

Considerações sobre preservação de tecido ovariano e reposição hormonal no climatério

Considerations for preservation of ovarian tissue and climacteric hormone replacement therapy

Sonia Maria Rolim Rosa Lima¹

Resumo

Os avanços na tecnologia reprodutiva têm possibilitado a preservação da fertilidade como um fato real para mulheres cuja função gonadal foi prejudicada por série de agravos. A criopreservação de tecido ovariano tem sido motivo de inúmeros estudos. Trabalhos recentes experimentais sustentam a hipótese de que o transplante de tecido ovariano a fresco ou congelado possa restaurar a função endócrina da mulher. Neste artigo abordamos as diferentes técnicas utilizadas visando ao retorno da função ovariana assim como a hipótese de, num futuro breve, a preservação de tecido ovariano como alternativa à terapia hormonal no climatério.

Descritores: Criopreservação, Preservação de tecidos/tendências, Transplante de tecidos, Climatério, Terapia de reposição hormonal

Abstract

Advances in reproductive technology have allowed the preservation of fertility as a real fact for women whose gonadal function was impaired by series of injuries. The cryopreservation of ovarian tissue has been the subject of numerous studies. Recent experimental works have hypothesized that the transplanted ovarian tissue fresh or frozen can restore endocrine function of women. This article considers the different techniques used to verify the return of ovarian function as well as the possibility that, in the near future, preservation of ovarian tissue as an alternative to hormone therapy in climacteric.

Key words: Cryopreservation, Tissue preservation/trends, Tissue transplantation, Climacteric, Hormone replacement therapy

Climatério é o período no qual ocorre a transição da fase reprodutiva para a não reprodutiva ocorrendo nesta fase, deficiência de hormônios esteróides sexuais, resultante da insuficiência ovariana secundária ao consumo de folículos primordiais que constituem o patrimônio genético de cada mulher. A Organização Mundial de Saúde também define este período como fase biológica da vida e não como processo patológico, que compreende a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo⁽¹⁾.

Menopausa é um ponto no tempo, isto é, a data da última menstruação na vida de uma mulher. É definida pela Sociedade Norte Americana de Climatério (*North American Menopause Society*, 2001), como a ocorrência de doze meses de amenorréia afastadas outras causas patológicas que poderão levar a este quadro; ocorre geralmente ao redor dos 48 aos 50 anos de idade⁽¹⁾.

Dentre os fatores que podem estar associados à antecipação da menopausa citam-se a cirurgia pélvica extensa devida a múltiplas aderências relacionadas a processos inflamatórios, endometrióticos, levando à diminuição da vascularização ovariana. As portadoras de câncer tanto ginecológico quanto a outros tipos submetidas à radioterapia e à quimioterapia. As tabagistas que podem ter sua menopausa antecipada em cerca de dois anos quando comparadas com as não fumantes, talvez por ação direta da nicotina sobre os oócitos. O estado nutricional e o peso parecem também interferir na antecipação da menopausa, de fato, mulheres com desnutrição acentuada podem ter sua menopausa antecipada⁽²⁾.

No Brasil estima-se que no ano de 2000, a população de mulheres com 50 anos ou mais atingiu o número de 14.508.639 (Fundação IBGE, 2003). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que em 2025 a expectativa de vida nos países desenvolvidos será de 81 anos e de 78 naqueles em desenvolvimento⁽³⁾.

1. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Trabalho realizado: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Endereço para correspondência: Sonia Maria Rolim Rosa Lima. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia – ISCMSP. Rua Dr. Cesário Motta Jr, 112 – Vila Buarque – 01221-020 – São Paulo – SP - Brasil

A despeito dos efeitos clínicos atribuídos ao uso da terapia hormonal (TH) após a menopausa, a taxa de aderência ao tratamento varia de 10% a 50% e a grande maioria das mulheres (80% ou mais) não fazem uso da TH o tempo suficiente para obter impacto na prevenção das doenças crônicas^(4,5,6), assim, a hipótese de outra possibilidade terapêutica seria muito bem-vinda.

