



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

Visão geral sobre preservação da fertilidade feminina depois do câncer



Bruno Ramalho de Carvalho^{a,b,*}, Jhenifer Kliemchen Rodrigues^{b,c},
Jacira Ribeiro Campos^{b,d}, Ricardo Mello Marinho^{b,c}, João Pedro Junqueira Caetano^{b,c}
e Ana Carolina Japur de Sá Rosa-e-Silva^{b,d}

^a Genesis Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, DF, Brasil

^b Brazilian Oncofertility Consortium (BOC)/Rede Brasileira de Oncofertilidade (ReBOC), Brasil

^c Pró-Criar Medicina Reprodutiva, Belo Horizonte, MG, Brasil

^d Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 6 de novembro de 2014

Aceito em 22 de fevereiro de 2015

On-line em 29 de maio de 2015

Palavras-chave:

Preservação da fertilidade

Oncofertilidade

Criopreservação

Fertilização *in vitro*

R E S U M O

A ação citotóxica de tratamentos antineoplásicos muito frequentemente implica sérios danos às gônadas e consequências secundárias ao hipoeestrogenismo, como osteoporose, infertilidade e falência ovariana prematura, são esperadas. A oncofertilidade aparece como uma área multidisciplinar que se dedica ao desenvolvimento de estratégias para a redução de sequelas terapêuticas em sobreviventes de câncer, em última análise, com vistas à manutenção de sua qualidade de vida e à possibilidade da procriação biológica. Este artigo tem como objetivo apresentar uma visão geral sobre as opções possíveis para a preservação da fertilidade feminina em pacientes com câncer e as perspectivas em oncofertilidade.

© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Todos os direitos reservados.

An overview of female fertility preservation after cancer

A B S T R A C T

Keywords:

Fertility preservation

Oncofertility

Cryopreservation

In vitro fertilization

The cytotoxic action of antineoplastic treatments very frequently implies serious damage to the gonads, and consequences due to the hypoeestrogenism, such as osteoporosis, infertility and premature ovarian failure, are expected. Oncofertility appears as a new multidisciplinary area, which is dedicated to the development of strategies for the reduction of therapeutic sequels in cancer survivals, ultimately aiming the maintenance of their quality

* Autor para correspondência.

E-mails: bruno@genesis.med.br, ramalho.b@gmail.com (B.R. Carvalho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.04.003>

1413-2087/© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

of life and the possibility of biological procreation. This article aims to present an overview of possible options for female fertility preservation after cancer and future perspectives in oncofertility.

© 2015 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Para o biênio 2014-2015, o Instituto Nacional do Câncer estima a ocorrência anual de 190 mil casos novos de câncer feminino no Brasil – excluídos os cânceres de pele não melanoma –, com destaque para tumores de mama, colo do útero, cólon e reto, pulmão e tireoide. Os registros de base populacional predizem, ainda, mais de 11.840 casos novos anuais de câncer em indivíduos com idade até 19 anos, com destaque para leucemias, linfomas e tumores do sistema nervoso central.¹

No cenário em que milhares de meninas, adolescentes e mulheres jovens com câncer submetem-se anualmente a tratamentos antineoplásicos bem-sucedidos, é possível que já tenhamos entre nós um sobrevivente de câncer na infância ou na adolescência a cada grupo de 570 indivíduos entre 20 e 34 anos.² O aumento anual na incidência de casos de câncer no mundo é de 0,3%, enquanto índices de cura aumentam cerca de 0,6% ao ano. As taxas globais de sobrevida no sexo feminino chegam a 85% para o câncer de mama em países desenvolvidos e mesmo países em desenvolvimento observam cifras próximas de 60%.¹ Também considerados em geral de bom prognóstico, os tumores pediátricos respondem cada vez melhor aos tratamentos e a sobrevida média cumulativa em cinco anos atinge 62% a 77% em países europeus e nos Estados Unidos.³

