FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA A ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

SARA ISABEL MACHADO ROCHA

PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM MULHERES COM DOENÇA NEOPLÁSICA

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE REPRODUÇÃO HUMANA

TRABALHO REALIZADO SOB ORIENTAÇÃO DE:

ANA TERESA MOREIRA DE ALMEIDA SANTOS

MARÇO/2012

ÍNDICE

RESUMO 5

ABSTRACT 6

LISTA DE ABREVIATURAS 7

I. INTRODUÇÃO 8

II. NECESSIDADE DE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE 9

2.1. Efeitos da terapêutica antineoplásica na fertilidade 10

2.1.1. Efeitos da quimioterapia 11

2.1.2. Efeitos da radioterapia 13

2.1.3. Efeitos da cirurgia 15

III. TÉCNICAS PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE 15

3.1. Criopreservação de embriões 16

3.2. Criopreservação de ovócitos maduros 18

3.3. Criopreservação de ovócitos após maturação *in vitro* 20

3.4. Criopreservação de tecido ovárico 22

3.5. Ooforopexia (transposição ovárica) 28

3.6. Cirurgia conservadora 29

3.6.1. Cancro do colo do útero 29

3.6.2. Cancro do endométrio 30

3.6.3. Cancro do ovário 31

3.7. Supressão hormonal da função ovárica 32

3.8. Inibidores da apoptose 34

3.9. Outros métodos 35

IV. DISCUSSÃO MÉDICO-DOENTE SOBRE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE .36

4.1. Quando engravidar? 38

V. QUESTÕES ÉTICAS.....39

5.1. Consentimento informado.....40

VI. CONCLUSÃO.....42

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44

RESUMO

A grande maioria das mulheres jovens submetidas a tratamento antineoplásico virá a sofrer de falência ovárica e menopausa precoce, com consequente perda da fertilidade. Este facto, associado ao aumento das taxas de cura e sobrevivência a longo prazo e ao adiamento da maternidade, levam a que muitas mulheres se preocupem em manter preservada a sua fertilidade após a conclusão da terapêutica.

Perante esta necessidade, surgiram valiosos avanços na área da reprodução humana, possibilitando, actualmente, diversas opções para preservação da fertilidade, entre as quais técnicas de criopreservação, técnicas cirúrgicas e métodos farmacológicos. No entanto, é preciso ter consciência dos riscos e limitações da sua aplicação, uma vez que algumas delas são ainda experimentais.

Assim, torna-se imperativa a discussão atempada da preservação da fertilidade como parte integrante dos cuidados oferecidos a estas doentes, sendo necessária uma cooperação interdisciplinar na escolha da técnica mais apropriada a cada caso.

Este trabalho tem como objectivo a revisão dos efeitos das terapêuticas antineoplásicas, bem como das opções de preservação da fertilidade actualmente existentes.

Palavras-chave: cancro, falência ovárica, preservação da fertilidade, sexo feminino, terapêutica antineoplásica.

ABSTRACT

Most young women undergoing cancer treatment will experience ovarian failure and premature menopause, with subsequent loss of fertility. This combined with increased cure and long-term survival rates and the delay in childbearing, may lead to concerns with preserving their fertility after completion of therapy.

Towards this need, valuable refinements arose in human reproduction, currently providing several options for fertility preservation, namely cryopreservation, surgical and pharmacological methods. However, one must be aware of the risks and limitations of its application, since some of them are still experimental.

Thus, it becomes imperative to early discuss the fertility preservation issues as part of the consultation of young female cancer patients, so that interdisciplinary cooperation is needed in selecting the most appropriate technique for each case.

This paper aims to review the side effects of cancer treatment and the currently existing fertility preservation options.

Keywords: cancer, cancer treatment, fertility preservation, ovarian failure, women.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica

FIV – fecundação *in vitro*

FSH – hormona folículo-estimulante

GnRH – hormona libertadora de gonadotrofinas

HAM – hormona anti-muleriana

ICSI – injecção intracitoplasmática de espermatozóides

LH – hormona luteinizante

LLA – leucemia linfoblástica aguda

LMC – leucemia mielóide crónica

PCR – reacção da polimerase em cadeia

I. INTRODUÇÃO

Todos os anos, aproximadamente 200 mil mulheres com idades compreendidas entre os 20 e os 49 anos são diagnosticadas com cancro (Duffy C, Allen S. 2009).

Os avanços sucessivos no diagnóstico e no tratamento das doenças neoplásicas têm melhorado significativamente as taxas de cura e de sobrevivência de crianças e mulheres com cancro. A taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos para todas as neoplasias em idades jovens subiu de menos de 50% na década de 1970 para os actuais 80%, e ao fim de 10 anos ronda os 75% (Revel A, Revel-Vilk S. 2010).

No entanto, estas são confrontadas com as consequências a longo prazo da exposição às terapêuticas antineoplásicas, especialmente a toxicidade ovárica, com perda da função endócrina e reprodutiva, condicionando menopausa precoce e infertilidade. Dado que muitas destas mulheres são jovens, com expectativas de uma vida reprodutiva normal, associado ao adiamento da maternidade cada vez mais frequente, estes efeitos podem causar grande impacto na sua qualidade de vida e auto-estima.

Métodos para prevenir o impacto negativo sobre a fertilidade e recuperar a função gonadal após o tratamento são de grande importância para mulheres em idade reprodutiva. Esta necessidade conduziu a valiosos progressos na área da reprodução humana, com o desenvolvimento de diversas técnicas de preservação da fertilidade.

Com este trabalho pretendo evidenciar a necessidade de preservação da fertilidade feminina, revendo os principais efeitos das diferentes terapêuticas antineoplásicas nesta, e rever as opções actuais de preservação da fertilidade, mesmo aquelas em fase experimental.

II. NECESSIDADE DE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

De acordo com as estatísticas mais recentes, os cancros mais frequentemente diagnosticados em mulheres com idade inferior a 40 anos são o cancro da mama, o melanoma, o cancro do colo do útero, o linfoma não Hodgkin e a leucemia (Maltaris T, *et al.* 2009). E embora as taxas de incidência nesta faixa etária tenham continuado a aumentar nos últimos anos, as taxas de mortalidade diminuíram significativamente, graças aos constantes avanços técnicos e científicos a que temos assistido, permitindo diagnósticos mais precoces e tratamentos mais eficazes, aumentando assim as taxas de cura e de sobrevivência a longo prazo. Nos casos acima referidos, a taxa de sobrevivência ao fim de 5 anos é de 88%, 91%, 73%, 59% e 46% respectivamente (Maltaris T, *et al.* 2009).

No entanto, as terapêuticas agressivas actualmente utilizadas estão associadas a uma morbilidade significativa e a efeitos físicos e psicológicos a longo prazo, entre os quais, a falência ovárica prematura e a menopausa precoce, condicionando a função reprodutiva e as expectativas relativamente à vida futura. Enfrentar a menopausa precoce pode aumentar ainda mais a vulnerabilidade de uma mulher jovem com diagnóstico de cancro, resultando num risco mais elevado de sofrimento psicológico e emocional e pior qualidade de vida. Segundo Quinn G, *et al.* (2010), mulheres submetidas a quimioterapia ou radioterapia durante a idade reprodutiva têm uma probabilidade de 40 a 80% de se tornarem inférteis. Tudo isto, associado ao adiamento da maternidade que cada vez mais se verifica nas sociedades ocidentais, levou a que a preservação da fertilidade passasse a ser considerada, tanto pelas pacientes como pelos médicos, um importante factor no que diz respeito à qualidade de vida.

Nas mulheres, a fertilidade pode ser comprometida por qualquer tratamento que diminua o número de folículos primordiais, afecte o balanço hormonal, ou interfira no funcionamento dos ovários, trompas uterinas, útero e colo do útero. Alterações vasculares ou

anatómicas do útero, colo uterino ou vagina, decorrentes da cirurgia ou irradiação, podem também impedir a concepção natural e uma gravidez bem sucedida.

Avanços na medicina reprodutiva oferecem alguma esperança ao possibilitarem a parentalidade biológica a mulheres que se tornariam inférteis devido às intervenções cirúrgicas, quimioterapia e radioterapia, existindo várias técnicas que permitem aumentar as potenciais capacidades reprodutivas das sobreviventes. Estas envolvem procedimentos dispendiosos e invasivos, ao mesmo tempo que a doença se encontra activa, existindo um limitado período de oportunidade de acção enquanto o ovário é funcional, pelo que se torna imperativa a discussão das diferentes possibilidades o mais precocemente possível.

2.1. Efeitos da terapêutica antineoplásica na fertilidade

No momento do nascimento, o ovário humano contém aproximadamente 2 milhões de folículos, mas devido a um processo de atrésia contínuo esta reserva vai progressivamente diminuindo ao longo da vida. Com o envelhecimento, os folículos primordiais descem abaixo de um número limite, que condiciona a descontinuação dos ciclos menstruais e a menopausa espontânea.