Trabalhos recentes experimentais têm levantado a hipótese de que o transplante ovariano (tecido a fresco ou congelado) possa restaurar a função endócrina da mulher, sendo uma alternativa à terapia hormonal. O banco de tecido ovariano congelado, a utilização de tecido ovariano a fresco ou mesmo o transplante de todo ovário podem representar alternativas possíveis para atender estas questões e encontram-se em investigação experimental tanto em animais quanto em humanos^(7,8,9).

As células germinativas têm origem no endoderma e migram para a crista gonadal onde se multiplicam até atingirem cerca de seis a sete milhões ao redor da 20.a semana de vida intra-uterina. A morte celular programada ou atresia inicia-se após esta ocasião e persiste por toda a vida da mulher, assim por ocasião do nascimento estão presentes cerca de um a dois milhões de células germinativas e no início da puberdade elas se reduzem a aproximadamente 300.000 a 400.000 unidades. Durante os próximos 35 a 40 anos da vida reprodutiva ocorrerá diminuição progressiva, até a menopausa, onde poucos milhares de unidades restarão.

A característica principal do período reprodutivo é a maturação completa de algumas unidades foliculares, com liberação, na imensa maioria das vezes de um óvulo e formação do corpo lúteo, com produção variável de estradiol e progesterona. O ovário então contém reserva de células germinativas que excede o número de folículos suficientes para todos os ciclos menstruais, atingindo seu número máximo ao redor da 20.a semana de vida intra-uterina com depleção paulatina por toda a vida da mulher, sem possibilidade de reposição⁽¹⁰⁾.

Dentre os métodos utilizados para a preservação da função endócrina ovariana destacam-se a ooforopexia, o emprego dos análogos e dos antagonistas do GnRH e a criopreservação de tecido ovariano com posterior reimplante. A ooforopexia constitui atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de videolaparoscopia, o procedimento de escolha graças a sua simplicidade, segurança e efetividade, porém a eficácia na prevenção da falência ovariana varia de 16% a 90 %⁽¹¹⁾.

O emprego dos análogos do GnRH também têm sido sugerido e Blumenfeld et al (2008)⁽¹²⁾ demonstraram seus benefícios, em mulheres jovens sob terapia

gonadotóxica sendo que menos de 7% no grupo que recebeu o tratamento desenvolveu amenorréia hiper-gonadotrópica irreversível. Quanto aos antagonistas do GnRH há dúvidas de seus benefícios quando comparados aos agonistas. Há também estudos envolvendo droga antagonista da apoptose - o *Sphingosine-1-Phosphate* - que apesar de promissora na preservação da função ovariana e da fertilidade após quimioterapia e irradiação, sua eficácia e aplicabilidade prática em humanos ainda precisa ser testada⁽¹³⁾.

Paul Bert (1893)* em Paris foi provavelmente o primeiro a transplantar ovários, quando descreveu a realização de enxerto de ovários de coelha na cavidade abdominal de receptora, porém sem sobrevivência. Cerca de 30 anos mais tarde, Chrobach na Austria instruiu seu assistente Emil Knauer a repetir a experiência de Bert sendo que, somente um enxerto sobreviveu, mas este resultado positivo motivou-o a tentar auto enxertos tendo obtido resultados melhores e restauração da fertilidade. Na realidade o crédito do primeiro sucesso não foi dado a Knauer, mas sim a Robert Tuttle Morris, em Nova York⁽¹⁴⁾.