Há muito se sabe que a quimioterapia pode levar à diminuição da reserva ovariana ou mesmo à falência funcional precoce das gônadas em mulheres jovens (tabela 1) e à infertilidade e ao hipoestrogenismo e suas consequências. A agressão ovariana mais grave é atribuída aos quimioterápicos alquilantes, como ciclofosfamida, mostarda L-fenilalanina, clorambucil, nitrosoureias, melfalan, busulfan e procarbazona, por sua inespecificidade.^{4,5} Os efeitos dependem não apenas do agente em questão, mas também da dose cumulativa e da idade da paciente. Atribuem-se lesões menos graves, que podem regredir em algum grau com o tempo, a outros agentes, como 5-fluorouracil, metotrexate, vincristina, bleomicina, dactinomicina, etoposide e doxorrubicina.^{4,6} No câncer de mama, o risco de amenorreia pode variar de 6% para mulheres jovens submetidas a ciclos de doxorrubicina e ciclofosfamida a 70% para mulheres com mais de 30 anos submetidas a esquemas acrescentados de epirrubina e/ou fluorouracil.⁷

A radioterapia abdominal ou pélvica com doses maiores ou iguais a 20 Gy pode levar à falência ovariana em 22% das mulheres com menos de 35 anos e a cerca de um terço das mulheres com 35 anos ou mais⁸ e também causar danos irreversíveis à vascularização e ao desenvolvimento uterino, esse em crianças e adolescentes.⁹

A oncofertilidade é um campo de interesse interdisciplinar de surgimento recente, que busca mesclar os conhecimentos

em oncologia e endocrinologia reprodutiva com a contribuição das técnicas de reprodução assistida para o desenvolvimento de estratégias de preservação da função gonadal e oferecer a possibilidade da maternidade (ou paternidade) biológica aos sobreviventes ao câncer.¹⁰ Este artigo pretende apresentar as estratégias de preservação de fertilidade disponíveis para mulheres sobreviventes ao câncer.

Preservação da fertilidade feminina depois do câncer

Várias são as ferramentas de tratamento disponíveis. A individualização é a chave para a escolha. Assim, devem ser considerados, além do tipo de câncer e do tratamento a ser feito, fatores como a idade da paciente ao diagnóstico, idade da paciente à época esperada para remissão da doença ou para a procriação, existência de parceiro sexual, tempo disponível e possibilidade de metástases, além, é claro, da quantidade de filhos já nascidos e do desejo de novas gestações.

Proteção hormonal

Drogas que pudessem prevenir a perda de folículos durante a quimioterapia seriam muito convenientes, pois poderiam ser usadas em qualquer faixa etária, sem necessidade de procedimentos invasivos. As drogas mais estudadas são os agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que levam à supressão do eixo hipotálamo-hipófise ovariano e à simulação do estado pré-puberal. Questiona-se o benefício nos folículos primordiais, já que esses não sofrem influência de gonadotrofinas. São aventados outros efeitos, como a diminuição da perfusão ovariana ou o efeito em moléculas antiapoptose.¹¹

Blumenfeld et al. detectaram uma redução de 61% para 6,7% na incidência da falência ovariana precoce em mulheres submetidas à quimioterapia combinada a análogos de GnRH¹² e, recentemente, confirmaram a eficácia de tal estratégia com um estudo no qual 96,9% das pacientes retomaram menstruações regulares, contra 63% das mulheres submetidas à quimioterapia sem a mencionada proteção.¹³ Apesar desses dados, o único ensaio que incluiu exclusivamente pacientes com linfoma de Hodgkin em estádios avançados tratadas especificamente com esquema BEACOPP (bleomicina, etoposida, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona) demonstrou inexistência de proteção gonadal por análogos do GnRH.¹⁴

Embora um ensaio randomizado recente¹⁵ tenha demonstrado benefício do análogo do GnRH na redução da falência ovariana em pacientes com câncer de mama, uma metanálise