Os folículos ováricos são marcadamente vulneráveis a agentes que danifiquem o ácido desoxirribonucleico (ADN) celular, como é o caso da radiação ionizante e dos fármacos utilizados na quimioterapia. Esta vulnerabilidade poderá condicionar falência ovárica aguda, que pode ocorrer durante ou logo após o término da irradiação ou da quimioterapia, e que poderá ser transitória ou permanente. Pelo contrário, a falência ovárica ou menopausa prematuras manifestam-se tipicamente após o ressurgimento dos ciclos menstruais pós-tratamento, com consequente perda da função ovárica antes dos 40 anos de idade.

As mulheres que não recebam uma dose de radiação ou quimioterapia capaz de induzir esterilidade, podem apresentar um risco aumentado de complicações durante a gravidez, nomeadamente, abortamentos espontâneos e bebés com baixo peso à nascença (Stroud J, *et al.* 2009).

Qualquer dano infligido ao ovário poderá reduzir a sua reserva, provocando um avanço na idade reprodutiva da paciente, e encurtando assim o período de possibilidade de reprodução.

2.1.1. Efeitos da quimioterapia

A falência ovárica é um dos efeitos deletérios mais comuns da quimioterapia curativa. Todos os fármacos quimioterapêuticos actuam interrompendo os processos celulares vitais e impedindo a normal progressão do ciclo celular. Mais especificamente, a quimioterapia induz turgescência das células da pré-granulosa e disrupção da arquitectura folicular com desaparecimento do lúmen e do ovócito, tornando o ovário fibrótico (Meirow D, Nugent D. 2001). É ainda causa de mutações, aductos de ADN, quebras estruturais e lesões oxidativas em células somáticas e germinativas. Desta forma, a quimioterapia reduz a reserva folicular, podendo originar a falência ovárica imediata ou aguda. No entanto, em mulheres mais jovens, os ciclos menstruais podem ressurgir após a interrupção do tratamento, o que não significa que os ovários tenham escapado ilesos. Na verdade, estas mulheres apresentam um elevado risco de menopausa precoce.

Estes efeitos adversos são grandemente influenciados pelos fármacos utilizados (Tabela 1), pela dose total administrada e pela idade da paciente na altura do tratamento. De facto, mulheres mais velhas apresentam uma maior incidência de falência ovárica completa e

infertilidade permanente, em comparação com mulheres mais jovens, provavelmente devido à menor reserva folicular existente antes do tratamento. Relativamente ao esquema terapêutico, vários estudos efectuados com diferentes protocolos revelaram uma maior incidência de falência ovárica permanente com o uso de agentes alquilantes, particularmente com a ciclofosfamida, sendo o esquema utilizado previamente à transplantação de medula óssea o mais gonadotóxico (Demeestere I, *et al.* 2007). Isto deve-se ao facto de estes agentes não serem específicos do ciclo celular, sendo por isso capazes de lesar células em diferentes fases, incluindo os folículos primordiais "em repouso" e as suas células de suporte, activando a maquinaria apoptótica. Pelo contrário, fármacos específicos do ciclo celular, como o metotrexato e o 5-fluorouracilo, são menos nocivos para os folículos primordiais. Também os taxanos, inibidores da função do fuso mitótico, parecem apresentar uma menor probabilidade de provocar disfunção ovárica persistente, o mesmo acontecendo com o transtuzumab (Maltaris T, *et al.* 2008).

Tabela 1 - FÁRMACOS GONADOTÓXICOS USADOS EM QUIMIOTERAPIA	
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida Ifosfamida Clorambucil Melfalan Busulfan
Agentes de platino	Cisplatina
Alcalóides da vinca	Vimblastina
Antimetabolitos	Citarabina
Outros agentes	Procarbazina

(Adaptada de Stroud J, *et al.* 2009)

Actualmente, sabe-se que a hormona anti-muleriana (HAM) é um importante produto do ovário adulto, produzida pelas células da granulosa de pequenos folículos em crescimento. Existe evidência de que a HAM decresce com a idade e sofre ligeiras variações durante e entre os ciclos menstruais. Como tal, esta hormona é, actualmente, o melhor marcador

disponível da reserva ovárica, e tem surgido cada vez mais informação sobre a sua capacidade para revelar uma perda da reserva folicular induzida pela quimioterapia, em sobreviventes de cancros na infância (Wallace W, Barr R. 2010). Também o doseamento de hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol e inibina B associado à contagem de folículos antrais por ecografia transvaginal podem auxiliar no estudo da reserva folicular ovárica. O declínio desta reflecte-se na diminuição dos níveis circulantes de estradiol, inibina B e HAM e no número reduzido de folículos (Hickey M, *et al.* 2009).

É crucial, tanto para as doentes como para a equipa médica, reconhecer o risco de esterilidade antes de iniciar a quimioterapia, dado que em alguns casos é possível optar por um protocolo diferente, menos agressivo.

Relativamente ao risco para a descendência, estudos que acompanharam a gravidez de mulheres expostas a quimioterapia antes da concepção, não revelaram elevação das taxas de abortamento ou de anomalias congénitas, quando comparadas com a população em geral (Maltaris T, *et al.* 2009).

2.1.2. Efeitos da radioterapia

A radioterapia abdomino-pélvica, como parte da terapêutica do cancro, tem efeitos claramente deletérios na função ovárica, independentemente da idade.

Qualquer lesão das células da granulosa, que sustentam o desenvolvimento folicular, irá afectar a viabilidade de maturação do ovócito. Segundo Stroud *et al.* (2009), as células da granulosa parecem ser o alvo inicial dos danos causados pela radiação. Ao fim de algumas horas de irradiação, ainda antes de qualquer alteração nos ovócitos ser visível, as células da granulosa sofrem picnose, sinal evidente de morte celular. Com uma perda suficiente de células da granulosa, os ovócitos perdem a viabilidade e os folículos atrofiam.

Os ovários são expostos a quantidades significativas de radiação quando esta é usada no tratamento de doenças pélvicas e abdominais, como o cancro do colo do útero e do cólon, e de patologias malignas do sistema nervoso central que exigem radioterapia espinhal. O mesmo acontece com a irradiação corporal total prévia aos transplantes de medula óssea. Em muitos destes casos, as doentes são jovens em idade fértil ou mesmo pré-púberes.

A tolerância do ovário à dose de radiação depende de vários factores, entre os quais, o volume irradiado, a dose total de radiação, o fraccionamento e a idade da doente no momento do tratamento. Este último relaciona-se com o número de folículos primordiais remanescentes, que é maior em mulheres mais jovens, pelo que estas requerem uma dose mais elevada de radiação para abolir a função ovárica.

A dose de esterilização efectiva é a aquela após a qual o número de folículos primordiais decairá abaixo dos mil. De outra forma, é a dose capaz de induzir falência ovárica em 97,5% das mulheres, conduzindo a uma idade reprodutiva de 58 anos. A dose letal média – dose de radiação necessária para destruir 50% dos ovócitos humanos – é inferior a 2 Gy (Critchley H, Wallace W. 2005; Stroud J, *et al.* 2009).

A radiação ionizante comporta efeitos nocivos para os restantes órgãos reprodutivos, sendo o grau e a persistência dos danos dependentes da dose, do campo irradiado e da idade da paciente, acarretando maior risco em idades mais avançadas.

Com o envelhecimento natural, os vasos ováricos desenvolvem espontaneamente esclerose e proliferação da íntima até à oclusão do lúmen, processo acelerado pela radiação.

A radiação pode também provocar lesões a nível uterino, incluindo alterações irreversíveis na musculatura e fluxo sanguíneo, bem como insuficiência endometrial hormonorresistente, comportando para as gravidezes subsequentes um risco aumentado de abortamento espontâneo, restrição de crescimento intra-uterino e parto prematuro. No entanto,

desde que não seja administrada durante a gravidez, não existe risco de teratogenicidade (Maltaris T, *et al.* 2009).

Relativamente à transplantação de medula óssea, largamente utilizada no tratamento de patologias malignas na área da onco-hematologia, vários estudos reflectem um risco extremamente elevado de falência ovárica persistente em mulheres submetidas a este procedimento. O crescimento e o desenvolvimento sexual das crianças são afectados, e a esterilidade é comum em adultos (Meirow D, Nugent D. 2001). Neste grupo específico de doentes (crianças e adultas), deverão ser feitos, previamente ao tratamento, todos os esforços no sentido de preservar a fertilidade futura.

2.1.3. Efeitos da cirurgia

As cirurgias indicadas nas neoplasias ginecológicas consistem, na maioria das vezes, na remoção da totalidade de um ou mais órgãos reprodutivos. Como seria de esperar, a ablação cirúrgica dos ovários leva à supressão imediata e permanente da sua função endócrina e reprodutiva. Também a histerectomia impede a ocorrência de uma gravidez.

III. TÉCNICAS PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

Cada caso é único e requer uma estratégia diferente de preservação da fertilidade. A escolha do método mais adequado depende de determinados factores como o tipo de cancro, o protocolo de quimioterapia, a idade da doente, o estado civil e o período de tempo disponível antes do início do tratamento. Se as opções não forem exploradas previamente à terapêutica, as lesões ováricas e subsequente menopausa precoce podem impedir a possibilidade de uma gravidez após o tratamento.

