy and Long-term All-Cause and Cause-Specific Mortality [Internet]. Vol. 318, *JAMA*. American Medical Association (AMA); 2017. p. 927. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.11217>
36. Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, Aragaki AK, Rossouw JE, Prentice RL, et al. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA* [Internet]. 2013;310(13):1353–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084921>
37. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GDO, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008 May 20;336(7655):1227–31.
38. Takae S, Suzuki N. Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. *Reproductive Medicine and Biology* [Internet]. 2019 Apr 8 [cited 2021 Mar 26];18(3):217–24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6613018/>
39. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: Individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet* 2015, 385, 1835–1842.
40. Siegel, R.; Ward, E.; Brawley, O.; Jemal, A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J. Clin.* 2011, 61, 212–236
41. Donnez J, Dolmans M-M. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2015 Jul 26;32(8):1167–70.
42. Donnez J, Squifflet J, Van Eyck A-S, Demylle D, Jadoul P, Langendonck AV, et al. Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved

- ovarian tissue: a pilot experience. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008 Jan;16(5):694–704.
43. Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Human Reproduction*. 2008 Apr 18;23(7):1531–7.
44. Rozenberg S, Di Pietrantonio V, Vandromme J, Gilles C. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2021 Dec 1;35(6):101577. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34535397/>
45. Kurt A, Isaoglu U, Yilmaz M, Calik M, Polat B, Hakan H, et al. Biochemical and histological investigation of famotidine effect on postischemic reperfusion injury in the rat ovary. *Journal of Pediatric Surgery*. 2011 Sep;46(9):1817–23.
46. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Human Reproduction Update* [Internet]. 2009 [cited 2021 Sep 25];15(6):649–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759329/>
47. Jadoul P, Guilmain A, Squifflet J, Luyckx M, Votino R, Wyns C, et al. Efficacy of ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: lessons learned from 545 cases. *Human Reproduction*. 2017 Mar 1;32(5):1046–54.
48. van Driel C, Stuursma A, Schroevers M, Mourits M, de Bock G. Mindfulness, cognitive behavioural and behaviour-based therapy for natural and treatment-induced menopausal symptoms: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2018 Mar 15;126(3):330–9.
49. Farquhar CM, Sadler L, Harvey SA, Stewart AW. The association of hysterectomy and menopause: a prospective cohort study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2020 Aug 3];112(7):956–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15957999/>
50. Rosendahl M, Simonsen MK, Kjer JJ. The influence of unilateral oophorectomy on the age of menopause. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Jul 24];20(6):540–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28933974/>
51. Bjelland EK, Wilkosz P, Tanbo TG, Eskild A. Is unilateral oophorectomy associated with age at menopause? A population study (the HUNT2 Survey). *Human Reproduction*. 2014 Feb 18;29(4):835–41.

52. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J. Long-Term Ovarian Function Evaluation after Autografting by Implantation with Fresh and Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001 Sep;86(9):4489–94.
53. Kiran G, Kiran H, Coban YK, Guven AM. Ovarian cortical transplantation may be an alternative to hormone therapy in patients with early climacterium. *Fertility and Sterility*. 2005 Nov;84(5):1509.e1–3.
54. Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Human Reproduction (Oxford, England)* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Dec 16];31(9):2031–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27378768/>
55. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Consenso Nacional sobre Menopausa 2021 [Internet]. 2021. Available from: <https://spginecologia.pt/wp-content/uploads/2021/10/Consenso-Nacional-Menopausa-2021.pdf>
56. Kim SSamuel. Revisiting the role of heterotopic ovarian transplantation: futility or fertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014 Feb;28(2):141–5.
57. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian Function after Transplantation of Frozen, Banked Autologous Ovarian Tissue. *New England Journal of Medicine*. 2000 Jun 22;342(25):1919–9.
58. Henry L, Labied S, Fransolet M, Kirschvink N, Blacher S, Noel A, et al. Isoform 165 of vascular endothelial growth factor in collagen matrix improves ovine cryopreserved ovarian tissue revascularisation after xenotransplantation in mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015 Mar 7;13(1).
59. Labied S, Delforge Y, Munaut C, Blacher S, Colige A, Delcombel R, et al. Isoform 111 of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF111) Improves Angiogenesis of Ovarian Tissue Xenotransplantation. *Transplantation*. 2013 Feb 15;95(3):426–33.
60. AlloDerm RTM - BioHorizons [Internet]. www.biohorizons.com. Disponível em : <https://www.biohorizons.com/Products/AlloDerm>
61. Scalercio SR, Amorim CA, Brito DC, Percário S, Oskam IC, Domingues SFS, et al. Trolox enhances follicular survival after ovarian tissue autograft in squirrel monkey (*Saimiri collinsi*). *Reproduction, Fertility and Development*. 2016;28(11):1854.
62. Martinez-Madrid B, Donnez J, Van Eyck AS, Veiga-Lopez A, Dolmans MM, Van Langendonck A. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model: a

useful tool to study short-term transplantation of cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility* [Internet]. 2009 Jan [cited 2019 Nov 14];91(1):285–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028207040915>