Tabela 1 – Risco de gonadotoxicidade ovariana estimado para diferentes combinações de agentes quimioterápicos antineoplásicos (modificado de Christinat & Paganí 2012)

	Alto risco (amenorreia permanente > 80% das mulheres expostas)	Risco intermediário (amenorreia permanente em 20% a 80% das mulheres expostas)	Baixo risco (amenorreia permanente < 20% das mulheres expostas)	Risco ainda não estimado
Agentes isolados	Ciclofosfamida Busulfan Melfalan Clorambucil	Antracíclicos Cisplatina Carboplatina Ara-C (citarabina)	Metotrexato Bleomicina 5-Fluorouracil Actinomicina-D	Taxanos Oxaliplatina Irinotecan Anticorpos monoclonais Inibidores da Tyrosina-quinase
Agentes combinados Radioterapia	Dacarbazina		Alacloides da Vinca	
	Procarbazina Ifosfamida Thiotepa Mostarda nitrogenada	CMF, CAF, CEF × 6 em mulheres 30-39 anos	Mercaptopurina Etoposide Fludarabina ABVD	
	Altas doses Ciclofos- famida/busulfan e transplante de células hematopoiéticas Irradiação ovariana		CMF, CEF, CAF × 6 em mulheres < 30 years MF CHOP, CVP	
	CMF, CAF, CEF × 6 em mulheres > 40 anos	AC, EC × 4 in women > 40 years	Protocolos para leucemia mieloide, leucemia linfóide aguda AC × 4 em mulheres < 40 anos	
AC, doxorubicina+ciclofosfamida; CAF, ciclofosfamida+doxorubicina+fluorouracil; CEF, ciclofosfamida+epirrubicina+fluorouracil; CMF, ciclofosfamida+metotrexato+fluorouracil; MF, metotrexato+fluorouracil; EC, epirrubicina+ciclofosfamida; CHOP, ciclofosfamida+doxorubicina+vincristina+prednisolona; CVP, ciclofosfamida+vincristina+prednisolona; ABVD, adriamicina+bleomicina+vinblastina+dacarbazina.				

publicada pelo mesmo grupo demonstra bem a heterogeneidade dos estudos existentes.¹⁶ Além disso, outros desfechos além da amenorreia, como a diminuição da reserva ovariana, não são contemplados na maioria dos trabalhos.

Embora leve a resultados controversos, o uso dos GnRHa ainda é uma estratégia praticada, pois, além de permitir abordagem imediata, não demanda a existência de um parceiro sexual, não afeta tumores hormônio-dependentes e não requer estrutura cirúrgica ou laboratorial. Por fim, a inibição temporária do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano costuma evitar os fluxos menstruais excessivos secundários à trombotopenia induzida pela quimioterapia.

A prática da proteção hormonal tende a ser considerada como de segunda escolha com o avanço dos tratamentos em reprodução assistida, mas entende-se hoje que, se indicada, seria um meio de preservar oócitos apenas de pacientes submetidas à quimioterapia, sendo muito pouco eficaz frente à agressão radioterápica. Atenção deve ser dada à massa óssea das pacientes submetidas ao tratamento, que tende a diminuir de forma significativa em estados hipogonádicos prolongados e pode ser aconselhável a terapia hormonal adjuvante.

Transposição cirúrgica dos ovários

A transposição cirúrgica dos ovários restringe-se como estratégia para pacientes candidatas à radioterapia exclusiva e consiste em elevar os ovários e fixá-los próximo aos polos renais inferiores, fora da pelve e de eventual campo de irradiação. Como a quimioterapia está indicada em grande parte dos tratamentos antineoplásicos, essa técnica tem caído em desuso e pode ser útil em tumores do colo uterino em estádios iniciais e linfomas candidatos à radioterapia localizada. Limita ainda mais o método a possibilidade de ocorrerem acotovelamentos ou estiramentos vasculares que implicariam obstruções de fluxo e lesão isquêmica ovariana de gravidade potencialmente alta.^{17,18}

