

BANCO DE OVÁRIO: UMA ALTERNATIVA PARA PRESERVAÇÃO DE FERTILIDADE EM MULHERES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER

Franciele Osmarini Lunardi

Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará - UECE, Fortaleza, CE, Brasil.

Isabela Seabra B. Ferreira

Graduanda no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Jaboticabal, SP.

Marcelo Picinin Bernuci

Pesquisador no Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP-USP, Ribeirão Preto, SP; Docente do Programa de Mestrado em Promoção da Saúde na UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá, Maringá, PR; E-mail: mbernuci@usp.br.

RESUMO: Nas últimas décadas, a terapia oncológica tem demonstrado, de maneira positiva, um grande impacto na taxa de sobrevivência de pacientes com câncer. Estima-se que, em longo prazo, milhares de mulheres conseguirão superar e sobreviver ao câncer. Entretanto, a quimioterapia e/ou a radioterapia destroem as células germinativas nas gônadas e podem levar a infertilidade permanente. Diferentemente dos homens, cujos métodos de preservação de fertilidade estão clinicamente definidos, em mulheres as metodologias empregadas ainda são limitadas. A retirada e congelamento do tecido ovariano previamente ao início da oncoterapia para a utilização futura em procedimentos de reimplante tecidual têm sido sugeridos como principal alternativa terapêutica de preservação e restauração da função endócrina e reprodutiva em mulheres diagnosticadas com câncer. Até o momento, já foram registrados mais de 20 nascimentos oriundos da associação das técnicas de criopreservação e transplante de tecido ovariano em mulheres. Como ainda não foi desenvolvido um protocolo de criopreservação do tecido ovariano capaz de garantir a manutenção da viabilidade folicular e oocitária exatamente como a observada no tecido fresco, ainda há muita cautela na utilização desta nova tecnologia na prática clínica. Diante da urgência de discussões sobre a aplicabilidade clínica do banco de tecido ovariano, o presente estudo revisará os principais esforços referentes ao desenvolvimento e à aplicação da técnica de criopreservação de tecido ovariano no tratamento de infertilidade de mulheres submetidas à terapia oncológica.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; Fertilidade Feminina; Câncer; Foliculogênese.

OVARY BANK: AN ALTERNATIVE FOR THE PRESERVATION OF FERTILITY IN CANCER-DIAGNOSED FEMALES

ABSTRACT: During the last decades cancer therapy positively demonstrated a great impact on cancer patients' survival rates. It may be estimated that, in the long term, thousands of females will survive cancer. However, chemo- and radio-therapy destroy germination cells in the gonads, which may lead to permanent infertility. Contrasting to those in males whose methods of fertility preservation are clinically defined, the methodologies in females are still limited. The removal and freezing of the ovary tissue prior to cancer therapy for the future use in tissue implant procedures have been suggested as the main therapeutic alternative for the preservation and restoration of the endocrine and reproduction function in cancer-diagnosed females. To date, more than twenty birth from the association of cryo-preservation techniques and transplants of ovary tissues in women have been reported. Since

a protocol for cryopreservation of ovary tissues has not been developed to warrant the maintenance of follicular and oocyte viability exactly as that in the fresh tissue, much care has to be taken in the technology in clinical practice. In the wake of urgency on the clinical feasibility of an ovary tissue bank, current analysis will review the main efforts with regard to the development and application of cryo-preservation technique of the ovary tissue in the treatment of female infertility due to cancer therapy.

KEY WORDS: Cryopreservation; Female Fertility; Cancer; Follicle-Genesis.

INTRODUÇÃO

Embora eficazes na erradicação dos tumores malignos, os tratamentos oncoterápicos destroem as células germinativas e podem, nas mulheres, levar à menopausa prematura e, conseqüentemente, à infertilidade (WALLACE; ANDERSON; IRVINE, 2005). As principais alternativas para a preservação da fertilidade feminina utilizadas na rotina clínica são limitadas à proteção dos ovários contra a radiação (ooforopexia) ou estimulação ovariana emergencial para recuperação de oócitos maduros para posterior fertilização *in vitro* (SONMEZER; OKTAY, 2004). Embora a ooforopexia possa oferecer alguma proteção para as células germinativas, esta técnica é muito invasiva e pode reduzir bastante as chances de sucesso nas futuras gestações (WALLACE; ANDERSON; IRVINE, 2005). De maneira alternativa, oócitos maduros recuperados podem ser destinados à criopreservação para utilização futura em protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) e produção de embriões. No entanto, existem também sérias limitações na utilização de FIV em pacientes com câncer. Isto se deve principalmente ao fato de a necessidade de estimulação hormonal para obtenção de oócitos maduros retardarem o início do tratamento contra o câncer, além de não ser uma estratégia recomendada para pacientes jovens que não iniciaram a puberdade, para mulheres adultas que não possuem parceiro ou ainda àquelas portadoras de câncer hormônio-sensível (WALLACE; ANDERSON; IRVINE, 2005).

