

MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE: REVISÃO DE LITERATURA

FERTILITY PRESERVATION METHODS: LITERATURE REVIEW

BÁRBARA VENUTO CASTRO SOARES DE MOURA¹, LUÍS FELIPE VIDAL DE SOUZA PENNA^{2*},
MARCOS HENRIQUE CAMPOS LOPES³, WILLIAN SOARES⁴, JOSÉ HELVÉCIO KALIL DE SOUZA⁵

1. Acadêmica do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 2. Acadêmico do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 3. Acadêmico do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 4. Acadêmico do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES - Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil; 5. Docente do curso de Medicina do Instituto Metropolitano de Ensino Superior/IMES – Univaço, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. Orientador do TCC.

* Rua Moacir Birro, 287, Coronel Fabriciano, Minas Gerais, Brasil, CEP: 35170-002, lfvspenna@hotmail.com

Recebido em 23/11/2015. Aceito para publicação em 08/01/2016

RESUMO

O desejo de constituir família é algo inerente a quase todas as pessoas e se torna um motivo de discussão relevante quando, por algum motivo, possa haver algum tipo de interferência. Seja por algum tipo de patologia como o câncer, seja pelo desejo crescente de algumas mulheres, em idade mais avançada, de constituir família o avanço recente na área da medicina reprodutiva adquire grande relevância no sentido de como aconselhar as mulheres que desejam constituir família num momento futuro para que possam ser beneficiadas. O objetivo deste trabalho foi buscar informações acerca de alguns dos métodos disponíveis para preservar a fertilidade das mulheres, como a transposição ovariana e a criopreservação de embriões, oócitos e de tecido cortical ovariano, observando suas indicações, vantagens, desvantagens e possíveis complicações para que, dessa forma, seja possível aconselhar as mulheres acerca dos melhores métodos disponíveis, individualizando cada caso.

PALAVRAS-CHAVE: Fertilidade, embrião, Oócito.

ABSTRACT

Due The desire to constitute a family is inherent to almost all people and becomes an important subject when it may have some kind of interference for some reason. Due some kind of disease like cancer or the growing desire of some women in older age to constitute a family, the recent advances in the field of reproductive medicine get great relevance in the sense of how to counsel and benefit women who wish to constitute a family at a future time. This paper objective was to collect information about some of the available methods to preserve women's fertility as ovarian transposition and cryopreservation of embryos, oocytes and ovarian cortical tissue, noticing their indications, advantages, disadvantages and possible complications to, in that way, be possible to advise women about the best methods available, individualizing each case.

KEYWORDS: Fertility, embryo, oocyte.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas a serem enfrentados pela medicina reprodutiva neste início de século se constitui da necessidade de preservação da capacidade reprodutiva da mulher¹.

A preocupação com o futuro reprodutivo de pacientes que serão submetidos a tratamentos oncológicos como rádio e quimioterapia merece cada vez mais espaço. A qualidade de vida em longo prazo deve ser sempre considerada. Nos últimos anos, essa preocupação impulsionou as investigações no sentido de prevenir, ou ao menos minimizar, o dano gonadal em pacientes com doenças oncológicas².

A exiguidade de tempo entre o diagnóstico da doença e o início de seu tratamento é um entrave que pode ser contornado, e a fertilidade pode ser preservada antes que a ação gonadotóxica dos métodos terapêuticos seja iniciada. Mulheres em plena capacidade reprodutiva devem ser encorajadas a discutir acerca dos seus objetivos futuros sobre maternidade e aprender sobre os riscos do tratamento oncológico à sua fertilidade. O médico deve estar atento às técnicas disponíveis e aplicáveis para preservação de fertilidade, visando obter uma melhora na qualidade de vida dos seus pacientes e oferecer a possibilidade de terem filhos e constituírem famílias³.

Segundo as recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology*), recentemente publicadas, alguns dos métodos comprovadamente eficazes para preservação da fertilidade feminina disponíveis hoje são: a criopreservação de embriões, a ooforopexia para os casos de radioterapia localizada e a criopreservação de oócitos. A técnica de criopreservação de tecido ovariano ainda é considerada experimental, porém já existem relatadas gestações que obtiveram sucesso com essa técnica¹.

A escolha da melhor técnica para preservação de fer-

tilidade vai depender da idade da paciente, do tipo de tratamento, da existência ou não de parceiro com quem deseje constituir prole, do tempo disponível até o início da quimioterapia e do potencial do câncer em produzir metástase ovariana².

Diante do exposto, o objetivo desta revisão é descrever alguns dos principais métodos de preservação da capacidade reprodutiva feminina, bem como elucidar a indicação, possíveis complicações e as vantagens e desvantagens de cada um desses métodos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração deste artigo, foram utilizados os artigos publicados até o ano de 2015 que abordassem os temas transposição ovariana, criopreservação de oócitos, criopreservação de embriões e criopreservação de tecido cortical ovariano, utilizando como fonte a Pubmed, a Scielo, entre outras. Como palavras-chave, destacaram-se: “Transposição ovariana”, “Preservação de fertilidade”, “Criopreservação”, “Embriões”, “Oócitos” e “Tecido cortical ovariano”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transposição ovariana

Transposição ovariana, ou ooforopexia, consiste na mudança da posição anatômica dos ovários em mulheres com neoplasias e que serão submetidas à radioterapia⁴. Ou seja, consiste na tentativa de afastar os ovários do campo de radiação, diminuindo, assim, os efeitos danosos que esta teria sobre eles.