O objectivo poderá ser a redução da gonadotoxicidade do tratamento antineoplásico com a intenção de preservar a função ovárica e a fertilidade natural ou, por outro lado, a criopreservação de gâmetas para posterior restauração da fertilidade, ou ainda o recurso a técnicas cirúrgicas conservadoras no tratamento de neoplasias ginecológicas.

De acordo com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), a criopreservação de embriões é considerada prática corrente e amplamente acessível. Outros métodos disponíveis para preservação da fertilidade devem ser considerados experimentais e realizados em centros com os conhecimentos necessários.

3.1. Criopreservação de embriões

Até à data, a abordagem mais eficaz e amplamente utilizada para preservar a fertilidade é a criopreservação de embriões, dado que o embrião humano é bastante resistente à criopreservação. A taxa de sobrevivência pós-descongelação varia entre os 35 e os 90%, enquanto as taxas de implantação se situam entre os 8 e os 30%. As taxas cumulativas de gravidez ultrapassam os 60% (Chang H, Suh C, 2008).

Esta é uma técnica clinicamente bem estabelecida, disponível desde a década de 80, requerendo, no entanto, administração de gonadotrofinas para estimulação ovárica, durante cerca de duas semanas, monitorização do desenvolvimento folicular através de medições ecográficas e do doseamento dos níveis de estradiol, e colheita dos ovócitos por aspiração guiada por ecografia endovaginal, seguindo-se a fecundação *in vitro* (FIV), para a qual será necessário esperma do parceiro ou de um dador. Todo este processo poderá demorar até 6 semanas, dado que o início da estimulação deverá coincidir com o início do ciclo menstrual.

Contudo, o adiamento da terapêutica não é seguro em determinados tipos de neoplasias e pode ser arriscado para muitas mulheres. Também o tipo de cancro pode

representar uma contra-indicação à estimulação ovárica. A exposição a elevados níveis de estrogénios durante a estimulação ovárica com gonadotrofinas não é desejável em doentes com tumores hormonodependentes, tendo sido demonstrado que os estrogénios estimulam a proliferação das células neoplásicas da mama, mesmo em carcinomas negativos para receptores hormonais (Maltaris T, *et al.* 2009). Neste caso, será mais adequado optar por estratégias que evitem o aumento dos níveis de estrogénios. Estas incluem ciclos "naturais" (sem estimulação) de FIV, com taxas muito baixas de gravidez e não havendo, na maioria dos casos, tempo para a realização de vários ciclos. Outra estratégia consiste na estimulação ovárica com fármacos que reduzam as concentrações de estrogénios, como o tamoxifeno ou inibidores da aromatase (letrozole) associados ou não a doses mínimas de gonadotrofinas.

O tamoxifeno é um agente indutor da ovulação, que antagoniza competitivamente os receptores de estrogénios no hipotálamo e na hipófise, criando um estado hipoestrogénico aparente e estimulando a libertação da FSH através da perda de inibição negativa dos estrogénios. De forma semelhante, os inibidores da aromatase (enzima que catalisa a reacção de conversão de substâncias androgénicas em estrogénios, em vários tecidos incluindo as células da granulosa dos folículos ováricos) estimulam a libertação da FSH através da criação de um ambiente hipoestrogénico, desempenhando o seu principal papel na redução dos níveis de estradiol durante a FIV.

Segundo Oktay *et al.* (2005), a associação do tamoxifeno ou do letrozole à FSH resulta na obtenção de um maior número de embriões, comparando com a estimulação isolada com tamoxifeno. A associação tamoxifeno-FSH apresenta níveis mais elevados de estrogénios, embora semelhantes aos observados durante a administração crónica de tamoxifeno no tratamento do cancro da mama. No entanto, se tal for motivo de preocupação em doentes com positividade para receptores de estrogénios, deverá optar-se pela estimulação com letrozole-FSH ou com tamoxifeno isolado. De facto, estudos demonstraram que, em doentes

estimuladas com letrozole, os níveis de estrogénios são inferiores aos observados num ciclo natural (Mitwally M, Casper R, 2004) e as taxas de recorrência do cancro da mama não parecem estar aumentadas ao fim de dois anos de *follow-up* (Kim S, *et al.* 2011). Embora os inibidores da aromatase estejam contra-indicados durante a gravidez, não existe evidência credível de que o seu uso antes da concepção constitua qualquer risco para o feto. Além de que, quando criopreservados para preservação da fertilidade, os embriões nunca são expostos ao fármaco, uma vez que a fecundação é realizada *in vitro,* e eles apenas são transferidos para o útero num ciclo em que o letrozole não tenha sido utilizado. Apesar de tudo, é necessário um seguimento mais prolongado para determinar a segurança, a eficácia e o impacto destes protocolos na recorrência e sobrevivência a longo prazo.

Esta técnica não poderá ser considerada por mulheres sem parceiro ou que não queiram utilizar esperma de um dador para fecundar os seus ovócitos, sendo também inaceitável e irrealizável em raparigas pré-púberes.

As questões éticas, legais e religiosas relacionadas com o armazenamento dos embriões geram preocupações adicionais. Ainda assim, a criopreservação de embriões deverá ser considerada a primeira opção para preservação da fertilidade de mulheres com parceiro e que disponham de tempo suficiente para se submeter a pelo menos um ciclo de FIV.

3.2. Criopreservação de ovócitos maduros

A criopreservação de ovócitos é uma alternativa à criopreservação de embriões, não sendo necessário um indivíduo do sexo masculino e apresentando menos problemas éticos. Contudo, o adiamento da terapêutica mantém-se, dada a necessidade de estimular os ovários para colheita dos ovócitos. Resulta ainda em taxas de gravidez inferiores às observadas com a

utilização de embriões criopreservados, rondando os 1-5% por ovócito (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004).

Ao sucesso inicial da criopreservação de ovócitos, seguiram-se quase duas décadas de fracasso, atribuído a várias dificuldades como a formação intracelular de cristais de gelo, a activação artificial do fuso mitótico e a turgescência osmótica.

Os ovócitos retidos em metafase II são bastante sensíveis à congelação, provavelmente devido à sensibilidade do fuso mitótico, totalmente distendido, ao arrefecimento e à exposição aos crioprotectores, podendo agravar a já elevada incidência de aneuploidias nos ovócitos humanos. Também as grandes dimensões e o elevado teor de água os tornam mais vulneráveis à formação de cristais de gelo e consequente rotura. Os crioprotectores são também causa de endurecimento da zona pelúcida, pelo que, os protocolos de criopreservação de ovócitos envolvem a injecção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) como precaução, o que melhorou significativamente as taxas de fertilização, que rondam agora os 60-70% (Jensen J, *et al.*, 2011).

Outra desvantagem desta técnica deve-se ao facto de as pacientes poderem não ter mais do que uma oportunidade para colheita dos ovócitos, dado que um ciclo de estimulação controlada requer várias semanas, condicionando um atraso de alguns meses no início da terapêutica. O sucesso deste método está também dependente do número total de ovócitos colhidos.

Desde o nascimento do primeiro ser humano em 1986, resultante da fecundação de ovócitos maduros criopreservados, até à data, mais de 1000 bebés nasceram sem incremento aparente de anomalias congénitas ou efeitos pós-natais adversos, como baixo peso ao nascer. Apesar disso, a ineficiência persiste e a técnica é ainda considerada experimental (Woodruff T, 2010).

Contudo, com a introdução da ICSI e a publicação de dados animadores, nos últimos anos foram retomados esforços no sentido de criopreservar ovócitos, com protocolos convencionais de congelação lenta e descongelação rápida, minimizando desta forma a formação de gelo intracelular e consequentemente os danos estruturais, e mais tarde recorrendo à vitrificação.

O principal problema do arrefecimento lento é o tempo de exposição do ovócito aos crioprotectores. De facto, a taxa de arrefecimento deveria ser suficientemente lenta para permitir a desidratação e evitar a formação de gelo intracelular, mas suficientemente rápida para evitar os efeitos tóxicos dos crioprotectores.

A vitrificação é um método de congelação ultra-rápida, que associa elevadas concentrações de crioprotectores a um arrefecimento rápido simultâneo, resultando na solidificação sem formação de cristais de gelo. Contudo, as elevadas concentrações de crioprotectores tipicamente empregados estão associadas a níveis superiores de toxicidade e lesões osmóticas, e, apesar de alguns progressos, pouco é conhecido sobre os possíveis efeitos prejudiciais para os ovócitos.

3.3. Criopreservação de ovócitos após maturação *in vitro*

Os ovócitos imaturos são uma fonte abundante e regularmente disponível de gâmetas femininos. Estes podem ser obtidos a partir de tecido ovárico fresco ou criopreservado ou através de aspiração folicular, não necessitando de estimulação ovárica e sendo, por isso, uma técnica aplicável a raparigas pré-púberes. Nesta fase, não existe ainda um fuso mitótico susceptível ao arrefecimento ou aos crioprotectores e os cromossomas estão protegidos pela membrana nuclear. Também o menor volume celular dos ovócitos imaturos representa uma vantagem (Tabela 2).