Morris relatou seus resultados no ano de 1895*. Seu objetivo era a conservação da função ovariana após a histerectomia, visto que, naquela época, quando o procedimento da retirada do útero era realizado, os ovários eram também removidos, não obstante a idade das mulheres. Morris implantou seções de ovários de mulheres férteis em outras mulheres que haviam sido ooforectomizadas. Seu caso mais famoso foi publicado em 1906*, e envolveu uma mulher com amenorréia secundária, aparentemente por Síndrome dos Ovários Policísticos, na qual foi feito o transplante de ovário no ligamento largo. A doadora, de 33 anos, havia sido submetida a histerectomia por prolapso uterino. Posteriormente a receptora deu à luz a uma criança do sexo feminino e logo após, mais duas crianças. Na impossibilidade da determinação da identidade genética das crianças (do tecido doado ou da própria mãe) ficou a dúvida não esclarecida. Após esses resultados outros centros de pesquisas realizaram a mesma tentativa, mas, até o início da Segunda Guerra Mundial ainda havia dúvidas a respeito do sucesso de tais enxertos⁽¹⁴⁾.

Outro grande impasse então aventado era a conservação do tecido ovariano, solucionado somente em 1948 quando o primeiro crioprotetor (glicerol) foi descoberto em Londres⁽¹⁵⁾. Nos anos 50, surgiram diversas pesquisas a respeito da criopreservação e transplante de ovários. Atualmente o congelamento de tecido ovariano pode ser realizado por retirada total do ovário com pedículo vascular, fragmentos do córtex ovariano avascular e folículos isolados⁽¹⁶⁾. Apesar de já ser possível isolar folículos primordiais de tecido ova-

* Apud Godesn RG. *Ovary and uterus transplantation. Reproduction. 2008; 136:671-80*⁽¹⁴⁾

riano humano, não se obteve até o momento sucesso na sua maturação *in vitro*, mas somente em animais⁽¹⁷⁾.

Na década de 50, estudos em ratas, relataram crescimento folicular, produção estrogênica e até mesmo obtenção de prenhez após transplante de tecido ovariano sendo que, o transplante de tecido criopreservado demonstrou ser efetivamente tolerado ao congelamento e descongelamento⁽¹⁸⁾.

Diversos trabalhos desde então demonstraram o retorno da função ovariana de implantes autólogos e mesmo sucesso em gestações a termo em animais^(19,20,21,22,23,24).

O transplante autólogo e heterólogo de tecido ovariano criopreservado foi descrito em 1956 quando Parkes, em ovário de ratas submetidas a transplante autólogo, obteve sucesso com a restauração da função endócrina⁽²⁵⁾. Gosden et al realizando transplante autólogo de tecido ovariano obtiveram resultados positivos com a restauração da fertilidade em ovelhas⁽¹⁹⁾.

Mais recentemente, destacam-se os trabalhos de Almodim et al em animais que apresentavam falência ovariana prematura induzida experimentalmente após radioterapia, com restauro da fertilidade após transplante intracortical (*intracortical sowing of germinative tissue*) de tecido germinativo criopreservado^(22,23).

A criopreservação de tecido ovariano antes da terapia para câncer com o objetivo de preservar a função reprodutiva e/ou restaurar a fertilidade em mulheres na menacme e na puberdade tem sido relatada com resultados positivos após a quimioterapia devido a neoplasias^(18,26,27,28).

Em mulheres, Newton et al⁽²⁹⁾ Hovatta et al⁽³⁰⁾ obtiveram a maturação *in vitro* de tecido ovariano obtido através de biópsia de 20 mulheres submetidas a cirurgias ginecológicas com 2/3 dos folículos viáveis após 10 a 15 dias de cultura. Desde então vários meios de cultura, mecanismos e fatores que atuam nos diferentes estádios do desenvolvimento folicular foram estudados e isolados, embora a cada passo leve a outros que ainda deverão ser elucidados.