Estudos mostram que a dose total de radiação que chega aos ovários transpostos chega a ser 1-10% da dose total da radiação, ou seja, se a dose total de radiação for de 45 Gray (Gy) a dose que chegaria aos ovários seria de algo entre 0,45-4,5Gy, ou seja, reduzindo a chance de grandes complicações do tratamento ao ovário, uma vez que doses acima de 20Gy podem causar esterilidade permanente em pacientes de qualquer idade. Doses menores já podem ter efeitos graves sobre a função reprodutiva da mulher e são mais relacionadas à idade: quanto mais velha, menor a dose necessária para induzir esterilidade, provavelmente pela existência de uma reserva folicular menor⁵.

Para realizar essa transposição, é necessária a secção do ligamento útero-ovariano e das trompas para que os ovários sejam afastados o máximo possível do campo de radiação, sendo-lhes colocados cliques de titânio para confirmação radiológica posterior da posição em que se encontram. São conservados apenas os vasos que nutrem os ovários e deve-se tomar muito cuidado para evitar estiramentos ou torções dos vasos que possam comprometer o suprimento sanguíneo para os ovários^{6,7}.

Inicialmente a cirurgia era feita através de laparotomia, mas, desde que a técnica videolaparoscópica foi inventada, esta última vem-se tornando o padrão para a

realização da transposição. A cirurgia por laparotomia fica reservada a pacientes que serão submetidos à cirurgia abdominal para retirada do tumor e que, concomitantemente, realizam a transposição ovariana^{8,9}. A cirurgia por videolaparoscopia apresenta várias vantagens, entre elas a redução das incisões, das aderências e do tempo de hospitalização⁵.

Vários locais já foram utilizados para se posicionar os ovários, como atrás do útero, região paracólica, acima da crista ilíaca, tecido subcutâneo e até mesmo a utilização de escudos de chumbo para proteger os ovários, sendo que esta última apresenta como importante limitação a possibilidade de proteger também linfonodos acometidos⁸.

Uma das vantagens do método de transposição ovariana está no fato de que esse método permite a manutenção da função dos ovários após o procedimento, com a mulher apresentando ciclos menstruais normais após o tratamento, e a transposição pode ser tanto uni quanto bilateral, pois há relatos de manutenção da função ovariana das duas formas^{9,10}. A decisão, se uni ou bilateral, muitas vezes é influenciada pela existência de tumor ou aderência deste em um dos ovários, realizando, assim, a transposição unilateral.

Entre os principais riscos apresentados pela realização dessa técnica podem ser relatados o de falência ovariana prematura, formação de cistos ovarianos e ocorrência de metástases para o ovário. Uma meta-análise mostrou que mais de 85% das pacientes mantiveram sua função ovariana preservada, não houve formação de cistos em mais de 84% das pacientes e foram relatados apenas dois casos de metástases para os ovários, comprovando que o método se mostra bastante seguro¹¹. Entre outras complicações possíveis estão a lesão de ureter, o sangramento intraoperatório, torção do pedículo vascular do ovário e migração dos ovários de volta para a sua posição original, motivo pelo qual a cirurgia deve ser realizada o mais próximo possível do início do tratamento¹⁻⁸.

Como muitas vezes o tratamento da neoplasia envolve a realização de histerectomia nas pacientes, a transposição ovariana muitas vezes é acompanhada da utilização de fertilização *in vitro* pelas mulheres. Giacalone *et al.* (2001)¹⁰, Steigrad *et al.* (2005)¹² e Azem *et al.* (2003)¹³ todos relatam casos de pacientes que foram submetidas à ooforopexia com histerectomia total e que através do uso de fertilização *in vitro*, obtiveram gestações de sucesso com uso de barrigas de aluguel. Terenziani *et al.* (2009)¹⁴ relataram o caso de 11 mulheres entre 9 e 22 anos que realizaram ooforopexia e que não foram submetidas à histerectomia. Dessas mulheres vieram 14 gestações bem-sucedidas, 11 nascidos vivos, uma gestação gemelar e três abortos, sendo todas as gestações sem a utilização de fertilização *in vitro*.

Sabe-se também que, apesar de reduzir muito a

quantidade de radiação recebida pelos ovários, um pequeno grau de lesão nesses ovários ainda pode ocorrer, motivo pelo qual também pode se recomendar a associação de criopreservação de tecido cortical ovariano concomitantemente à realização da transposição ovariana¹⁵.

A transposição ovariana constitui um método que já se mostrou comprovadamente eficaz de preservar a fertilidade em pacientes e, apesar da chance de alguns efeitos colaterais, deve ser sempre oferecida a pacientes que realizarão tratamento radioterápico que possa lesar os ovários.

Criopreservação

Dentre os outros métodos capazes de preservar a fertilidade em mulheres, lança-se mão do procedimento de criopreservação. Este tem como princípio básico a diminuição da temperatura celular, tendo como consequência a redução do metabolismo celular, permitindo assim, que as células ou os tecidos sejam conservados sadios por períodos indeterminados. A temperatura em que se realiza a criopreservação é conhecida como “temperatura criogênica”, isto é, um extremo de temperatura na qual os gases se encontram liquefeitos à pressão atmosférica. A temperatura criogênica, todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares mantêm-se suspensas; sendo assim, uma célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados por tempo indefinido, sem causar danos degenerativos aos componentes celulares. Porém, para isso, é necessária a utilização de um agente crioprotetor na composição da solução de criopreservação¹⁶. Atualmente o método vem sendo utilizado sobre oócitos, embriões ou sobre o próprio tecido cortical ovariano¹⁶.