Criopreservação de embriões

O congelamento de embriões é o método de preservação fertilidade mais usado em todo o mundo, com sobrevivência embrionária ao descongelamento de até 80%,¹⁹ taxas de gravidez de 29% a 43% e nascidos vivos em 22% a 32% dos casos, a

depende da idade e de características individuais de melhor ou pior prognóstico reprodutivo.²⁰ Dessa forma, pode-se dizer hoje que o congelamento de embriões confere chances de sucesso semelhantes às obtidas com embriões frescos.²¹

Uma importante limitação do método seria a necessidade de adiamento do tratamento antineoplásico em duas a seis semanas para a estimulação ovariana, que idealmente deve ser iniciada nos primeiros dias depois da menstruação natural. Contudo, protocolos de estimulação ovariana de início a qualquer tempo do ciclo menstrual têm sido desenvolvidos e já usados em grande escala, marcam um grande avanço da medicina reprodutiva e solucionam o problema.²²

Como desvantagens, a indução de ovulação para o congelamento de embriões pode estimular tumores hormônio-dependentes e implica a existência de um parceiro sexual ou o uso de sêmen de doador anônimo, aspectos que contraindicam o método para crianças e adolescentes. Para os casos específicos de neoplasias hormônio-dependentes, vários estudos têm documentado o uso do letrozol (um inibidor da enzima aromatase) e do tamoxifeno (um modulador seletivo do receptor estrogênico) como opções à estimulação hormonal tradicional, sem aumento aparente da recorrência do câncer em curto prazo e com resultados satisfatórios.²³ Poderia haver também um problema ético relacionado com o destino dos embriões em caso de falecimento da paciente.

Criopreservação de oócitos maduros

O congelamento de oócitos maduros assume grande importância ao eliminar dilemas éticos, legais e religiosos que envolvem o congelamento de embriões. Dessa forma, torna-se particularmente interessante para mulheres sem parceiro estável e que não aceitariam a fertilização de seus oócitos por gametas de um doador anônimo, ou que por questões pessoais sejam contra o congelamento de embriões. Além disso, assume papel de destaque dentre as opções de preservação de fertilidade em adolescentes, já que essas, de modo geral, ainda não têm parceiro seguro com quem pretendam constituir prole.

A evolução do conhecimento sobre o congelamento de oócitos maduros foi muito significativa nos últimos anos, com altas taxas de sobrevivência após o descongelamento.²⁴ De acordo com estudo recente, as taxas de implantação e de gravidez variam de 10% a 60% e de 30% a 60%, respectivamente,²⁵ ou seja, os resultados reprodutivos já são muito próximos dos obtidos com gametas a fresco.

Novamente, o tempo disponível para início do tratamento antineoplásico seria um ponto crucial para a escolha, haja vista também haver necessidade de estimular os ovários. Aqui os protocolos rápidos de estimulação também são aplicáveis. Outra solução para o problema seria o desenvolvimento da maturação *in vitro* de oócitos colhidos de ovários não estimulados e, portanto, imaturos. A técnica de maturação *in vitro* de oócitos permite o cultivo de complexos *cumulus-oophorus* (COCs) coletados a partir de folículos de pequeno diâmetro (2-10 mm). Pode ser aplicada em meninas pré e pós-púberes. Uma proporção significativa de meninas na pré-puberdade apresenta folículos antrais à ultrassonografia.²⁶ Mas, infelizmente, a tecnologia de maturação de oócitos *in vitro* ainda

precisa evoluir e os resultados não permitem que a estratégia seja padronizada como tratamento e permaneça na esfera experimental.^{27,28} O desafio está na suplementação de fatores oocitários no meio de cultivo dos COCs para desencadear a resposta das células do *cumulus* a fatores estimulantes da meiose, tais como hormônio folículo-estimulante, fator de crescimento endotelial e moduladores de AMP cíclico.^{29,30}

Criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação de tecido ovariano tem sido objeto de inúmeros estudos, com dados recentes que mostram recuperação completa da função gonadal após transplante autólogo de tecido ovariano congelado-descongelado em roedores, ovelhas, primatas³¹ e humanos.³² Trinta e cinco nascimentos em humanos com o uso da técnica de congelamento lento já foram relatados a partir do reimplante ortotópico³²⁻³⁸ e um nascimento humano após o reimplante heterotópico do tecido ovariano vitrificado/aquecido também já foi documentado.³⁹ Surge como opção de preservação da fertilidade em grupos específicos de pacientes para as quais as demais técnicas não são aplicáveis ou recomendáveis: pré-púberes, com alto risco de metástase ovariana (i.e., leucemias) ou que tenham razões pessoais para não receber estimulação ovariana.

Ainda, por dispensar estimulação ovariana, a estratégia posta em prática atenderia muito bem a portadoras de neoplasias hormônio-dependentes ou que necessitam de abordagem imediata, para as quais o tempo necessário para indução da ovulação, mesmo em protocolos considerados rápidos, postergaria o início do tratamento de forma lesiva. Particularmente sob esse aspecto, a coleta do tecido cortical ovariano para a criopreservação oferece a vantagem de poder ser feita em qualquer momento do ciclo menstrual, por procedimento de videolaparoscopia, e possibilitar a aquisição de centenas de milhares de folículos primordiais.^{40,41}

Pretende-se tornar viável o reimplante do tecido congelado depois da remissão, podem-se obter gravidezes até mesmo por método natural. A grande limitação está, ainda, no risco presumido de que o tecido congelado reimplantado contenha focos metastáticos que possam levar à reincidência do câncer, embora não existam relatos nos casos até hoje examinados.²²

Apesar dos avanços, essa técnica ainda é considerada experimental, pois não se sabe ainda a real probabilidade de êxito, há dúvidas em relação à duração do funcionamento do tecido ovariano transplantado e sobre diversas etapas do procedimento.

Criopreservação de oócitos imaturos

Esse método surgiu como uma opção ao congelamento de oócitos maduros, a partir da hipótese de que gametas imaturos são mais resistentes ao processo de criopreservação, por serem mais indiferenciados, pela ausência de fusos e por ter cromossomos protegidos pela membrana nuclear. Sua indicação encontraria amparo na intenção de se minimizar o tempo necessário para execução da estratégia de preservação e de se reduzirem custos e efeitos adversos da

hiperestimulação ovariana controlada. Entretanto, os resultados referentes à sobrevida dos oócitos imaturos aos processos de aquecimento e à maturação *in vitro* não permitem sua execução como técnica terapêutica, razão pela qual permanece no ambiente experimental.

Maturação folicular *in vitro*

Atualmente, tem-se discutido muito sobre outras opções com o objetivo de se preservar a fertilidade de pacientes oncológicas.⁴² Ainda não existe uma técnica padrão-ouro estabelecida, que possa atender a todos os tipos de pacientes que necessitem desse tipo de assistência. Soma-se a isso o fato de que, em certos casos, o risco de metástase ovariana é alto e, por isso, a melhor opção seria a maturação *in vitro* de folículos em laboratório e posterior fertilização. O uso dessa técnica descartaria o risco e permitiria a obtenção de maior número de oócitos a partir de um pequeno fragmento, em relação ao habitualmente obtido em ciclos de fertilização *in vitro*.⁴³

Contudo, trata-se de uma técnica ainda considerada em fase inicial de experimentação, que tem apresentado resultados promissores em estudos com primatas não humanos⁴⁴⁻⁴⁶ e humanos,⁴⁷⁻⁵⁰ assim como em estudos com mamíferos de pequeno⁵¹ e grande porte.^{52,53} Nascidos vivos férteis de camundongos provenientes de oócitos obtidos a partir de folículos maturados *in vitro*⁵¹ e também embriões em estágio de clivagem em primatas não humanos^{54,55} já foram reportados.