Alternativamente, a associação da técnica de criopreservação e reimplante de tecido ovariano pode

ser realizada em qualquer período do ciclo menstrual e não requerer estimulação hormonal, sendo indicada tanto nas pacientes com câncer hormônio sensível como naquelas pacientes prepúberes (LUYCKX, et al., 2013a), além de poder ser iniciada logo após o diagnóstico da neoplasia. Porém, ainda há limitações da aplicabilidade clínica desta técnica, visto o risco de reintrodução de células cancerígenas de volta para a paciente após o reimplante tecidual, embora este fato se limite apenas àquelas pacientes portadoras de câncer metastático (LUYCKX, et al., 2013b). A utilização de tecido ovariano criopreservado para fins de preservação e restauração de fertilidade feminina ainda se restringe aos grandes centros de fertilidade e só recentemente foi implantado em nosso país. Com o aumento do número de núcleos especializados no atendimento a mulheres em busca de alternativas para preservação de fertilidade, a construção e a estruturação de bancos de tecido ovariano são fundamentais para colocar em prática as técnicas de transplante de tecido.

Diante deste cenário, abordaremos na presente revisão os principais aspectos da aplicabilidade da técnica de criopreservação de tecido ovariano para fins de preservação e restauração de fertilidade feminina, enfatizando e organizando programaticamente os resultados mais relevantes necessários para o delineamento de estratégias a serem aplicadas na prática clínica visando melhorias nos protocolos de criopreservação de tecido ovariano em curso, bem como favorecer o entendimento da comunidade clínica sobre a viabilidade do uso da técnica de congelamento tecidual para fins de restauração de fertilidade feminina.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 BANCO DE OVÁRIO

Atualmente, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomenda como possíveis modalidades a serem empregadas na preservação de fertilidade feminina: a criopreservação de gametas, de embriões e de tecido ovariano (LEE et al., 2006). Como os danos ocasionados em células da linha germinativa ovariana pela radioterapia e/ou pela quimioterapia podem

ser evitados, bem como os inconvenientes superados, através da remoção e criopreservação de fragmentos do córtex ovariano antes do início da oncoterapia, a criação dos bancos de tecido germinativo ovariano representam uma importante alternativa de preservação da fertilidade feminina (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2004). Como os oócitos oriundos de folículos pré-antrais são mais resistentes ao processo de criopreservação do que oócitos maduros (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000; KAGAWA; SILBER; KUWAYAMA, 2009), o congelamento de fragmentos do tecido cortical ovariano garante a preservação de milhares de oócitos imaturos que, em sua grande maioria, seriam destruídos pelo tratamento oncoterápico.

A criopreservação consiste na conservação de material biológico a baixas temperaturas mediante a exposição desse material ao vapor de nitrogênio líquido, aproximadamente -150°C , ou, mais comumente, mergulhando-o no próprio nitrogênio líquido (-196°C). Esse processo permite que células vivas sejam submetidas a um estado de redução do metabolismo no qual podem permanecer por um período indefinido e serem futuramente resgatadas viáveis (MAZUR, 1980). A utilização da criotecnologia para a preservação de células germinativas de machos (sêmen) é, universalmente, uma técnica bem sucedida, entretanto, o mesmo ainda não pode ser dito para o material genético de fêmeas (oócitos). Contudo, nas duas últimas décadas, muitas pesquisas vêm sendo direcionadas ao estudo da preservação de gametas femininos, principalmente do tecido ovariano devido à sua importância para a medicina reprodutiva humana (SANCHES-SERRANO et al., 2010). Independente da estratégia adotada para a restauração do potencial reprodutivo do tecido criopreservado, a qualidade do tecido germinativo depende fundamentalmente do sucesso do processo de congelamento e armazenamento. Dentre as técnicas utilizadas para o congelamento do tecido ovariano, destacam-se o congelamento lento e a vitrificação.