Os agentes crioprotetores são substâncias orgânicas e têm a função de proteger a célula ou o tecido contra desidratação, resfriamento e outros danos que podem ser causados pela redução extrema da temperatura. Esses agentes são divididos em dois principais grupos: intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes. Ambos, apesar de suas ações protetoras, apresentam toxicidade, o que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de criopreservação. A escolha do tipo e da concentração de um agente crioprotetor que resulte em uma baixa toxicidade depende do tipo de tecido/célula a ser criopreservado e do método de criopreservação empregado¹⁷. Sendo assim, a escolha do agente crioprotetor deve sempre ser individualizada.

Em relação aos métodos de congelamento, pesquisadores investigaram a possibilidade de preservar células e tecidos por diferentes métodos de congelamento lento e rápido, nisso se inclui, mais recentemente, o processo de vitrificação¹⁷.

A técnica conhecida como congelamento lento ou convencional é caracterizada pela exposição do tecido ou

célula a baixas concentrações de agente crioprotetor por período que varia de 20 a 60 minutos, seguido de uma lenta e gradual redução na temperatura. O método lento é caracterizado pela desidratação celular gradual que tem como objetivo evitar ou reduzir a formação de cristais de gelo intracelular. Nessa situação, baixas concentrações de agentes crioprotetores são suficientes a fim de que esses objetivos sejam alcançados¹⁸.

Já a vitrificação surgiu como um método alternativo à congelamento lento. Consiste na congelamento ultrarrápido do material, que alcança diretamente o estado vítreo sem exposição ao estado cristalino, diminuindo, assim, a incidência de formação de partículas de gelo intracelular observado mais frequentemente no processo de congelamento lento, e que é potencialmente danoso à posterior viabilidade celular. Nesse processo ultrarrápido, o tecido é exposto a altas concentrações de crioprotetores penetrantes, geralmente entre 20 e 40%, em pequenos volumes de solução e submergido diretamente em nitrogênio líquido^{19,20}. O método de vitrificação apresenta vantagens sobre o convencional quando diz respeito ao baixo custo e à velocidade consideravelmente mais rápida de realização do processo. Todavia, apesar de a vitrificação simplificar o processo de congelamento, é válido lembrar que todos os crioprotetores podem causar toxicidade e efeitos osmóticos adversos, independentemente do método de congelamento empregado.

Os efeitos tóxicos mais frequentemente observados após o processo de congelamento e descongelamento foram estudados histologicamente por meio de imunohistoquímica, utilizando-se o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Esses estudos mostraram a presença de algumas alterações reversíveis, tais como a vacuolização citoplasmática, a lise estromal e a presença de oócitos com contornos irregulares. Foram ainda observadas algumas alterações irreversíveis, como a degeneração hialina, a cariopícnose e a formação de gelo intracelular. Além de tais danos celulares já destrinchados pela pesquisa, foi observado que, embora a viabilidade mensurada pela morfologia folicular avaliada pela microscopia seja fisiológica, danos considerados menores ao DNA das células podem ser observados após o processo de congelamento e descongelamento de tecido cortical ovariano, oócitos ou embriões para preservação de função reprodutiva. Os trabalhos realizados sugerem que, embora as técnicas atuais de congelamento e descongelamento sejam eficazes na permanência da capacidade de desenvolvimento folicular, estudos sobre os reais efeitos sobre o DNA desses materiais ainda devem ser realizados^{20,21}.

Criopreservação de tecido cortical ovariano

A criopreservação de tecido cortical ovariano consiste no método de congelamento realizado sobre um fragmento do ovário retirado por extração cirúrgica, procu-

rando conservar, indeterminadamente, suas funções celulares reprodutivas. O método inovador funciona como uma das formas mais atuais de preservação da função reprodutiva ovariana, apesar de ainda ser uma técnica experimental. Além das pacientes que precisam se submeter a tratamentos gonadotóxicos, também podem se beneficiar do procedimento pacientes com doenças hematológicas benignas e doenças autoimunes resistentes aos tratamentos imunossupressores, bem como para casos de mutações genéticas com risco de falência ovariana precoce²².

Estudos objetivando o melhor esclarecimento sobre as técnicas e resultados relacionados à criopreservação e ao transplante ovariano iniciaram na década de 1950, atingindo estudos clínicos no ano 2000. Os estudos mais atuais indicaram que a criopreservação de tecido ovariano tem o potencial de restaurar a fertilidade em mulheres que evoluíram com a falência ovariana prematura, seja ela secundária a tratamentos gonadotóxicos como a quimioterapia, seja radioterapia, seja após extração cirúrgica de ovários²².

Para obter o tecido cortical ovariano, realiza-se a fragmentação de amostra coletada por meio de videolaparoscopia, ou ainda pela dissecação total do córtex ovariano cirurgicamente²³.

Com relação às técnicas de criopreservação, não existe um consenso sobre o método, as dimensões dos fragmentos, os agentes crioprotetores ou o que ocorre após o descongelamento. Usualmente o tecido ovariano é criopreservado em tiras finas ou em pequenos cubos, para que ocorra um balanço preciso no tempo de penetração do crioprotetor no tecido, de maneira que exerça os efeitos desejados²³.