Os resultados obtidos até o momento indicam que o cultivo tridimensional em gel de alginato parece ser o ideal para um desenvolvimento folicular adequado, uma vez que com esse tipo de cultivo já se obteve a produção de níveis apreciáveis de hormônios esteroides e a formação de antro em experimentos com primatas não humanos^{45,46} e humanos.^{44,48} Acredita-se que o encapsulamento do folículo em gel de alginato seja capaz de mimetizar a matriz extracelular *in vivo*, pois facilita a troca de moléculas entre o folículo e o meio de cultivo e auxilia na manutenção do arcabouço natural do folículo.⁵⁶

Sistemas de cultivo designados para o suporte do desenvolvimento de folículos humanos individuais precisam ainda ser aprimorados em muitos aspectos, especialmente quando se trata de um cultivo desde os estágios primário/secundário até antral. Definição do estágio do folículo em que ele deve ser coletado, tipo do material necessário para a manutenção da unidade do folículo *in vitro*, período de cultivo, composição do meio de cultivo usado, entre outros, são alguns dos pontos-chave para que o cultivo folicular *in vitro* seja estabelecido como prática terapêutica.

Qualidade de vida

Não restam dúvidas de que os maiores benefícios quando se fala em preservação da fertilidade depois de um câncer são os psicoemocionais, já que a impossibilidade da maternidade biológica é motivo de grande angústia e realça a impotência sentida perante uma doença em geral grave. Preservar a função ovariana e, assim, a fertilidade contempla a intenção de prover a melhor qualidade de vida possível aos sobreviventes ao câncer, principalmente no Brasil, em que a população é

jovem e muitas pacientes terão a doença antes de constituir a prole.

Aspectos éticos

A segurança para a paciente é a principal consideração ética a ser feita ao se instituir uma proposta para preservação da função ovariana às mulheres sobreviventes ao câncer, pois de nada adiantará tentar preservar sua fertilidade se não houver o bem-estar físico e emocional necessário para a maternidade saudável.

Os princípios da autonomia, da beneficência e da não maleficência devem traçar o rumo da estratégia escolhida, com respeito até à opinião da criança se essa tem condições de compreender o que se passa. Em qualquer contexto, em que imperam incertezas e a possibilidade de óbito da paciente, é de extrema importância o seu pleno esclarecimento, bem como dos seus responsáveis legais e familiares envolvidos no processo, além da documentação do consentimento livre e esclarecido para todas as etapas.

Por fim, a abordagem deve contemplar questionamentos a respeito do período de armazenamento dos gametas, embriões ou tecidos congelados em bancos, bem como seu uso póstumo e a doação para receptores ou pesquisas, que encontram respaldo ético,⁵⁷ mas comumente permanecem como dilemas pessoais.

Considerações finais

A esperança de poder gerar uma criança após um câncer é fator de melhoria da autoestima e pode até mesmo contribuir para a melhor aceitação do tratamento antineoplásico e seus efeitos adversos. Entretanto, o risco de insucesso deve ser esclarecido, pois não se garantem pelos meios atuais que gametas e gônadas sejam protegidos por intervenções hormonais e cirúrgicas ou resistam às técnicas de congelamento.

Considerando-se a vulnerabilidade e a imensa pressão psicoemocional geradas por um diagnóstico de câncer, e sua interferência significativa na capacidade de compreensão e aceitação do paciente e seus parentes, a interdisciplinaridade torna-se fundamental para a abordagem adequada em oncofertilidade. Integrando-se a atuação de médicos oncologistas, ginecologistas e especialistas em reprodução humana, psicólogos, assistentes sociais e demais profissionais de saúde as decisões, certamente, serão acertadas.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2013.