2.2 CONGELAMENTO LENTO

No congelamento lento o tecido é submetido a etapas sucessivas de resfriamento, que culminam no

congelamento tecidual lento. Neste processo, quando a água é resfriada abaixo de seu ponto de fusão, esta se solidifica em uma estrutura cristalina menos densa, o gelo, ocupando, desta forma, um volume maior dentro da célula. A expansão desses cristais faz com que a pressão e as forças de cisalhamento danifiquem estruturas intracelulares (membranas e organelas), prejudicando a manutenção da viabilidade tecidual principalmente nos folículos ovarianos e oócitos em estágios finais de desenvolvimento, que acumulam grande percentual de água em suas estruturas (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997).

Embora limitada na preservação de materiais com elevado teor de água, a técnica de congelamento lento mostra-se relativamente eficaz na conservação de tecido ovariano, uma vez que a retomada da função reprodutiva foi relatada após transplante do tecido criopreservado (DONNEZ et al., 2011). Todavia, o tecido ovariano criopreservado pelo método de congelamento lento, aparentemente, funciona bem para os folículos primordiais (menores e com menor teor de água), mas não oferece folículos secundários viáveis, estágio folicular requerido para o sucesso da maturação oocitária durante o cultivo *in vitro* de folículos (TING et al., 2011).

2.3 VITRIFICAÇÃO

Por outro lado, a vitrificação é apontada como um método alternativo à tradicional congelação lenta, uma vez que o tecido é criopreservado sem que haja a formação de cristais de gelo. Isto se deve à exposição do tecido a concentrações elevadas do agente crioprotetor por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), seguido por resfriamento ultrarrápido em nitrogênio líquido, no qual o material se solidifica durante o resfriamento sem formar cristais de gelo (KAGAWA; SILBER; KUWAYAMA, 2009). A alta concentração de crioprotetor aumenta a viscosidade da solução que, mesmo submetida a uma redução súbita de temperatura, transforma-se do estado líquido para o estado vítreo, o que permite certa mobilidade molecular e uma melhor acomodação das estruturas celulares.

Até a presente data, inúmeros estudos têm investigado o potencial do método de vitrificação

como método alternativo de criopreservação de tecido ovariano em diferentes espécies de animais. Comparado com o método de congelamento lento, a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano garante maior estabilidade da ultraestrutura tecidual do estroma ovariano (KEROS et al., 2009) bem como maior percentual de folículos morfolologicamente normais (ISACHENKO et al., 2003). Embora este método tenha garantido também boas taxas de viabilidade folicular durante o cultivo *in vitro* de folículos isolados (TING et al., 2013), quando comparado ao controle fresco, as taxas de atresia folicular ainda são superiores (XIAO et al., 2010). Uma vez que, além desses dados, um único nascimento após a vitrificação de tecido ovariano em humanos foi relatado (KAWAMURA et al., 2013), mais pesquisas devem ser direcionadas nesta área a fim de se encontrar um protocolo ideal de criopreservação capaz de garantir maior aproveitamento do potencial reprodutivo do tecido criopreservado.

2.4 TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

Embora os primeiros transplantes de tecido ovariano já tenham sido relatados desde 1895 por Robert Tuttle Morris, onde se preconizava o rejuvenescimento mediante a manutenção dos níveis dos esteroides gonadais após o climatério, foi apenas no final do século XX que o interesse pelo transplante ovariano aumentou. Esse fenômeno ocorreu graças aos conceitos emergentes de endocrinologia e imunologia, que possibilitaram uma investigação mais aprofundada com base em transplante experimental. De acordo com a origem do indivíduo que receberá o enxerto ou tecido transplantado, o transplante pode ser classificado como xenotransplante (quando realizado entre diferentes espécies), alotransplante (quando realizado dentro de uma mesma espécie) ou autotransplante (se realizado em um mesmo indivíduo). O transplante pode, ainda, ser identificado de acordo com o sítio de implantação do enxerto em ortotópico, no qual o tecido é transplantado para seu local de origem, ou heterotópico, onde o tecido é transplantado para uma região diferente de sua origem (SONMEZER; OKTAY, 2010). O tecido ovariano após congelamento/descongelamento pode ser transplantado ortotópica ou heterotopicamente. O primeiro tipo permite uma possível

gestação espontânea, já o transplante heterotópico exige a utilização de técnicas auxiliares como cultivo *in vitro* de folículos ovarianos seguido de maturação e fertilização *in vitro* de oócitos, possibilitando a produção e transferência embrionária.