No entanto, os ovócitos têm que crescer *in vitro* e sofrer maturação para que possam ser fecundados. A maturação *in vitro* combinada com a vitrificação dos ovócitos é uma opção viável quando existe um limitado período de tempo entre o diagnóstico do cancro e o início do tratamento, ou quando a estimulação ovárica está contra-indicada, tendo já resultado no nascimento de 4 bebés saudáveis (Woodruff T. 2010). Contudo, devido à constante ineficiência da maturação *in vitro*, o número total de ovócitos maduros obtidos é semelhante ao obtido com a criopreservação de ovócitos em metafase II.

Tabela 2 - MATURAÇÃO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS	
Vantagens	**Desvantagens**
Colheita imediata (sem adiamento do tratamento)	Necessidade de procedimento cirúrgico para colheita do tecido ou aspiração folicular
Sem necessidade de parceiro do sexo masculino	Sensibilidade dos ovócitos à criopreservação
Evita o risco de transferência de células neoplásicas	Baixa taxa de sucesso
Preservação da fertilidade	(Adaptado de Varghese A, *et al.* 2008)
Aplicável a raparigas pré-púberes	

Assim, este procedimento requer avanços adicionais na área da criotecnologia, estando associado a uma taxa relativamente baixa de gravidez, bem como a uma elevada taxa de abortamentos.

3.4. Criopreservação de tecido ovárico

Actualmente, é a única opção disponível para preservação da fertilidade em crianças pré-púberes. É também uma opção para doentes cujo cancro seja hormonodependente e para doentes cujo adiamento do tratamento para estimulação hormonal não seja possível ou que não queiram submeter-se a essa mesma estimulação (Woodruff T. 2010). Não implica o envolvimento de um indivíduo do sexo masculino e pode ser realizada em qualquer altura do ciclo, não impedindo o início imediato da terapêutica (Tabela 3).

Tiras do córtex ovárico, contendo maioritariamente folículos pequenos e imaturos, são isoladas, criopreservadas por congelação lenta ou vitrificação e armazenadas para uso futuro. As tiras deverão ser suficientemente pequenas e de espessura reduzida, para permitir uma penetração adequada dos crioprotectores. Na maioria dos casos a cirurgia pode ser realizada por laparoscopia em ambulatório, devendo ser discutidos os riscos de complicações cirúrgicas e da anestesia geral com a doente ou seus pais.

Esta técnica baseia-se no facto de os folículos primordiais existentes no córtex ovárico serem mais resistentes à congelação, devido ao seu pequeno tamanho, à sua baixa taxa metabólica e ausência de zona pelúcida e fuso mitótico (Chang H, Suh C 2008).

Apresenta ainda menos restrições logísticas e um maior potencial de fertilidade quando comparada com criopreservação de ovócitos imaturos, devido ao número muito mais elevado de ovócitos preservados.

No entanto, esta técnica continua a ser experimental, embora a viabilidade folicular após criopreservação e descongelação tenha sido demonstrada em vários estudos (Maltaris T, *et al.* 2009).

Existem três opções, ainda que experimentais, para o tecido ovárico criopreservado: autotransplante, xenotransplante e cultura folicular *in vitro*.

Presentemente, o autotransplante é a única estratégia clinicamente aplicável. Até à data, quase todas as mulheres com insuficiência ovárica prematura sujeitas a autotransplante de tecido ovárico, conseguiram o restabelecimento da sua função endócrina, embora poucas tenham posteriormente engravidado e dado à luz bebés saudáveis (Woodruff T. 2010). O primeiro nascimento resultante desta técnica foi descrito por Donnez *et al.*, em 2004, numa doente com linfoma de Hodgkin, tratada com quimioterapia e radioterapia, havendo contudo reticências quanto à origem do ovócito, uma vez que não pode ser excluída a possibilidade de ovulação espontânea do tecido ovárico remanescente (Demeestere I, *et al.* 2007). Em doentes diagnosticadas com cancro, aproximadamente trinta autotransplantes resultaram no nascimento de treze crianças, algumas das quais consequentes de gravidezes espontâneas (Kim S, *et al.* 2011). Todavia, apesar deste avanço, as taxas de sucesso são ainda baixas.

A transplantação pode ser ortotópica ou heterotópica, sendo por vezes concomitante. A primeira possibilitará uma gravidez espontânea, se o tecido for colocado intraperitonealmente, geralmente ao nível da fossa ovárica ou no ovário existente, e se se verificar a integridade das trompas uterinas. Requer, no entanto, cirurgia abdominal e anestesia geral. Por sua vez, a localização heterotópica necessitará da administração de gonadotrofinas exógenas para estimulação do desenvolvimento folicular, seguida da colheita de ovócitos para FIV e posterior transferência dos embriões. O enxerto é frequentemente colocado ao nível do tecido celular subcutâneo do antebraço ou da parede abdominal (Chang H, Suh C. 2008). Outros locais foram também testados em humanos, como o útero, o músculo recto abdominal e o espaço entre o tecido mamário e a fáscia do músculo peitoral (Demeestere I, *et al.* 2009), sendo ainda desconhecida a localização heterotópica óptima para a transplantação (Kim S, *et al.* 2011). A localização heterotópica tem a vantagem de ser minimamente invasiva, reversível, e permitir um fácil acesso ao enxerto. No entanto, a

longevidade dos enxertos ováricos é desconhecida, podendo, nalguns casos, ser necessário um novo transplante.

Apesar da eficácia na restauração da função endócrina, não foi ainda descrita qualquer gravidez subsequente à transferência de embriões obtidos a partir de ovócitos de tecido ovárico transplantado heterotopicamente (Kim S, *et al.* 2011). Relativamente a esta localização, tem também sido afirmado que a qualidade dos ovócitos poderá ser comprometida, devido a diferenças na temperatura e pressão locais que podem interferir no desenvolvimento folicular (Chang H, Suh C. 2008). De facto, em 2004, Oktay *et al.*, obtiveram apenas um embrião de quatro células num total de vinte ovócitos obtidos a partir de tecido ovárico transplantado subcutaneamente no abdómen, dos quais apenas oito reuniam condições para realização de FIV. Mais tarde, Kim *et al.*, (2009) publicaram um estudo em que dos seis ovócitos colhidos em enxertos heterotópicos (implantados entre o músculo recto e a fáscia), apenas quatro foram fecundados, originando embriões de até seis células.

O grande problema da transplantação ovárica deve-se ao tempo de revascularização e consequente isquémia, que conduz a uma depleção acelerada de folículos primordiais, também demonstrada pelos níveis séricos hormonais, com diminuição da HAM e elevação da FSH (Demeestere I, *et al.* 2009). As lesões isquémicas associam-se também a fibrose significativa e redução importante do tamanho do enxerto.

Têm sido descritas várias tentativas para contornar esta situação, entre as quais agentes antioxidantes, factores de crescimento, hormonas e estimulação mecânica da angiogénese, embora sem grandes resultados (Demeestere I, *et al.* 2009). A melhor opção para encurtar o período isquémico parece ser a transplantação de todo o ovário através de uma anastomose vascular. Espera-se, com esta abordagem, a irrigação imediata do tecido transplantado, minimizando assim as lesões isquémicas e a depleção folicular, e melhorando a longevidade dos enxertos, actualmente variando entre poucos meses e mais de dois anos. Bedaiwy M, *et*

al. (2006) compararam ovários intactos criopreservados com o pedículo vascular, com tiras de córtex ovárico de mulheres submetidas a ooforectomia bilateral, também criopreservadas, usando um protocolo de congelação lenta. Após a sua descongelação, os resultados foram semelhantes, provando que é possível a criopreservação do ovário íntegro com manutenção da viabilidade dos folículos primordiais e da arquitectura histológica normal, sem evidência de lesão vascular. Todavia, apesar do sucesso verificado em ratinhos (Kim S, 2006) e ovelhas (Varghese A, *et al.* 2008), a anastomose vascular continua a ser tecnicamente desafiante.

Os riscos desta técnica de preservação da fertilidade incluem a possibilidade de transferência de células neoplásicas com a reimplantação do tecido ovárico, pelo que é mandatório que este seja cuidadosamente examinado recorrendo a técnicas histológicas, de imunohistoquímica, citometria de fluxo ou genética molecular, com o objectivo de excluir uma possível contaminação do material por células neoplásicas, particularmente importante nas neoplasias hematológicas, como as leucemias (Jeruss J, Woodruff T. 2009). Um estudo desenvolvido por Dolmans *et al.* (2010) demonstrou, através de técnicas de reacção da polimerase em cadeia (PCR), a contaminação do tecido ovárico de doentes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mielóide crónica (LMC) por células neoplásicas, tendo a análise histológica sido negativa. Após a xenotransplantação em ratinhos, aqueles que receberam tecido ovárico humano de doentes com LLA desenvolveram massas leucémicas peritoneais a partir dos enxertos. Para além disso, Dolmans *et al.* (2010) demonstraram ainda que a quimioterapia prévia à criopreservação ovárica não exclui a contaminação maligna.

O neuroblastoma e o cancro da mama apresentam também um risco moderado de metastização ovárica. No caso de portadoras de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, não é aconselhado o uso desta técnica devido à possibilidade de desenvolvimento de cancro no tecido transplantado.