São três as alternativas descritas como possíveis nesses casos de restauração da fertilidade utilizando-se folículos que sofreram processo de congelamento e descongelamento: a do autotransplante ovariano; a do transplante heterólogo de tecido cortical ovariano; e a maturação dos folículos ovarianos primordiais *in vitro*²⁴.

A maturação de folículos ovarianos primordiais *in vitro* tem sido muito estudada já que a população de folículos primordiais parece ser mais resistente aos efeitos deletérios da isquemia quando comparada a folículos nos diversos estágios de desenvolvimento, presumivelmente em virtude de seu estado latente com baixo índice metabólico. Porém os estudos na área *in vitro* ainda são escassos²⁴.

O autotransplante ovariano consiste na retirada de tecido cortical ovariano da paciente quando esta ainda possui capacidade reprodutiva ovariana preservada. Feitos os métodos de criopreservação pelo tempo considerado como necessário, o tecido autólogo é reimplantado na paciente²⁵.

O transplante heterólogo de tecido ovariano é indicado quando a paciente já apresenta, ao início do acom-

panhamento, o comprometimento da função reprodutiva ovariana. Sendo assim, é obtido um tecido ovariano heterólogo oriundo de uma doadora ou de banco de células, que é inserido na paciente com os devidos cuidados relacionados à rejeição²⁵.

Ambos os transplantes, autólogo e heterólogo, podem ser implantados em sítios ortotópicos ou heterotópicos. Ortotópico quando a inserção ocorre em localização tópica aos ovários, e heterotópico quando o transplante é colocado em qualquer outro sítio diferente ao pélvico²⁵.

Callejo *et al.* (2001)²⁶ fizeram uma análise comparando o autotransplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado e o transplante ortotópico, mas não chegaram a uma conclusão sobre a melhor opção. Em teoria, uma gestação natural pode ser obtida por meio de transplante ortotópico de tecido cortical ovariano criopreservado, nos casos em que as tubas uterinas permanecerem permeáveis e sadias. Caso contrário, é preferível a inserção heterotópica. Nas indicações de implantes heterotópicos, o transplante deve ser realizado em regiões ricamente vascularizadas como a cápsula renal, que é, assim como os ovários, rica em fatores angiogênicos e fator de crescimento endotelial. Esses locais são capazes de prover um sítio ideal para a rápida revascularização necessária para um bom funcionamento do tecido enxertado²⁷.

A respeito de uma importante desvantagem relacionada ao método de criopreservação de tecido cortical ovariano, é necessário abordar a possibilidade de transmissão de doenças e metástases de tumores sistêmicos e relacionados com células sanguíneas através de tecido ovariano transplantado autólogo ou heterólogo. Essa possibilidade foi demonstrada por meio do transplante de tecido ovariano de ratos portadores de linfoma em animais saudáveis²⁹. Constatou-se que 13 dos 14 ratos enxertados contraíram linfoma. Porém estudos divergentes foram divulgados mais recentemente, relatando que o envolvimento subclínico não foi observado em nenhum tecido ovariano criopreservado, mesmo naqueles em que havia doença neoplásica infradiafragmática²⁹.

Com o objetivo de avaliar os ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce e tardio de castração em ratos, foi realizado um recente estudo. Foram comparadas as duas técnicas de criopreservação de ovário (vitrificação e congelamento lento) e dois estágios pós-castração (intervalo precoce e intervalo tardio) em relação à pega do implante. Trinta e três ratos de determinada espécie foram submetidos à ooforectomia bilateral. Um ovário foi submetido à análise histológica, enquanto o outro foi criopreservado por congelamento lento ou vitrificação. O ovário criopreservado foi descongelado e reimplantado no omento maior uma semana (intervalo precoce) ou um mês (intervalo tardio) após ooforectomia. Um mês após o reimplante de

ovário, a pega do enxerto foi avaliada macroscopicamente e histologicamente. A vitrificação resultou em um implante com maior taxa de pega do que a congelação lenta (50% versus 38,5%), mas a diferença não foi estatisticamente significativa. No entanto, as pegas dos enxertos foram 9,3 vezes maiores na precoce do que na pós-ooforectomia tardia (61,5% versus 14,3%)³⁰.

Está claro que a proteção e guarda da fertilidade buscada com a criopreservação ovariana é um objetivo a ser alcançado a longo termo, a restauração da capacidade reprodutiva humana não está plenamente assegurada pelo método em questão²⁸. O processo de criopreservação de tecido cortical ovariano deve ser considerado como uma tecnologia experimental nos casos em que não se consiga obter gestações por todos os outros métodos já disponíveis e, atualmente, mais destrinchados pelos estudos e pesquisas. O procedimento tem, efetivamente, preservado a fertilidade em modelos animais, embora a eficácia em humanos seja, ainda, objeto de estudos³¹.

Criopreservação de oócitos

Diversos tipos de criopreservação podem ser utilizados tanto para mulheres que desejam engravidar quanto para aquelas que almejam preservar a fertilidade devido ao câncer. Entretanto, cada tipo de criopreservação possui um diferente percentual de sucesso. Por isso, deve-se observar a idade do paciente, uma vez que para pacientes oncológicos mais jovens a melhor opção seria utilizar a preservação de tecido ovariano, enquanto em pacientes mais idosos é preferível optar pelo congelamento de embriões e oócitos. A utilização de oócitos imaturos com posterior maturação *in vitro* é menos confiável do que a estimulação ovariana com recuperação de oócitos, porém, quando utilizamos a estimulação ovariana, o tratamento deve ser atrasado de 4 a 6 semanas³².