Em 2004, Donnez e colegas publicaram um marco histórico na medicina reprodutiva humana, o qual trouxe esperança para milhares de mulheres que superaram o câncer (DONNEZ et al., 2004). Nesse estudo, uma paciente teve suas funções endócrinas e gametogênicas restabelecidas, além de ter sido relatada uma gestação após 11 meses de um autotransplante ortotópico dos fragmentos de ovário. Estudos subsequentes mostraram inúmeros casos de mulheres acometidas pelo câncer que, antes de se submeterem aos tratamentos quimio e/ou radioterápicos, tiveram o córtex ovariano removido e criopreservado para fins de preservação e restauração de fertilidade. Descreveremos a seguir os principais estudos referentes a associação das técnicas de criopreservação e transplante de tecido ovariano realizados em humanos.

2.5 NASCIDOS VIVOS A PARTIR DA ASSOCIAÇÃO DA TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO E TRANSPLANTE DE TECIDO OVARIANO

Os primeiros nascimentos provenientes de tecido ovariano criopreservado pelo método de congelamento lento foram possíveis após transplante ortotópico, possivelmente porque este sítio de implantação fornece condições ótimas à foliculogênese, bem como fornecimento sanguíneo e temperatura adequados para o desenvolvimento e funcionamento normal do tecido (ANDERSEN et al., 2008). O autotransplante ortotópico de fragmentos de córtex ovariano possibilitou que, após tratamento e cura do câncer, mulheres pudessem gestar e conceber filhos saudáveis sem a utilização de técnicas de reprodução assistida como a fertilização *in vitro* (SILBER et al., 2008; SILBER et al., 2010; DEMEESTERE et al., 2007). Ernst et al. (2010) mostraram, ainda, que é possível manter as atividades endócrinas e gametogênicas por um prazo extenso. A paciente que esta equipe descreve foi submetida ao tratamento contra câncer e transplante semelhantemente aos casos já descritos anteriormente, sendo a primeira paciente a conceber dois filhos em

períodos diferentes (primeiro nascimento em 2008 e o segundo em 2010) oriundos de um mesmo enxerto.

Analogamente, o autotransplante ortotópico de fragmentos de córtex ovariano pode também ser aplicado no tratamento de mulheres portadoras de anemia falciforme. Esta doença hereditária tem como opção curativa o transplante alogênico de medula óssea, a qual é precedida de quimioterapia, geralmente com ciclofosfamida, causando danos em oócitos e células da granulosa (MEIROW et al., 1999). Roux et al. (2010) relatam casos em que pacientes foram tratadas da anemia falciforme consequentemente apresentando perda prematura da função ovariana. Estas mulheres receberam transplante autólogo ortotópico de tecido ovariano e, após alguns meses, apresentaram crescimento folicular e ovulação, o que permitiu nascimento posterior. Meirov et al. (2005) descreveram o tratamento e a cura de linfoma, bem como o restabelecimento de fertilidade em uma mulher depois receber autotransplante. O tecido, após nove meses de implantação, apresentou crescimento espontâneo de um folículo ovariano de 15 mm. A partir dessa constatação, foi realizada estimulação ovariana com gonadotrofinas e, após 34 a 36 h da estimulação hormonal, um único oócito foi recuperado, em seguida foi realizada a ICSI e, subsequentemente, um embrião de quatro células foi transferido, originando gravidez e nascimento.