Tabela 3 - CRIOPRESERVAÇÃO E TRANSPLANTAÇÃO DE TECIDO OVÁRICO	
Vantagens	**Desvantagens**
Colheita imediata (sem adiamento do tratamento)	Necessidade de procedimento cirúrgico para colheita do tecido e transplantação
Sem necessidade de parceiro do sexo masculino	Possibilidade de reintrodução de células malignas
Recuperação da função endócrina	Baixa taxa de sucesso
Preservação da função reprodutiva	
Aplicável a raparigas pré-púberes	(Adaptado de Varghese A, *et al.* 2008)

A xenotransplantação provou ser um método eficaz no desenvolvimento dos ovócitos imaturos contidos no tecido ovárico (Kim, S. 2006). No entanto, questões éticas e de segurança proíbem a sua utilização clínica.

O crescimento e maturação folicular são um processo complexo que requer comunicação entre o ovócito e as células somáticas circundantes.

No passado, os impedimentos à cultura *in vitro* dos folículos ováricos resultaram das limitações dos meios de cultura bidimensionais. Especificamente, esses sistemas não conseguem manter a arquitectura folicular nem as interacções entre o ovócito e as células somáticas, essenciais para o crescimento folicular e maturação ovocitária. Contudo, novas descobertas nos campos da ciência de materiais e da biologia reprodutiva, permitiram o desenvolvimento de um meio de cultura tridimensional baseado em alginato, o qual mimetiza a estrutura ovárica natural nos estágios finais da maturação folicular. Com este sistema, o normal desenvolvimento é promovido adicionando factores solúveis que regulam o crescimento e mantendo as interacções celulares necessárias num ambiente fisicamente suportado. Estão em curso estudos com folículos humanos obtidos a partir de um ovário

removido laparoscopicamente antes de iniciada a terapêutica antineoplásica e desenvolvidos em meio de cultura de alginato, para avaliar a eficácia desta técnica em mulheres sobreviventes de doenças neoplásicas (Woodruff T. 2010). Actualmente, é possível a cultura *in vitro* de folículos humanos por 30 dias, havendo uma correlação entre o crescimento e desenvolvimento do ovócito e um aumento do tamanho folicular, o que representa uma importante conquista (Xu M, *et al.* 2009). A vantagem deste método deve-se ao facto de o crescimento folicular ocorrer inteiramente *in vitro*, fornecendo um ovócito maduro apto a ser fecundado. O embrião resultante, não contendo células somáticas da dadora, poderá, num futuro próximo, ser transferido para a paciente ou outra receptora, sem o risco de reintrodução de células malignas, uma vez que não será necessária a reimplantação do tecido ovárico. No entanto, este procedimento não restabelece a função endócrina da paciente, que necessitará de suporte hormonal para a gravidez e durante a sua vida, devido à insuficiência ovárica prematura secundária ao tratamento antineoplásico. Também a maturação meiótica terminal aguarda desenvolvimentos (Woodruff T. 2010).

O benefício da criopreservação ovárica em mulheres com mais de 40 anos é inconstante, devido ao número reduzido de folículos primordiais remanescentes. Kim *et al.* (2011) defendem que doentes com níveis séricos reduzidos de HAM (< 0,3 ng/mL) não serão boas candidatas para criopreservação ovárica. Como tal, um método que permitisse a identificação da presença e densidade folicular numa amostra representativa de tecido ovárico prévia ao crioarmazenamento, e também após a descongelação, seria extremamente útil para garantir que apenas o tecido com uma densidade folicular elevada fosse utilizado. Segundo Chambers *et al.* (2010), a coloração com vermelho neutro é um método aplicável e válido para esse propósito, pois embora o ovário seja um órgão heterogéneo, este corante destaca preferencialmente os folículos saudáveis em relação às outras estruturas não foliculares presentes no córtex ovárico, permitindo a avaliação da densidade folicular. A comparação dos

resultados entre tecido ovino fresco e criopreservado mostrou a existência de significativamente menos folículos corados no córtex criopreservado, o que sustenta o conceito de que a criopreservação induz danos foliculares e ovocitários.

3.5. Ooforopexia (transposição ovárica)

O reposicionamento dos ovários fora do campo de radiação antes do início da terapêutica permite uma melhor protecção contra os efeitos prejudiciais da radiação, aumentando assim a possibilidade de preservar a sua função. Esta técnica representa um benefício para mulheres em idade reprodutiva com patologia pélvica maligna, que irão ser submetidas a radioterapia. A ooforopexia pode ser realizada por laparotomia durante um procedimento cirúrgico para remoção da massa tumoral, ou, em alternativa, por laparoscopia, nomeadamente em mulheres que não necessitam de cirurgia abdomino-pélvica. Esta última abordagem apresenta algumas vantagens, entre as quais, o curto período de hospitalização e um número reduzido de complicações pós-operatórias, tendo igualmente elevada eficácia.

O local de reposicionamento mais apropriado dependerá do campo de irradiação planeado para cada caso individualmente.

No entanto, este procedimento não oferece protecção contra os danos causados pela quimioterapia, e, como qualquer outro procedimento, não está isento de riscos. Entre eles, lesões vasculares, isquémia das trompas, elevada taxa de quistos ováricos, dor crónica, ou mesmo a migração dos ovários para a sua posição inicial, pelo que a ooforopexia deverá ser realizada tão perto do tratamento quanto possível. Existe ainda a possibilidade de o procedimento em si causar falência ovárica (Stroud J, *et al.* 2009), pelo que a mulher deverá ser devidamente informada do risco destas possíveis complicações. Também os danos uterinos provocados pela radiação podem reduzir as hipóteses de uma gravidez bem sucedida.

Muito frequentemente, após a realização de ooforopexia torna-se necessário recorrer às técnicas de FIV para possibilitar a fertilidade (Meirow D, Nugent D. 2001).

3.6. Cirurgia conservadora

Embora a maioria dos cancros ginecológicos sejam diagnosticados em idades mais avançadas, 21% ocorrem em mulheres em idade reprodutiva (Liou W, *et al.* 2005), muitas delas ainda sem filhos ou com famílias incompletas. Este facto leva a que a cirurgia conservadora seja considerada como opção terapêutica, com o objectivo de preservar a fertilidade.

3.6.1. Cancro do colo do útero

Aproximadamente 15% de todos os cancros do colo do útero e 45% dos cancros no estadio IB tratados cirurgicamente surgem em mulheres com idade inferior a 40 anos (Beiner M, Covens A, 2007).

Habitualmente, o cancro invasivo do colo do útero é tratado por histerectomia total. No entanto, em carcinomas microinvasivos é possível considerar uma abordagem menos radical. De acordo com a Sociedade Portuguesa de Ginecologia, nos estadios precoces – IA1, IA2 e IB1 $\leq$ 2 cm – pode ser realizada cirurgia conservadora (conização). Contudo, os dados sobre o tratamento conservador de adenocarcinomas microinvasivos são limitados. E a doente deve ter em mente que, embora a fertilidade não seja, geralmente, afectada pela conização, existe um risco elevado de abortamento tardio e prematuridade (Liou W, *et al.* 2005).

No estadio IB, os tratamentos convencionais com histerectomia total e linfadenectomia pélvica bilateral, radioterapia externa ou braquiterapia, resultam na perda de

fertilidade. Como tal, a traquelectomia radical, com ou sem linfadenectomia pélvica associada, foi proposta em 1994 por Daniel Dargent como uma opção conservadora para estadios iniciais de carcinomas invasivos, que, caso contrário, seriam tratados por histerectomia radical, tendo já originado mais de 100 nados vivos (Beiner M, Covens A, 2007). Resumidamente, este procedimento consiste numa vaginotomia, dissecação paravaginal e paracervical, anastomose do ramo descendente da artéria uterina e secção transversa do colo distal, deixando aproximadamente 1 cm de colo proximal abaixo do istmo. Pode depois ser colocada uma cerclage no colo restante e a mucosa vaginal é suturada à circunferência do coto cervical. Pode ser realizado quer por via abdominal, quer por via vaginal associada a laparoscopia. Uma das consequências da remoção cirúrgica de grande parte do colo é a incompetência cervical, pelo que, após uma traquelectomia, existe um risco significativo de abortamento tardio, rotura prematura de membranas e parto pré-termo (Liou W, *et al.* 2005).

A morbilidade associada a este procedimento é baixa quando usados os critérios de selecção adequados, com uma taxa de recorrência de 5%, comparável à da histerectomia radical (Beiner M, Covens A, 2007).

3.6.2. Cancro do endométrio

O carcinoma do endométrio é o cancro ginecológico mais frequente, e embora tenha maior incidência após a menopausa, cerca de 5% dos casos ocorrem em mulheres em idade reprodutiva (Al-Talib A, *et al.* 2009). O tratamento cirúrgico convencional consiste numa histerectomia total associada a salpingo-ooforectomia bilateral, com eventual linfadenectomia pélvica.

Uma técnica conservadora foi proposta por Mazzon *et al.* (2010) para mulheres com adenocarcinoma do endométrio no estadio IA. Esta técnica consiste na ressecção da neoplasia por histeroscopia, seguida de hormonoterapia com acetato de megestrol por um período de 6 meses. Nenhuma das mulheres participantes no estudo apresentou recorrência, tendo resultado em cinco nascimentos, decorrentes de gravidezes espontâneas. No entanto, os mesmos autores recomendam a histerectomia total após o parto dado que o risco de progressão da neoplasia após tratamento conservador é de 5-6%.