A criopreservação de oócitos é outro método utilizado para a preservação da fertilidade nas mulheres, porém, não apresenta taxa de sucesso tão grande devido à lesão do fuso meiótico e formação de microcristais pelo citoplasma durante o processo de congelamento. Métodos mais novos de criopreservação, principalmente a vitrificação e o uso da injeção intracitoplasmática de esperma para a fertilização de oócitos mostraram resultados positivos, tendo obtido gravidezes viáveis³².

Esse método foi pesquisado há muitos anos antes de a fertilização *in vitro* ter sido descrita. Huxley chamou a técnica de congelamento de oócitos de Processo de Bokanovsky e a descreveu em 1932, com o objetivo de clonar seres humanos. O primeiro nascimento descrito foi feito por Chen *et al.* (1986) e ocorreu após o descongelamento de oócito e posterior fertilização *in vitro*. Mesmo com o sucesso desse relato, os primeiros resultados eram frustrantes mostrando baixa porcentagem na sobrevivência do oócito, na sua fertilização e na gesta-

ção. O processo endurecia a zona pelúcida, havia formação de microcristais pelo citoplasma de lesão do fuso meiótico³.

Atualmente a técnica de criopreservação de oócitos vem ganhando espaço no cenário da preservação de fertilidade. Inúmeras modificações na técnica estão sendo feitas para o aumento da sobrevivência dos oócitos maduros. A combinação e a composição dos crioprotetores junto à técnica de vitrificação melhoraram a sobrevivência do oócitos e aumentaram a taxa de gravidez³³.

As células dos ovócitos prematuros parecem ser mais sensíveis se comparadas com as que estão em estágio mais avançado quando utilizadas em procedimentos laboratoriais. Os métodos de criopreservação acarretam danos e afetam as células devido a condições a que são submetidas. Durante o processo de congelamento e descongelamento, o oócito pode sofrer diversos danos celulares, como a desintegração do eixo, desorganização do citoesqueleto e anormalidades cromossômicas³⁴.

Grande parte dos laboratórios está utilizando o método de refrigeração lenta. Entretanto a técnica esbarra na baixa taxa de gravidez e no aumento da porcentagem de aneuploidia devido à exposição de agentes crioprotetores e no processo de congelamento e descongelamento³⁴.

A técnica de vitrificação melhorou muito a criopreservação de oócitos. Foi possível evitar a formação de cristais a partir da utilização do congelamento ultrarrápido e da injeção intracitoplasmática de espermatozoides que atravessa a barreira do espessamento da zona pelúcida. Com a modernização da técnica e a utilização de crioprotetores mais novos e em alta concentração, melhores resultados foram atingidos. Estudos modernos indicam taxas de sobrevivência oocitária pós-descongelamento que chegam até 96%, sendo 73% de taxa de fertilização, 38% de taxa de implantação uterina por embrião e taxas que chegam a 63% de gestação. Apesar disso, deve-se citar que a idade é um fator que influencia bastante nessas taxas³.

A técnica de vitrificação foi utilizada evidenciando bons índices de sucesso, apresentando taxas de fertilização, implantação e gravidez clínica por oócito vitrificado de 75,4; 20,5 e 6%, respectivamente. Entretanto, apesar de se mostrar eficaz, ainda é um método experimental e necessita de mais estudos⁴.

Quando esse método é escolhido, a estimulação ovariana deve ser utilizada para que os oócitos maduros sejam retirados. Um dos maiores obstáculos desse método é o processo de descongelamento de oócitos, que gira em torno de 37% de êxito. Mesmo com uma taxa de sucesso de descongelamento relativamente baixa, foi evidenciada uma porcentagem de gravidez de 22 a 25%, porém essa taxa não é de rotina. Sendo assim, o sucesso real dessa técnica é de somente 2.2%. Menos de 100

nascimentos foram descritos até hoje com o uso desse procedimento. Devido à baixa taxa de sucesso da técnica, a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva recomendou que o seu uso não fosse rotineiro, dando espaço a mais pesquisas antes de ser executada³².

Dados recentes evidenciam que os óocitos são mais vulneráveis a sofrerem danos do que os embriões quando são submetidos a modificações de temperatura e alterações osmóticas. Tais defeitos diminuem a taxa de sobrevivência dos óocitos e de gravidez quando fertilizados. O principal dano idealizado seria a lesão do fuso meiótico, porém em estudos mais recentes foi evidenciado que o fuso se dissocia com a queda de temperatura, mas retorna a sua função normal com o aumento em 4-6h. Mais estudos precisam ser realizados para que a identificação correta do defeito seja feita³⁴.

A criopreservação de óocitos é uma ótima escolha para mulheres que desejam evitar problemas judiciais com o parceiro em caso de separação e para as que não possuem doador de esperma³⁴.

Esse procedimento é uma ótima opção para pacientes que não querem usar do banco de sêmen para a fertilização dos óocitos e para os que não possuem parceiro. Apresenta ainda como vantagem a não necessidade de realizar estímulo hormonal para a captação de óocitos quando é realizada com óocitos imaturos³.

O congelamento de óocitos é uma opção para as mulheres que não querem criopreservar embriões. Na população que apresenta um alto risco para infertilidade devido ao tratamento gonadotóxico seria uma das opções disponíveis. Algumas condições como câncer de ovário sendo necessária a salpingooforectomia profilática e na falência ovariana prematura a criopreservação de óocitos pode ser considerada³³.