Fato marcante na história da criopreservação de tecido ovariano de mulheres foi descrito em 2004 por Donnez et al⁽²⁶⁾. Os autores realizaram no ano de 1997, biópsias de tecido ovariano em mulher portadora de Linfoma de Hodgkin estágio IV, anteriormente ao início da quimioterapia, submetendo o tecido obtido a criopreservação. Após o final do tratamento do câncer a mulher apresentou falência ovariana prematura. Em 2003 foi então realizado o autotransplante ortotópico do tecido ovariano através de laparoscopia e cinco meses após o reimplante a temperatura basal, os ciclos menstruais, o exame ultrassonográfico e as concentrações séricas hormonais indicaram ciclos ovulatórios. Após cinco meses do evento o exame ultrassonográfico mostrou a presença de folículos no local do reimplante,

situado fora do local dos ovários, que se apresentavam atróficos. Após cinco a nove meses, a mulher apresentava ciclos menstruais regulares com presença de corpo lúteo, e após onze meses do reimplante, a ultrassonografia por via transvaginal confirmou a presença de gestação intra-uterina, resultado em feto vivo. Como conclusão os autores sugerem que a criopreservação de tecido ovariano deve ser oferecida a todas as mulheres jovens com diagnóstico de câncer⁽²⁶⁾.

Oktaç et al⁽¹⁵⁾ procederam a criopreservação de tecido ovariano obtido de uma mulher de 30 anos portadora de câncer de mama antes da ocorrência da menopausa induzida por quimioterapia. Seis anos após, transplantaram o tecido ovariano na pele do seu abdômen. A função ovariana retornou após três meses do implante, com presença de desenvolvimento folicular e produção de estrogênios. Foram coletados 20 oócitos sendo oito adequados para a fertilização *in vitro* com desenvolvimento de embrião. Concluíram que a função endócrina ovariana pode ser preservada por longo período em banco de tecido ovariano adequadamente criopreservado.

Rosendahl et al realizaram o autotransplante de tecido cortical ovariano criopreservado e transplantado em local diverso da posição habitual dos ovários (local heterotópico) em mulher de 28 anos portadora de Linfoma de Hodgkin antes da quimioterapia e radioterapia serem instituídas. Após completa remissão do câncer o tecido ovariano foi transplantado para a parede pélvica (lado direito), linha média subperitoneal e na parede abdominal região baixa. O tecido ovariano após transplante heterotópico apresentou produção hormonal e desenvolvimento de folículos, nos três locais transplantados. Os oócitos foram então aspirados e submetidos à injeção intra-citoplasmática de esperma (ILCSI) sendo então transferidos para a cavidade uterina resultado em gestação. Concluíram que o autotransplante heterotópico de tecido ovariano criopreservado pode resultar em desenvolvimento folicular e os oócitos aspirados de folículos maduros são capazes de ser fertilizados através de ICSI resultando em embrião com produção de gonadotrofinas coriônicas detectáveis⁽³¹⁾.

Gêmeas monozigóticas constituem excelente método de pesquisa para o estudo do transplante de ovário na eventualidade de uma delas apresentar falência ovariana prematura. Silber, 2009⁽³²⁾ estudou série de dez gêmeas monozigóticas onde foram realizados transplante de tecido ovariano. Todas apresentaram reinício de sua função ovulatória, com ciclos regulares de três dias. Sete conceberam naturalmente (três delas por duas vezes) com nativivos saudáveis. O maior tempo de duração de atividade do tecido ovariano transplantado foi de três anos, e a função ovariana retornou novamente logo após novo transplante de

tecido criopreservado. Conclui que o transplante de tecido ovariano restaurou a função hormonal e reprodutiva com sucesso⁽³²⁾.