3.6.3. Cancro do ovário

O carcinoma epitelial do ovário é o segundo cancro ginecológico mais comum, e a quarta causa de morte por cancro em mulheres, 3-17% dos quais ocorrem em mulheres com idade inferior a 40 anos (Kwon Y, 2009). A abordagem convencional consiste numa histerectomia total com anexectomia bilateral, omentectomia, linfadenectomia pélvica e para-aórtica e biópsias peritoneais. A quimioterapia adjuvante poderá ser recomendada, dependendo do estadio, histologia e diferenciação tumoral.

A abordagem conservadora baseia-se na realização de uma salpingo-ooforectomia unilateral (acompanhada ou não de linfadenectomia bilateral pélvica e para-aórtica, omentectomia e biópsias múltiplas) em mulheres jovens com carcinomas bem diferenciados, tendo sido obtidos resultados favoráveis em vários estudos, pelo que esta abordagem pode ser segura em mulheres com carcinoma epitelial precoce do ovário que tenham sido adequadamente estadiadas (Liou W, *et al.* 2005). De facto, em doentes com tumores no estadio IA e IC, a preservação ovárica e uterina não demonstrou ter qualquer impacto negativo na sobrevivência aos 5 anos, tendo esta sido comparável à de mulheres tratadas convencionalmente descritas na literatura (Wright J, *et al.* 2009).

A cirurgia conservadora é também possível em mulheres com tumores malignos de células germinativas num estadio avançado, uma vez que não é comum acompanharem-se de doença ovárica contralateral (Liou W, *et al.* 2005). Já no caso dos tumores de células claras, dado o seu comportamento agressivo, a cirurgia conservadora deverá ser abordada com precaução (Wright J, *et al.* 2009).

Palomba S, *et al.* (2010) avaliaram a eficácia da cirurgia ultraconservadora (que consiste na quistectomia bilateral) em doentes com tumores ováricos borderline, característicos da idade reprodutiva e bilaterais numa percentagem de casos. O estudo demonstrou que, em doentes bem seleccionadas, esta abordagem apresenta vantagens significativas para a reprodução em termos de economia de tempo para engravidar e taxa cumulativa de gravidez, apesar da elevada taxa da recorrência, que pode ser controlada através de uma monitorização rigorosa e realização de cirurgia radical após o parto.

Também os benefícios não relacionados com a reprodução devem ser tidos em conta, aquando da avaliação de mulheres jovens com carcinomas ováricos, nomeadamente no que diz respeito às sequelas a longo prazo de uma menopausa cirúrgica precoce, como o risco aumentado de doenças cardiovasculares e osteoporose.

3.7. Supressão hormonal da função ovárica

O uso da supressão hormonal com o objectivo de proteger a função gonadal é baseado no facto de as células quiescentes serem geralmente mais resistentes à destruição provocada por determinados tóxicos, particularmente os agentes antineoplásicos, do que as células rapidamente proliferativas. Assim, a inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gónada por hormonas sexuais esteróides ou agonistas da hormona libertadora das gonadotrofinas

(GnRH), induzindo um estado pré-pubertário, tornaria o epitélio germinativo menos susceptível.

Os agonistas sintéticos da GnRH ligam-se aos receptores localizados na hipófise, induzindo inicialmente um efeito paradoxal de libertação de gonadotrofinas, que irá provocar uma breve hiperestimulação ovárica. Devido a esta resposta inicial, a maioria dos estudos descreve que o tratamento deverá iniciar-se cerca de duas semanas antes da quimioterapia, evitando que esta coincida com o período de hiperactividade ovárica. Após este período de hiperestimulação, os receptores hipofisários da GnRH são reprimidos e a libertação de gonadotrofinas impedida, resultando em níveis pré-pubertários de estrogénios (Clowse M, *et al.* 2009). O objectivo seria suspender a divisão celular e o desenvolvimento folicular, protegendo-os dos efeitos citotóxicos da quimioterapia.

Um outro mecanismo proposto que explique a protecção ovárica conferida pelos agonistas da GnRH é através da redução do fluxo sanguíneo ovárico, com consequente diminuição da quantidade de fármacos quimioterapêuticos que atinge o órgão. Foi também proposto um efeito directo dos agonistas no ovário, uma vez que não foram identificados receptores de gonadotrofinas nem de GnRH nos folículos primordiais (Meistrich M, Shetty G. 2008).

De facto, vários investigadores têm relatado o efeito protector a longo prazo da administração concomitante de agonistas da GnRH durante a quimioterapia, aumentando a probabilidade de as mulheres permanecerem pré-menopáusicas após o tratamento. No entanto, dados de estudos randomizados, não mostraram diferenças entre mulheres que haviam recebido concomitantemente a terapêutica de supressão ovárica e quimioterapia e mulheres tratadas apenas com quimioterapia (Maltaris T, *et al.* 2009).

Os análogos da GnRH não só são dispendiosos e causadores de sintomatologia menopáusica, como não são, também, suficientemente compreendidos os seus efeitos directos

nas células neoplásicas humanas. Alguns estudos revelam até, que o estado hipoestrogénico induzido por estes agentes poderá, na verdade, ter efeitos negativos em doentes com cancro da mama, detendo as células tumorais na fase G0 do ciclo celular e tornando-as menos sensíveis à quimioterapia (Emons G, *et al.*, 2003). Está também documentado que administrações superiores a 4 meses podem induzir perda de massa óssea, possivelmente irreversível com períodos de utilização mais prolongados (Maltaris T, *et al.* 2009).

Contudo, os estudos disponíveis são limitados pelo reduzido tamanho da amostra, ausência de estudos prospectivos e randomizados e escassez de informação definitiva sobre resultados efectivos de fertilidade. É necessária a realização de estudos prospectivos e randomizados de grandes dimensões para determinar se os agonistas da GnRH são verdadeiramente capazes de proteger a função do ovário humano.

Também a pílula contraceptiva e o acetato de medroxiprogesterona têm sido investigados como agentes supressores da função ovárica durante a quimioterapia, com resultados não muito animadores (Maltaris T, *et al.* 2009).

A ASCO aponta para a inexistência, até ao momento, de provas suficientes sobre a segurança e eficácia do uso de análogos da GnRH e outros meios de supressão ovárica na preservação da fertilidade feminina, recomendando que as mulheres interessadas sejam incentivadas a participar em ensaios clínicos.

3.8. Inibidores da apoptose

Os ovócitos possuem uma via apoptótica intrínseca, que pode ser activada por insultos como a radiação ou a quimioterapia. Como consequência lógica, o uso de inibidores da apoptose poderia interromper o processo apoptótico e proteger a doente de insuficiência ovárica prematura.

O uso de esfingosina-1-fosfato, um conhecido inibidor da apoptose, em ratinhos tratados com doxorrubicina, foi capaz de proteger os seus ovócitos da apoptose. Revelou-se, também, capaz de preservar a fertilidade de ratinhos fêmea submetidas a radiação, sem prejuízo para a descendência (Maltaris T, *et al.* 2009).

Estes estudos revelaram-se promissores, encontrando-se, no entanto, numa fase experimental muito precoce, não tendo ainda sido investigada a sua eficácia em humanos.

3.9. Outros métodos

Os recentes aperfeiçoamentos na área da radioterapia, permitem ao médico adequar a distribuição altamente conformacional da dose a volumes complexos com o objectivo de maximizar a cobertura dos tecidos alvo, poupando assim as estruturas normais. Actualmente, os sistemas de planeamento da radioterapia permitem uma avaliação significativa da dose que atingirá os ovários, através de histogramas de dose-volume. Para tal, é necessário conhecer a localização exacta dos ovários durante o tratamento, a qual pode variar com o enchimento e esvaziamento da bexiga. A recomendação à doente para que encha a bexiga e a inclusão de margens de segurança, aquando da delimitação dos ovários como tecido normal durante o planeamento do tratamento, contribuem para uma melhor preservação destes (Stroud J, *et al.* 2009).

Têm sido também descritas várias técnicas para redução da gonadotoxicidade aquando do tratamento de patologias do sistema nervoso central, que exijam radioterapia espinhal. Alguns investigadores propõem que campos laterais opostos para segmentos inferiores da medula espinhal, em vez do campo postero-anterior padrão, possam resultar em doses menores de radiação para os ovários (Stroud J, *et al.* 2009).

IV. DISCUSSÃO MÉDICO-DOENTE SOBRE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

O diagnóstico de cancro representa um período crítico na vida de qualquer pessoa. O seu impacto varia de acordo o tipo de cancro, perspectivas de tratamento e recursos físicos, emocionais e sociais da doente. Mulheres mais jovens enfrentam também a possibilidade de perda da função reprodutiva e da oportunidade de conceber, facto que causa grande impacto na sua qualidade de vida.

Os médicos oncologistas que sigam estas mulheres devem estar cientes dos efeitos adversos da terapêutica na fertilidade e de formas para minimizar esses mesmos efeitos. Se a gonadotoxicidade não puder ser evitada, devem também ter conhecimento da existência de opções para preservação da fertilidade, referenciando as doentes para especialistas da reprodução. Enquanto muitos médicos que acompanham mulheres jovens com cancro são sensíveis a estas questões, os oncologistas estão tradicionalmente focados em providenciar o tratamento mais eficaz para a cura da doença.