Em pacientes que apresentam tumores dependentes de hormônios, como o câncer de mama, alguns recursos alternativos podem ser utilizados a fim de que não haja comprometimento do quadro. Nesses recursos, o uso de SERM's (Tamoxifeno) ou inibidores de aromatase (Letrozole ou Anastrozole) não estimula os receptores hormonais mamários e mantém os níveis de estradiol baixos. Esses recursos ganharam espaço, uma vez que na estimulação ovariana convencional há um aumento muito grande nos níveis de estradiol, superando muito os valores fisiológicos pré-ovulatórios. A criopreservação de óocitos imaturos é uma ótima opção em pacientes que não podem se submeter à estimulação ovariana e deve ocorrer no intervalo entre a cirurgia e o início da quimioterapia, geralmente de até seis semanas. É considerável mensurar que os resultados também podem ser melhores nesse tipo de óocito devido a algumas características da célula, como o menor volume e o fato de não apresentar o fuso meiótico. Um dos problemas enfrentados por essa técnica é a exigência de maturação *in vitro* após o descongelamento, levando a baixas porcentagens no que diz

respeito à fertilização e à gestação³.

O congelamento de óocito em pacientes oncológicos com o objetivo de preservação de fertilidade pré-quimioterapia é pertinente, mas se depara com o baixo número de óocito que se pode preservar. É importante destacar que o número de óocitos maduros, mesmo após a indução de ovulação pré-quimioterapia, é muito baixo, sendo menor que 20 na maioria das vezes. Outra desvantagem desse método é que a função reprodutiva da paciente é mantida, porém a função hormonal não é retomada, já que não ocorre o restabelecimento da esteirogênese⁴.

Criopreservação de embriões

Trouson & Morhs (1983) relataram o primeiro nascido vivo obtido pela técnica de criopreservação de embriões. Essa técnica que surgiu na década de 80 consiste, em termos básicos, em uma exposição do embrião a baixas temperaturas. Existem alguns mecanismos de congelamento de embriões: congelamento lento, congelamento ultrarrápido, vitrificação, entre outros. O método mais utilizado e em maior estudo atualmente é a vitrificação, apresentando excelentes resultados em diversos estudos^{3,35,36}.

A criopreservação embrionária é uma técnica consagrada na literatura médica. Apresenta atualmente a maior taxa de sucesso reprodutivo e é amplamente difundida no mundo. As taxas de sucesso variam conforme alguns aspectos, como idade da paciente, tanto no momento da retirada dos óocitos quanto no momento da implantação dos embriões descongelados, reserva ovariana e resposta ao tratamento (número de ovócitos obtidos e fecundados). Alguns autores citam taxas de sucesso em torno de 50% em pacientes com idade inferior a 35 anos, e as taxas de gravidez por ciclo de embriões descongelados se assemelha aos de ciclos com transferência de embriões a fresco^{37,38,39,40,41}.

A taxa de sobrevivência dos embriões ao descongelamento varia conforme as técnicas utilizadas na criopreservação (40-90% em média). Com os recentes avanços, principalmente o advento da técnica de vitrificação, foram demonstradas taxas de 97% de sobrevivência dos embriões ao utilizar esse método inovador. Esse fato leva essa técnica a ser a de escolha para a preservação da fertilidade atualmente^{3,38}.

Basicamente para a criopreservação do embrião é necessária uma estimulação hormonal do ovário, para o desenvolvimento de múltiplos folículos, com posterior retirada de óvulos e fertilização em laboratório, seja ela *in vitro* seja por injeção intracitoplasmática, por isso essa técnica é indicada para mulheres em idade fértil. Após a formação dos embriões, estes são congelados em nitrogênio líquido a -196°C, permanecendo assim por tempo indeterminado. A escolha do método de congelamento deve ser guiada pela experiência do serviço local e o

estado do embrião no momento do congelamento. A técnica mais usada para o congelamento de embriões consiste no congelamento lento em rampa, utilizando crioprotetores, 1,2-propanediol e sacarose^{4,37,38}.

A estimulação ovariana pode ser realizada em qualquer fase do ciclo reprodutivo da mulher. Normalmente a estimulação é realizada com análogos do GnRh, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG). A monitorização ultrassonográfica é indicada para avaliar os estágios da estimulação, e a coleta é feita por punção ovariana guiada por ultrassonografia transvaginal, sob analgesia^{38,39}.

A técnica de criopreservação de embriões é atualmente o método de eleição para a preservação da fertilidade feminina, apesar disso alguns entraves são apresentados por essa técnica. Entre esses problemas, destaca-se que o método está disponível apenas para pacientes em idade reprodutiva, não preserva a função gonadal, necessita de amostra de esperma imediata e requer estimulação e colheita ovocitária^{35,36}.

As questões éticas e morais envolvendo a criopreservação do embrião são as mais antigas em pauta relacionada à reprodução humana assistida. Em 1984, o Relatório de Warnock, foi o primeiro manifesto ético a abordar essas questões; desde então inúmeros países desenvolveram suas próprias condutas éticas a serem respeitadas. O momento preciso em que a vida tem o início é controverso. A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva⁴³ propõe que o embrião seja considerado uma vida em potencial e, assim, deve ter status diferencial em relação a outros tecidos do organismo. Diversos autores discordam se o embrião é uma vida humana e se deve ser tratada como tal^{43,44}.