Recentemente, Donnez et al. (2013) analisaram dados para avaliar 60 transplantes ortotópicos divididos em três grupos, divididos de acordo com o local em que as pacientes foram atendidas (Bélgica, Dinamarca e Espanha). Todas as biópsias ovarianas foram congeladas com o processo lento de congelamento e, na maioria dos casos (73%), o córtex do ovário foi removido antes de qualquer quimioterapia. Foi relatado o restabelecimento da atividade ovariana em pelo menos 52 casos entre 56 (93%). Em uma das séries, foi observada a restauração da função ovariana em todos os casos, com exceção de três pacientes, em que não havia folículos presentes no reimplante de tecido ovariano congelado-descongelado, explicando a ausência de restauração da atividade do ovário. Em outro grupo, todas as 25 pacientes recuperaram a função ovariana; no entanto, em dois casos a atividade ovariana não excedeu oito meses. No terceiro grupo,

17 das 18 pacientes mostraram ter recuperado a função ovariana normalmente. Das 60 pacientes submetidas a transplante ortotópico, 11 pacientes engravidaram e 6 dessas mulheres já deram à luz a 12 bebês saudáveis.

Apesar de o sítio de implantação ortotópico fornecer condições ótimas à foliculogênese, possivelmente devido às condições, como temperatura, fornecimento sanguíneo adequado e maior capacidade angiogênica, o autotransplante heterotópico pode ser uma fonte complementar de oócitos que, com a ajuda de técnicas de reprodução assistida como punção folicular e fertilização *in vitro*, possibilita a produção de embriões para serem transferidos, aumentando as chances de gravidez (OKTAY et al., 2004). As técnicas de reprodução assistida podem ser aplicadas mesmo subsequentemente ao transplante autólogo ortotópico. Nesse tipo de procedimento o enxerto pode ser estimulado com uma série de hormônios capazes de acelerar o crescimento folicular, reduzindo o tempo entre o transplante e a primeira gravidez subsequente (MEIROW et al., 2005; ANDERSEN et al., 2008). O quadro 1 reúne os principais estudos que obtiveram nascidos vivos a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado pelo método de congelamento lento.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescimento significativo de cura do câncer, surge a necessidade de proporcionar qualidade de vida aos sobreviventes e, no que diz respeito à manutenção da capacidade reprodutiva muitas vezes acometida pelo tratamento oncológico, o desenvolvimento de estratégias de preservação e restauração da fertilidade têm papel fundamental na vida futura dessas pessoas. No entanto, apesar de mostrar-se bastante promissora, a aplicação clínica desta metodologia para pacientes com câncer ainda é muito precária, principalmente pela ausência de estratégias laboratoriais capazes de estabelecer protocolos de criopreservação de tecido ovariano viáveis à prática clínica. A padronização de técnicas de congelamento apropriadas para o tecido germinativo ovariano é objetivo comum de inúmeros estudos realizados em diversos núcleos de pesquisas ligados a centros de preservação

Quadro 1. Nascidos vivos a partir do transplante de tecido ovariano criopreservado pelo método de congelamento lento.

Dimensão do fragmento cortical ovariano	Solução de criopreservação	Procedimento	Resultados	Referência
2 x 2 mm	1,5 M DMSO e albumina sérica humana	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menina)	Donnez et al., 2004
0,5 x 1,5 x 0,1 - 0,2 cm	1,5 M DMSO e albumina sérica humana	Autotransplante ortotópico; punção folicular, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embrião.	1 nascido vivo (menina)	Meirow et al., 2005
5 × 5 × 2 mm	1,5 M DMSO, 0,1 M sacarose e 10% soro da paciente	Orthotopic autotransplantation	1 nascido vivo (menina)	Demeestere et al., 2007
5 x 5 x 1-2 mm	1,5 M EG e 1,0 M sacarose	Autotransplante ortotópico; punção folicular, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embrião.	2 nascidos vivos (menino/menina)	Andersen et al., 2008
~1 mm	1,5 M PROH e 0,2 M de sacarose	Autotransplante ortotópico	2 nascidos vivo (meninas)	Silber et al., 2008
~3 x 2 mm	12,5% DMSO e 5% albumina sérica humana	Autotransplante ortotópico; punção folicular, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embrião.	2 nascidos vivos (meninos gêmeos)	Sanchez-Serrano et al., 2010
	1,5 M EG e 0,1 M sacarose	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menina)	Ernst et al., 2010
0,75-1 mm	1,5 M PROH, 0,1 M sacarose e 1,5 M PROH, 0,2 M sacarose	Autotransplante ortotópico	2 nascidos vivos	Silber et a., 2010
1 x 0,5 cm	1,5 M DMSO, 0,1 M sacarose e 10% soro da paciente.	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menina)	Roux et al., 2010
2 x 2 mm	1,5 M DMSO e albumina sérica humana	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menino)	Donnez et al., 2011
0,8 -1,4 cm x 2 - 4 mm x 1,5 - 2,0 mm	1,5 M DMSO, 0,1 M sacarose e 10% albumina sérica humana.	Autotransplante ortotópico; punção folicular, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embrião.	1 nascido vivo (menino)	Revel et al., 2011
~ 1 x 2 x 1 mm	1,5 M DMSO	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menino)	Dittrich et al., 2012
2 - 3mm ³	1,5 M DMSO e 10% albumina sérica humana	Autotransplante; punção folicular, fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embrião.	1 nascido vivo (menino)	Callejo et al., 2013
5 x 5 x 1 mm	1,5 M DMSO e albumina sérica humana	Autotransplante ortotópico	1 nascido vivo (menina)	Revelli et al., 2013