2. Henderson TO, Friedman DL, Meadows AT. Childhood cancer survivors: transition to adult-focused risk-based care. *Pediatrics*. 2010;126:129-36.
3. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade. /Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Inca; 2008.
4. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *J Clin Oncol*. 2006;24:1-15.
5. Blumenfeld Z, Avivi I, Ritter M, Rowe JM. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. *J Soc Gynecol Invest*. 1999;6:229-39.
6. Shamberger RC, Sherins RJ, Ziegler JL, Glatstein E, Rosenberg SA. Effects of postoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy on ovarian function in women undergoing treatment for soft tissue sarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 1981;67:1213-8.
7. Christinat A, Pagani O. Fertility after breast cancer. *Maturitas*. 2012;73:191-6.
8. Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington G. Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. *Am J Epidemiol*. 1999;150:245-54.
9. Holm K, Nysom K, Brocks V, Hertz H, Jacobsen N, Muller J. Ultrasound B-mode changes in the uterus and ovaries and Doppler changes in the uterus after total body irradiation and allogeneic bone marrow transplantation in childhood. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:259-63.
10. Woodruff TK. The emergence of a new interdisciplinary: oncofertility. *Cancer Treat Res*. 2007;138:3-11.
11. Roness H, Kalich-Philosoph L, Meirow D. Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents. *Hum Reprod Update*. 2014;20:759-74.
12. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotropin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Human Reprod*. 1996;11:1620-6.
13. Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, Epelbaum R, Rowe JM, Dann EJ. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril*. 2008;89:166-73.
14. Behringer K, Wildt L, Mueller H, Mattle V, Ganitis P, van den Hoonaard B, et al. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol*. 2010;21:2052-60.
15. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A, Gamucci T, Olmeo N, Gori S, et al. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. *JAMA*. 2011;306:269-76.
16. Del Mastro L, Ceppi M, Poggio F, Bighin C, Peccatori F, Demeestere I, et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: Systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev*. 2014;40:675-83.
17. Kwon JS, Case AM. Preserving reproductive function in women with cancer. *Sex Reprod Menop*. 2004;2:222-9.
18. Rosa e Silva ACJS. Fertility preservation. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28:365-72.
19. Michelmann HW, Nayudu P. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank*. 2006;7:135-41.
20. Check JH, Choe JK, Brasile D, Cohen R, Horwath D. Comparison of pregnancy rates following frozen embryo transfer according to the reason for freezing: risk of ovarian hyperstimulation vs inadequate endometrial thickness. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2012;39(4):434-5.
21. Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod*. 2000;15:175-9.
22. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2013 [Epub ahead of print].
23. Oktay K. Further evidence on the safety and success of ovarian stimulation with letrozole and tamoxifen in breast cancer patients undergoing in vitro fertilization to cryopreserve their embryos for fertility preservation. *J Clin Oncol*. 2005;23:3858-9.
24. Rudick B, Oppen N, Paulson R, Bendikson K, Chung K. The status of oocyte cryopreservation in the United States. *Fertil Steril*. 2010;94:2642-6.
25. Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohí J, Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients. *Fertil Steril*. 2013;99:1485-95.
26. Badouraki M, Christoforidis A, Economou I, Dimitriadis AS, Katzos G. Sonographic assessment of uterine and ovarian development in normal girls aged 1 to 12 years. *J Clin Ultrasound*. 2008;36:539-44.
27. Imesch P, Scheiner D, Xie M, Fink D, Macas E, Dubey R, Imthurn B. Developmental potential of human oocytes matured in vitro followed by vitrification and activation. *J Ovarian Res*. 2013;18(6):30.
28. Fasano G, Moffa F, Dechène J, Englert Y, Demeestere I. Vitrification of in vitro matured oocytes collected from antral follicles at the time of ovarian tissue cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;23(9):150.
29. Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvrindt R, et al. Meiotic arrest in-vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod*. 2006;74:177-84.
30. Zeng HT, Richani D, Sutton-McDowall ML, Ren Z, Smits JE, Stokes Y, Gilchrist RB, Thompson JG. Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2014 [epub ahead of print].
31. Oehninger S. Strategies for fertility preservation in female and male cancer survivors. *J Soc Gynecol Investig*. 2005;12:222-31.
32. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004;364:1405-10.
33. Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, Schiff E, Dor J. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2005;353:318-21.
34. Isachenki V, Isachenki E, Keck G, Dittrich R, Montag M, van der Ven H, Mallmann P, Müller A, Distler W, Beckmann MW, Rahimi G. First live birth in Germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation. *Clin Lab*. 2012;58:933-8.