O Conselho Federal de Medicina, em 1992, publicou as Normas Éticas para a Utilização das Técnicas de Reprodução Assistida. Essa resolução passou a regular os centros especializados no procedimento de congelamento de embriões. Ficou definido que o número total de pré-embriões produzidos e criopreservados devem ser comunicados aos pacientes, e esses pré-embriões não devem ser descartados ou destruídos. Os cônjuges ou companheiros devem expressar sua vontade, por escrito, quanto ao destino que será dado aos pré-embriões criopreservados, em caso de divórcio, doenças graves ou de falecimento de um deles ou de ambos, e quando desejam doá-los (Resolução CFM n.º 1.358/92, Item V)^{35,43}.

Quando há desinteresse de um dos parceiros em manter os embriões criopreservados, ou de utilizá-los em futura gestação, cria-se uma dificuldade, pois os embriões não podem ser exigidos sem um consenso do casal, o que pode levar muitas vezes, a conflitos judiciais. Em outro caso, uma vez que o casal define que sua família está completa, existem quatro opções a serem escolhidas no que diz respeito ao destino dos embriões criopreser-

vados. As possíveis escolhas incluem mantê-los criopreservados indefinidamente, doar para pesquisa, doar para outro casal tentar uma gravidez ou descartar o embrião^{37,44,45}.

Sobre a necessidade de amostra de esperma imediata para realização da técnica de fertilização, as mulheres que não possuem um parceiro podem se beneficiar do uso de sêmen de doador anônimo, mas essa questão em certos casos constitui uma dificuldade, devido a causas particulares, e terminam por contraindicar esse método. A estimulação hormonal ovariana constitui outro entrave associado a esse meio de preservação de fertilidade. Há necessidade dessa estimulação com o uso de gonadotrofinas exógenas, torna-se o método eficaz somente em mulheres em idade fértil, inviabilizando o processo em pacientes pré-púberes e em mulheres em falência ovariana^{3,35,41}.

A criopreservação de embriões não pode ser o método de escolha para pacientes que buscam preservar a função ovariana, porque esse método não utiliza a preservação de tecido ovariano. Esse método estará indicado apenas a mulheres que desejam futuras gestações e não buscam restaurar/preservar a função ovariana³⁵.

A estimulação hormonal ovariana constitui outro entrave associado a esse meio de preservação de fertilidade. A coleta de apenas um oócito proveniente de um ciclo natural é possível, mas não ideal quando pensamos em criopreservar embriões. A estimulação hormonal exige 15 a 20 dias para a indução e coleta dos oócitos. Essa espera pode impedir o processo, visto que muitas pacientes que buscam esse mecanismo são pacientes oncológicas e temem uma piora do prognóstico, necessitando de início imediato do tratamento oncológico. No mais, muitos tumores são considerados hormônio-dependentes, sendo isso uma causa de maior temor entre oncologistas e pacientes, por piora no prognóstico devido à estimulação ovariana. Em casos excepcionais, sendo tumores com receptores hormonais negativos, a estimulação ovariana pode ser realizada, porém não há consenso na literatura sobre tal conduta e nem mesmo respaldo médico-legal para tal^{3,38,39}.

O uso do letrozol (um inibidor da enzima aromatase) e do tamoxifeno (um modulador seletivo do receptor estrogênico), em casos específicos de neoplasias hormônio-dependentes, foi abordado em vários estudos e tem-se mostrado como opções à estimulação hormonal tradicional, sem aumento aparente da recorrência do câncer em curto prazo e com resultados satisfatórios⁴¹.

Em todos os cenários, a abordagem mais bem-sucedida é criopreservação de embriões. Essa técnica atinge uma taxa de gestação de 20 a 30 por cento por transferência de 02 a 03 embriões. Esse método é apropriado para as mulheres com grande risco para falência ovariana ou no intuito de estender o potencial de fertilidade de mulheres entre as idades de 38 e 40 anos³².

4. CONCLUSÃO

A preservação da fertilidade é, sim, uma realidade e se relaciona a uma melhor qualidade de vida das pacientes após o tratamento da neoplasia ou para mulheres que queiram postergar a maternidade. Portanto a possibilidade de ter filhos futuramente deve ser sempre discutida com as pacientes, e o melhor método deverá ser indicado, individualizando cada caso.