A ASCO recomenda que os oncologistas discutam, na primeira oportunidade, a possibilidade de infertilidade como um risco do tratamento antineoplásico, permitindo a referenciação para especialistas adequados tão cedo quanto possível. Após essa mesma referenciação, a decisão sobre quais os candidatos apropriados para técnicas específicas de preservação da fertilidade deve ficar a cargo de uma equipa multidisciplinar, guiada por protocolos escritos que possam ser partilhados com as doentes.

Apesar destas recomendações, os padrões de referenciação são ainda inconsistentes em muitos centros, e muitas mulheres em idade reprodutiva ainda iniciam os tratamentos sem uma discussão sobre, ou oportunidade para, preservação da fertilidade.

Os resultados de um inquérito piloto efectuado por Forman *et al.* (2009), indicam que, embora a maioria dos oncologistas reconheça a importância da discussão sobre o risco de

infertilidade decorrente das terapêuticas antineoplásicas, na prática, muitos não abordam o tema da preservação da fertilidade. As principais razões que apresentam são o mau prognóstico, a necessidade emergente de iniciar o tratamento e o facto de muitas destas mulheres já terem descendência no momento do diagnóstico. Outro estudo (Anderson R, *et al.*, 2008) revela ainda razões como um risco não significativo de infertilidade, a idade muito jovem, técnicas não comprovadas, financiamento e instalações inadequadas.

No entanto, inquéritos realizados a doentes com cancro revelaram que alguns destes motivos, especialmente a descendência já existente, não são válidos, visto que algumas mulheres podem querer completar a família ou podem ter um novo parceiro (Partridge A, *et al.* 2004). Os resultados sugerem também que o aumento da consciencialização por meio de eventos educativos abordando a preservação da fertilidade, poderá influenciar os padrões da prática corrente.

Por outro lado, nem todas as mulheres procurarão opções de preservação da fertilidade ou optarão por métodos interventivos, mesmo quando plenamente informadas sobre o risco de infertilidade. Num estudo prospectivo, envolvendo 215 mulheres em idade reprodutiva com cancro da mama, 63% não estariam dispostas a submeter-se a estimulação hormonal para preservação da fertilidade, devido a preocupações sobre a segurança, ao adiamento da terapêutica e ao custo elevado dos procedimentos (Woodruff T, 2010). De facto, a maioria dos seguros de saúde não contemplam as técnicas de procriação medicamente assistida, pelo que estas estão associadas a elevados encargos para a maioria das mulheres/casais.

Dada a escassez de informação relativamente às taxas de infertilidade feminina após os tratamentos antineoplásicos actuais e a variedade de factores individuais que influenciam a fertilidade, os oncologistas podem ter dificuldade em fornecer indicações precisas às suas doentes no que diz respeito aos riscos de infertilidade.

A informação disponível sobre os efeitos das intervenções conservadoras da fertilidade feminina na saúde materna e fetal é também limitada. Aparentemente, o maior risco reconhecido é um risco aumentado de incompetência cervical, abortamento, prematuridade e baixo peso à nascença, em mulheres com patologia ginecológica maligna submetidas a cirurgia conservadora para preservação da fertilidade, como a traquelectomia. Relativamente à descendência de mulheres submetidas a quimioterapia e radioterapia, e com excepção dos síndromas genéticos hereditários, os estudos disponíveis revelaram não haver um aumento do risco de anomalias genéticas, defeitos congénitos ou neoplasias (Jensen J, *et al.*, 2011).

No entanto, para melhor compreender as barreiras aos cuidados e as intervenções mais adequadas, é necessário aumentar a abrangência destes estudos, para determinar se as tendências identificadas são mais amplamente aplicáveis.

4.1. Quando engravidar?

O momento ideal para uma gravidez após terapêutica antineoplásica não é claro e depende do prognóstico, da idade e da situação individual de cada doente.

Meirow D. (2001) refere que pacientes com função ovárica preservada após quimioterapia ou radioterapia, não devam adiar por muito tempo a maternidade, embora recomende que concebam após um período livre de doença superior a 6-12 meses, devido aos possíveis efeitos tóxicos do tratamento nos ovócitos em desenvolvimento. Outros especialistas recomendam um período de espera de pelo menos dois anos após a conclusão dos tratamentos, especulando-se que seja esse o período de maior risco de recorrência (Jensen J, *et al.*, 2011). No caso de doentes com cancro da mama hormonodependentes, o tamoxifeno e os análogos da GnRH não induzem amenorreia permanente, mas este tratamento pode durar até 5 anos, período durante o qual a gravidez está contra-indicada (Maltaris T, *et al.* 2009),

tendo sido descritos casos de anomalias craniofaciais e do tracto genital associadas ao tamoxifeno (Knobf M. 2006; Hickey M, *et al.* 2009).

Vários estudos demonstraram que a gravidez após terapêutica antineoplásica não parece afectar negativamente a recorrência ou sobrevivência (Jensen J, *et al.*, 2011). Na verdade, de acordo com Kim *et al.* (2011), a gravidez após o diagnóstico de cancro da mama parece resultar num reduzido risco de recorrência, sobretudo em mulheres que aguardaram dois anos até à concepção. Há, no entanto, falta de evidência definitiva.

V. QUESTÕES ÉTICAS

Actualmente, a maioria das técnicas existentes para preservação da fertilidade em mulheres com cancro estão ainda em fase experimental e não garantem a sua recuperação. Como tal, a sua aplicação clínica pode ser eticamente complexa, especialmente em menores de idade. Os princípios da beneficência e da não maleficência são fundamentais no tratamento de menores, especialmente quando estejam psicologicamente vulneráveis. A aplicação das técnicas de preservação da fertilidade em crianças é complicada, devido à complexidade na obtenção do consentimento informado por parte dos menores e à possibilidade das decisões dos pais não reflectirem os desejos da criança quando esta atingir a idade adulta.

A principal consideração ética é a segurança dos procedimentos. Por exemplo, a criopreservação de ovócitos requer estimulação ovárica para colheita dos mesmos, implicando o adiamento do início da terapêutica e aumentando a probabilidade de crescimento tumoral e metástases (Chang H, Suh C, 2008). Como esta técnica não está ainda bem estabelecida e a taxa de gravidez é reduzida, não deverá ser recomendada se o adiamento da terapêutica antineoplásica puser em risco a saúde das doentes. Neste caso, os riscos ultrapassam os

benefícios, uma vez que o bem-estar físico da doente é prioritário relativamente à possibilidade futura de reprodução, a qual apenas sucederá se a doente sobreviver à doença.

A criopreservação de tecido ovárico é igualmente desafiante em termos éticos. O princípio ético *primum non nocere* deverá ser considerado antes de se propor esta técnica a crianças e mulheres jovens com cancro, porque apesar das vantagens descritas, pode existir um risco acrescido devido ao procedimento cirúrgico para obtenção do tecido ovárico, nomeadamente se a doente não necessitar de cirurgia abdominal como parte do tratamento e esta tiver que ser realizada electivamente. Também o risco de reintrodução de células neoplásicas com o autotransplante de tecido ovárico representa uma violação do princípio ético *primum non nocere* (Kim S, 2006).

A idade limite para a realização deste procedimento é discutível, mas não será eticamente correcto oferecê-lo a doentes cujos ovários estejam já esgotados de ovócitos, quer pela idade, quer devido a tratamentos antineoplásicos.

Na verdade, é um dilema ético se se deve de facto propor uma tecnologia nova e não comprovada com benefícios potenciais, mas com riscos conhecidos.

5.1. Consentimento informado

O consentimento é necessário para a investigação clínica envolvendo intervenções potencialmente prejudiciais. Para ser válido, deve ser informado, voluntário e dado por uma pessoa competente. A competência legal requer que o indivíduo seja capaz de compreender a informação fornecida, retê-la e usá-la para efectuar uma escolha esclarecida. As questões complexas da preservação da fertilidade e o tempo limitado para a sua discussão imposto pelos imperativos terapêuticos, reforçados pela ansiedade da doente e/ou dos seus pais, diminuirão, inevitavelmente, a validade do consentimento. As questões relacionadas com o

uso dos produtos crioarmazenados na eventualidade do falecimento da doente devem também ser discutidas.

VI. CONCLUSÃO

A preservação da fertilidade tornou-se um assunto de extrema importância, particularmente devido às crescentes taxas de cura e sobrevivência de adolescentes e mulheres com cancro em idade reprodutiva, cuja terapêutica é causa frequente de infertilidade.

A sensibilidade dos ovários à radiação e à quimioterapia resulta frequentemente no compromisso da fertilidade e menopausa precoce. Doses de radiação superiores a 24 Gy conduzirão a falência ovárica permanente. Doses mais baixas poderão ter o mesmo efeito dependendo da variabilidade individual. Relativamente à quimioterapia, os fármacos gonadotóxicos mais comuns são os agentes alquilantes, como a ciclofosfamida. Também as terapêuticas cirúrgicas convencionais da maioria das neoplasias ginecológicas impossibilitam o decurso de uma gravidez.