35. Callejo J, Salvador C, González-Nuñez S, Almeida L, Rodriguez L, Marqués L, Valls A, Lailla JM. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *J Ovarian Res.* 2013;6:33.
36. Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:735-49.
37. Stoop S, Cobo A, Silber S. Fertility preservation for age-related fertility decline. *Lancet.* 2014;384:1311-9.
38. Donnez J, Jadoul P, Pirard C, Hutchings G, Demylle D, Squifflet J, Smits J, Dolmans MM. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril.* 2012;98:720-5.
39. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho C, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B, Hsueh AJ. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:17474-9.
40. Rosa e Silva ACJS, Carvalho BR, Rosa e Silva JC, Silva de Sá MF. Ovarian Function Preservation After Cancer. In: Margarite T. Moorland (editor). (Org.). *Cancer in Female Adolescents.* 1st ed. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc 2008. p. 139-53.
41. Poirot CJ, Vacher-Lavenu MC, Helardot P, Guibert J, Brugières L, Jouannet P. Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod.* 2002;17:1447-52.
42. Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:902-11.
43. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril.* 2013;99:1523-33.
44. Xu M, West-Farrell ER, Stouffer RL, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol Reprod.* 2009;81:587-94.
45. Xu J, Bernuci MP, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB, et al. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Society for Reproduction and Fertility.* 2010:1470-626.
46. Ting AY, Yeoman RR, Lawson MS, Zelinski MB. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. *Hum Reprod.* 2011;26:2461-72.
47. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, Woodruff TK. In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod.* 2009;24:2531-40.
48. Amorim CA, Langendonck AV, David A, Dolmans MM, Donnez J. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix. *Human Reproduction.* 2009;24(1):92-9.
49. Vanacker J, Luyckx V, Amorim C, Dolmans MM, Van Langendonck A, Donnez J, Camboni A. Should we isolate human preantral follicles before or after cryopreservation of ovarian tissue? *Fertil Steril.* 2013;99:1363-8.
50. Bian J, Li T, Ding C, Xin W, Zhu B, Zhou C. Vitreous cryopreservation of human preantral follicles encapsulated in alginate beads with mini mesh cups. *J Reprod Dev.* 2013;59:288-95.
51. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Engineering.* 2006;12:2739-46.
52. Rocha RM, Alves AM, Lima LF, Duarte AB, Chaves RN, Brito IR, et al. Is the mouse follicle culture a good model for the goat with respect to the development of preantral follicles in vitro? *Domest Anim Endocrinol.* 2014;49:27-30.
53. Silva GM, Rossetto R, Chaves RN, Duarte AB, Araújo VR, Feltrin C, et al. In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. *Zygote.* 2014;1-10 [Epub ahead of print].
54. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barrett SL, Zelinski MB, Stouffer RL. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen, and fetuin. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1061-72.
55. Xu J, Xu M, Bernuci MP, Fisher TE, Shea LD, Woodruff TK, Zelinski MB, Stouffer RL. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 2013;761:43-67.
56. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials.* 2007;28:4439-48.
57. Brasil. Conselho Federal de Medicina-CFM. Resolução no 2013, de 09 de maio de 2013. *Diário Oficial da União*, de 09 de maio de 2013; Seção I: 119.