REFERÊNCIAS

- [1] Loren AW, *et al.* Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology Asco, Special Article* July 2013; 31(19).
- [2] Letourneau A. *et al.* A land-use systems approach to represent land-use dynamics at continental and global scales. *Environmental Modelling and Software*, 2012; 33:61-79.
- [3] Ferreira FP, Soares Júnior JM, Alves da Motta EL. Preservação da fertilidade: a importância de oferecer esta possibilidade às pacientes com doenças neoplásicas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2011; 33(9):223-26.
- [4] Rosa e Silva ACJ de Sá. Preservação de Fertilidade. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2006; 28(6):365-72.
- [5] Winarto H, *et al.* The Need for Laparoscopic Ovarian Transposition in Young Patients with Cervical Cancer Undergoing Radiotherapy. *International Journal of Reproductive Medicine*. May, 2013.
- [6] Falconea T, Bedaiwyb MA. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 17:21-26.
- [7] Chhabra S, Kutchi I. Fertility preservation in gynecological cancers. *Clinical Medicine Insights. Reproductive Health* 2013; 7:49-59.
- [8] Furtado F, Kondo W. Laparoscopic Lateral Ovarian Transposition. *Brazilian Journal of Videoendoscopic Surgery* Apr/Jun 2008; 1(2).
- [9] Barahmeh S, *et al.* Ovarian transposition before pelvic irradiation: indications and functional outcome. *J. Obstet. Gynaecol* Nov 2013; 39(11):1533-37.
- [10] Giacalone PL, *et al.* Successful in vitro fertilization-surrogate pregnancy in a patient with ovarian transposition who had undergone chemotherapy and pelvic irradiation. *Fertility and Sterility* Aug 2001; 76(2).
- [11] Gubbala K, *et al.* Outcomes of ovarian transposition in gynaecological cancers; a systematic review and meta-analysis. *Journal of Ovarian Research* 2014; 7(69):1-10.
- [12] Steigrad SJ, *et al.* In vitro fertilization surrogate pregnancy in a patient who underwent radical hysterectomy followed by ovarian transposition, lower abdominal wall radiotherapy, and chemotherapy. *Fertility and Sterility* May 2005; 83(5).
- [13] Azem F, *et al.* Surrogate pregnancy in a patient who underwent radical hysterectomy and bilateral transposition of ovaries. *Fertility and Sterility* May 2003; 79(5).
- [14] Terenziani M, *et al.* Oophoropexy: a relevant role in preservation of ovarian function after pelvic irradiation. *Fertility and Sterility* March, 2009; 91(3).
- [15] Von Wolf M, *et al.* Fertility preservation in women - a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network Ferti PROTEKT. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 284:427-435.
- [16] Castro SV, *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos de tecido ovariano e oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2011; 39(2):957.
- [17] Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 9(6):680-91.
- [18] Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of reproduction and fertility* 1997; 110:11.
- [19] Salehnia M. Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp. Anim* 2002; 51(5):509-12.
- [20] Faustino LR, *et al.* Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim* Belo Horizonte jan./mar. 2011; 35(1):3-15.
- [21] Luyckx V, *et al.* Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. *Fertility and Sterility* November 2013; 100(5).
- [22] Lotz L, *et al.* Xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with ovarian tumors into SCID mice - no evidence of malignant cell contamination. *Fertility and Sterility* June 2011; 95(8).
- [23] Courbiere B, *et al.* Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertility and Sterility* October 2006; 86, Suppl 3.
- [24] Picton HM, Kim SS, Gosden RG. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *British Medical Bulletin* 2000; 56(3).
- [25] Aubard Y, *et al.* Orthotopic and heterotopic autografts of frozen-thawed ovarian cortex in sheep. *Human Reproduction* 1999; 14(8):2149-54.
- [26] Callejo J, *et al.* Long-Term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* September 2001; 86(9):4489-94.
- [27] Cox SL, Shaw J, Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *Journal of reproduction and fertility* 1996; 107:315-322.
- [28] Shaw JM, *et al.* Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Human Reproduction* 1996; 11(8):1668-1673.
- [29] Petroianu A, *et al.* Avaliação endócrina e morfológica de transplante ovariano homogêneo. *Bras Patol Med Lab*. 2004; 40(3):206-211.
- [30] Meneses e Silva JM de. Avaliação de ovários criopreservados por vitrificação ou congelamento lento após intervalo precoce e tardio de castração em ratas. (Tese) Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. 2014.

- [31]Donnez J, *et al.* Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004; 364(9443):1405-10.
- [32]Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med* 2005; 353:64-73.
- [33]Pfeifer S, *et al.* Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility* Jan 2013; 99(1):37-43.
- [34]Batuhan O, Safaa, Al-Hassani. Techniques for ovarian tissue, whole ovary, oocyte and embryo cryopreservation. *J Reprod Infertil* 2010; 11(1):3-15.
- [35]Moraes LG. Preservação da fertilidade em pacientes portadoras de neoplasias malignas. *RevMed Res* 2010; 12(1):35-44.
- [36]Silva F, *et al.* Preservação da fertilidade feminina: novos desafios. *Acta Obstet Ginecol Port* 2015; 9(2):154-7.
- [37]Cambiaghi A, Leao R, Castellotti DS, Nascimento P. Poster presentation at 27th Annual Meeting of ESHRE - Stockholm 2011 (03 a 06 de julho de 2011).
- [38]Freitas C, *et al.* Preservação da fertilidade na mulher com doença oncológica. *Acta Med Port* 2011; 24:881-88.
- [39]Marinho RM, *et al.* Preservação da fertilidade em mulheres com câncer: atualização e perspectivas. *RevMed Minas Gerais*, 2013; 23(4):510-517.
- [40]Oliveira KD de, Oselame GB, Neves EB. Infertilidade após o tratamento oncológico. *RevMedSaudeBrasilia* 2014; 3(1):72-844.
- [41]De Carvalho BR, *et al.* Visão geral sobre preservação da fertilidade feminina depois do câncer. *Reprodclim* 2014; 29(3):123-129.
- [42]ASRM, American Society for reproductive medicine. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility.* 2013; 99(1):37-43.
- [43]Badalotti, M. Aspectos bioéticos da reprodução assistida no tratamento da infertilidade conjugal. Instituto de Bioética da PUCRS. Revista da AMRIGS, Porto Alegre, 2010; 54(4):478-85.
- [44]Pereira AKN. A proteção constitucional do embrião: uma leitura a partir do princípio da dignidade da pessoa humana. Itajaí-SC: Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) 2010.
- [45]Leite TH, Henriques RA de H. Bioética em reprodução humana assistida: influência dos fatores socioeconômicos culturais sobre a formulação das legislações e guias de referência no Brasil e em outras nações. *Physis Revista de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro 2014; 24(1):31-47.