Relativamente às técnicas de preservação da fertilidade, a transposição ovárica e a criopreservação de embriões continuam a ser os únicos métodos bem estabelecidos. A criopreservação de ovócitos e de tecido ovárico são alternativas, embora ainda experimentais e com taxas de sucesso inferiores. Em casos bem seleccionados, a cirurgia conservadora pode ser vantajosa. A opção mais apropriada deverá ser seleccionada de acordo com cada caso individual, por uma equipa multidisciplinar, considerando vários factores, como a idade da doente, o tipo de tratamento e o espaço de tempo disponível antes do seu início, para além das indicações e riscos de cada método.

Mulheres jovens com cancro são ainda pouco aconselhadas relativamente ao impacto negativo do tratamento na fertilidade e às suas opções para preservação da fertilidade. O médico deverá ter um papel activo tanto na redução da toxicidade ovárica como providenciando os meios para que a doente possa tomar uma decisão informada sobre as suas opções.

As questões éticas relativas à aplicação clínica das estratégias de preservação da fertilidade são complexas e desafiantes. E embora grande parte dessas estratégias sejam actualmente experimentais, esforços incessantes com o intuito de aperfeiçoá-las irão beneficiar, no futuro, muitas mulheres e crianças com cancro.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Talib A, Nezhat F, Tulandi T (2009) Fertility preservation in women with gynaecological cancer. European Obstetrics and Gynaecology 4:35-39.

Anderson R, *et al.* (2008) Do doctors discuss fertility issues before they treat young patients with cancer? Human Reproduction 23:2246-2251.

Anderson R, Wallace W, Baird D (2008) Ovarian cryopreservation for fertility preservation: indications and outcomes. Reproduction 136:681-689.

Azim A, Costantini-Ferrando M, Oktay K (2008) Safety of fertility preservation by ovarian stimulation with letrozole and gonadotropins in patients with breast cancer: a prospective controlled study. Journal of Clinical Oncology 26:2630-2635.

Bedaiwy M, *et al.* (2006) Cryopreservation of intact human ovary with its vascular pedicle. Human Reproduction 21:3258-3269.

Bedaiwy M, *et al.* (2008) Reproductive outcome after transplantation of ovarian tissue: a systematic review. Human Reproduction 23:2709-2717.

Beiner M, Covens A (2007) Surgery insight: radical vaginal trachelectomy as a method of fertility preservation for cervical cancer. Nature Clinical Practice Oncology 4:353-361.

Chambers E, *et al.* (2010) *In situ* identification of follicles in ovarian cortex as a tool for quantifying follicle density, viability and developmental potential in strategies to preserve female fertility. Human Reproduction 25:2559-2568.

Chang H, Suh C (2008) Fertility preservation for women with malignancies: current developments of cryopreservation. Journal of Gynecologic Oncology 19:99-107.

Clowse M, *et al.* (2009) Ovarian preservation by GnRH agonists during chemotherapy: a meta-analysis. Journal of Women's Health 18:311-319.

Coleman S, Grothey A (2011) Should oncologists routinely discuss fertility preservation with cancer patients of childbearing age? Mayo Clinic Proceedings 86:6-7.

Critchley H, Wallace W (2005) Impact of cancer treatment on uterine function. Journal of the National Cancer Institute Monographs 34:64-68.

Dath C, *et al.* (2010) Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. Human Reproduction 25:1734-1743.

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

Demeestere I, *et al.* (2009) Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. Human Reproduction Update 15:649-665.

Dolmans M, *et al.* (2010) Reimplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. Blood 116:2908-2914.

Donnez J, *et al.* (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. The Lancet 364:1405-1410.

Duffy C, Allen S (2009) Medical and psychosocial aspects of fertility after cancer. Cancer Journal 15:27-33.

Emons G, *et al.* (2003) GnRH antagonist in the treatment of gynecological and breast cancers. Endocrine-Related Cancer 10:291-299.

Ezcurra D, *et al.* (2009) The human oocyte preservation experience (HOPE) a phase IV, prospective, multicenter, observational oocyte cryopreservation registry. Reproductive Biology and Endocrinology 7:53-56.

Farber L, *et al.* (2005) Laparoscopic ovarian transposition to preserve ovarian function before pelvic radiation and chemotherapy in a young patient with rectal cancer. Medscape General Medicine 7:66.

Forman E, *et al.* (2009) Pilot survey of oncologists regarding treatment-related infertility and fertility preservation in female cancer patients. Journal of Reproductive Medicine 54:203-207.

González C, *et al.* (2011) Combined strategy for fertility preservation in an oncologic patient: vitrification of in vitro matured oocytes and ovarian tissue freezing. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 28:1147-1149.

Hickey M, *et al.* (2009) Breast cancer in young women and its impact on reproductive function. Human Reproduction Update 15:323-339.

Jensen J, Morbeck D, Coddington C (2011) Fertility preservation. Mayo Clinic Proceedings 86:45-49.

Jeruss J, Woodruff T (2009) Preservation of fertility in patients with cancer. New England Journal of Medicine 360:902-911.

Kim S (2006) Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. Fertility and Sterility 85:1-11.

Kim S, *et al.* (2009) Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. Fertility and Sterility 91:2349-2354.

Kim S, Klemp J, Fabian C (2011) Breast cancer and fertility preservation. Fertility and Sterility 95:1535-1543.

Knobf M (2006) The influence of endocrine effects of adjuvant therapy on quality of life outcomes in young breast cancer survivors. The Oncologist 11:96-110.

Kwon Y, *et al.* (2009) Fertility preservation in patients with early epithelial ovarian cancer. Journal of Gynecologic Oncology 20:44-47.

Lee S, *et al.* (2006) American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. Journal of Clinical Oncology 24:2917-2931.

Liou W, *et al.* (2005) Innovations in fertility preservation for patients with gynecologic cancers. Fertility and Sterility 84:1561-1573.

Maltaris T, *et al.* (2008) Cancer and fertility preservation: fertility preservation in breast cancer patients. Breast Cancer Research 10:206-216.

Maltaris T, Weigel M, Dittrich R (2009) Cancer and fertility preservation in females: where we stand and where we are heading. Expert Review of Endocrinology and Metabolism 4:79-89.

Mazzon I, *et al.* (2010) Conservative surgical management of stage IA endometrial carcinoma for fertility preservation. Fertility and Sterility 94:1286-1289.

Meirow D, Nugent D (2001) The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Human Reproduction Update 7:535-543.

Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T (2005) Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. New England Journal of Medicine 353:318-321.

Meistrich M, Shetty G (2008) Hormonal suppression for fertility preservation in males and females. Reproduction 136:691-701.

Mitwally M, Casper R (2004) Aromatase inhibitors in ovulation induction. Seminars in Reproductive Medicine 22:61-78.

Oktay K, *et al.* (2003) Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifeno. Human Reproduction 18:90-95.

Oktay K, *et al.* (2004) Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. The Lancet 363:837-840.

Oktay K, *et al.* (2005) Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. Journal of Clinical Oncology 23:4347-4353.

Oktem O, Oktay K (2009) Fertility preservation for breast cancer patients. Seminars in Reproductive Medicine 27:486-492.

Palomba S, *et al.* (2010) Ultra-conservative fertility-sparing strategy for bilateral borderline ovarian tumours: an 11-year follow-up. Human Reproduction 25:1966-1972.

Partridge A, Gelber S, Peppercorn J, *et al.* (2004) Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. Journal of Clinical Oncology 22:4174-4183.

Quinn G, *et al.* (2010) Frozen hope: fertility preservation for women with cancer. Journal of Midwifery and Women's Health 55:175-180.

Revel A, Revel-Vilk S (2010) Fertility preservation in young cancer patients. Journal of Human Reproductive Sciences 3:2-7.

Roberts J, Oktay K (2005) Fertility preservation: a comprehensive approach to the young woman with cancer. Journal of the National Cancer Institute Monographs 34:57-59.

Seli E, Tangir J (2005) Fertility preservation options for female patients with malignancies. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology 173:299-308.

Smitz J, *et al.* (2010) Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. Human Reproduction Update 16:395-414.

Stroud J, *et al.* (2009) Effects of cancer treatment on ovarian function. Fertility and Sterility 92:417-427

Tao T, Del Valle A (2008) Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 25:287-296.

The Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2005) Fertility preservation and reproduction in cancer patients. Fertility and Sterility 83:1622-1628.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2004) Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. Fertility and Sterility 82:993-998.

Varghese A, *et al.* (2008) Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: challenges for fertility preservation. Reproductive Biology and Endocrinology 6:47-56.

Wallace W, Thomson A (2003) Preservation of fertility in children treated for cancer. Archives of Disease in Childhood 88:493-496.

Wallace W, Barr R (2010) Fertility preservation for girls and young women with cancer: what are the remaining challenges? Human Reproduction Update 16:614-616.

Woodruff T (2010) The Oncofertility Consortium – addressing fertility in young people with cancer. Nature Reviews Clinical Oncology 7:466-475.

Wright J, *et al.* (2009) Fertility preservation in young women with epithelial ovarian cancer. Cancer 115:4118-4126.

Xu M, *et al.* (2009) In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. Human Reproduction 24:2531-2540.