e restauração de fertilidade em todo o mundo. Muitos dos resultados preliminares realizados em animais experimentais já estão sendo testados na espécie humana para eventual aplicabilidade clínica. Acreditamos que os dados compilados nesta revisão possam contribuir para o entendimento e divulgação da viabilidade do uso do método de congelamento tecidual para fins de restauração de fertilidade feminina.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, C. Y. et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 23, n. 10, p. 2266-2272, 2008.
- CALLEJO, J. et al. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. **Journal of Ovarian Research**, v. 6, 2013.

- CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 1, p. 11-19, 1997.
- DEMEESTERE, I. et al. Fertility preservation: Successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. **Oncologist**, v. 12, n. 12, p. 1437-1442, 2007.
- DITTRICH, R. et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 2, p. 387-390, 2012.
- DONNEZ, J. et al. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, n. 9443, p. 1405-1410, 2004.
- DONNEZ, J. et al. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 5, 2011.
- DONNEZ, J. et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1503-1513, 2013.
- ERNST, E. et al. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p. 1280-1281, 2010.
- ISACHENKO, E. et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 108, n. 2, p. 186-193, 2003.
- KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, n. 4, p. 568-577, 2009.
- KAWAMURA, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17474-17479, 2013.
- KEROS, V. et al. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p. 1670-1683, 2009.
- LEE, S. J. et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 18, p. 2917-2931, 2006.
- LUYCKX, V. et al. Evaluation of cryopreserved ovarian tissue from prepubertal patients after long-term xenografting and exogenous stimulation. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 5, p. 1350-+, 2013a.
- LUYCKX, V. et al. Is transplantation of cryopreserved ovarian tissue from patients with advanced-stage breast cancer safe? A pilot study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 10, p. 1289-1299, 2013b.
- MAZUR, P. Limits to life at low-temperatures and at reduced water contents and water activities. **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v. 10, n. 2, p. 137-159, 1980.
- MEIROW, D. et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 3, p. 318-321, 2005.
- MEIROW, D. et al. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. **Human Reproduction**, v. 14, n. 7, p. 1903-1907, 1999.
- OKTAY, K. et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 363, n. 9412, p. 837-840, 2004.
- PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**, v. 84, n. 4, p. 993-8, 2004.
- REVEL, A. et al. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. **Human Reproduction**, v. 26, n. 5, p. 1097-1103, 2011.

REVELLI, A. et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 1, p. 227-230, 2013.

ROUX, C. et al. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 7, 2010.

SANCHEZ-SERRANO, M. et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, 2010.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 59-72, 2000.

SILBER, S. et al. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2191-2196, 2010.

SILBER, S. J. et al. A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 23, n. 7, p. 1531-1537, 2008.

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 24, n. 1, p. 113-126, 2010.

SONMEZER, M.; OKTAY, K. Fertility preservation in female patients. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 3, p. 251-266, 2004.

TING, A. Y. et al. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2461-2472, 2011.

TING, A. Y. et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267-1279, 2013.

WALLACE, W. H. B.; ANDERSON, R. A.; IRVINE, D. S. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? **Lancet Oncology**, v. 6, n. 4, p. 209-218, 2005.

XIAO, Z. et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2323-2328, 2010.

Recebido em: 06 de dezembro de 2013

Aceito em: 17 de dezembro de 2013