Outra questão de capital importância seria a duração com efetiva produção hormonal dos referidos transplantes. Silber et al, 2010⁽³³⁾ com o objetivo de avaliar a função dos transplantes ovarianos por mais de cinco anos, acompanharam dois grupos de mulheres: um grupo transplantado com tecido ovariano a fresco e outro grupo com transplante de tecido ovariano congelado, com atenção para o grau de perda folicular após isquemia e criopreservação. Nove mulheres com falência ovariana prematura receberam tecido ovariano a fresco doado por sua irmã gêmea (monozigótica) e 16 mulheres jovens portadoras de câncer tiveram seu tecido ovariano criopreservado previamente à cirurgia com posterior transplante. O objetivo final deste trabalho foi verificar a ocorrência de retorno dos ciclos menstruais, dosagem e avaliação das concentrações séricas hormonais, ocorrência de gestações resultando nascituros saudáveis e tempo de duração da função endócrina dos transplantes. Obtiveram como resultado concentrações séricas de FSH normais e regulares e retorno dos ciclos menstruais até cinco meses após a cirurgia em todos os casos, tanto com utilização de tecido ovariano a fresco quanto congelado. Ocorreram quatorze gestações espontâneas resultando em oito nascidos vivos saudáveis, sendo que por ocasião da publicação do trabalho haviam mais duas gestações em curso. Concluem que o transplante de tecido ovariano em mulheres constitui um processo seguro, independentemente da técnica de conservação de tecido utilizada⁽³³⁾.

Já que o banco de tecido ovariano é um fato, a criopreservação de tecido ovariano para posterior implante por ocasião da menopausa natural é uma possibilidade, constituindo assim uma alternativa natural à terapia hormonal.

Não há, até a presente data, trabalhos na literatura que demonstrem esta hipótese, porém sabemos que entre os fatores que potencialmente afetam a função adequada dos transplantes citam-se a idade da doadora, o número de folículos primordiais, a espessura da cortical, a duração da isquemia próxima a base vascular do hospedeiro, a incompatibilidade imunológica, o local de implantação e o método de preservação do tecido.

Outros itens que devem ser respondidos tendo em vista o período proposto: o tempo de duração dos implantes, a possibilidade de reimplantes autólogos ou heterólogos, a época apropriada para a obtenção do tecido, a possibilidade de sucessivos reimplantes, o tempo que poderiam ou deveriam ser mantidos e a capacidade de produção de ciclos ovulatórios, com produção adequada de progesterona, para a prote-

ção endometrial, naquelas com útero intacto. Essas e outras questões intrigantes deverão ser respondidas nos próximos anos.

Conclusões

A possibilidade da conservação da função hormonal e reprodutiva constitui tema de notável importância. O transplante de tecido ovariano tem tido destaque graças às novas pesquisas e avanços no campo da biologia molecular, caminhando paralelamente aos novos tratamentos do câncer e da sobrevivência das mulheres em período reprodutivo e na puberdade. Nos últimos anos foram publicados resultados positivos obtidos com o transplante de tecido criopreservado em mulheres com falência ovariana prematura. Não há ainda relatos na literatura da utilização de tecido ovariano criopreservado com o objetivo da terapia hormonal após a menopausa natural, porém esta alternativa deverá constituir tema de particular interesse nas próximas décadas tendo em vista o aumento da expectativa de vida da mulher e os benefícios, já comprovados, da terapia hormonal.

Referências Bibliográficas

1. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric*. 2001; 4:267-72.
2. North American Menopause Society. *Menopause Core Curriculum Study Guide*. 3rd ed. Cleveland (Ohio): The North American Menopause Society; 2007.
3. World Health Organization. *The World Health Report 1998. Life in the 21st century: a vision for all*. Geneva: World Health Organization; 1998. [51st. World Health Assembly; A51/3 17 March 1998].
4. Utian WH, Archer DF, Bachmann GA, Gallagher C, Grodstein F, Heiman JR, et al. The North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: July 2008 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2008; 15:584-602.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Revisão técnica de Ivis Bezerra de Andrade, Maria Auxiliadora da Silva Benevides, Sônia Maria Rolim Rosa Lima *Manual de Atenção à Saúde da Mulher no Climatério / Menopausa*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. 192 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos – Caderno, n.9)
6. The North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2010; 17:242-55.
7. Pessole ML, Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Ceschin AP, Ioshii SO. Aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27:642-9.
8. Silber SJ, Grudzinskas G, Gosden RG. Successful pregnancy after microsurgical transplantation of an intact ovary. *N Engl J Med*. 2008; 359:2617-8.
9. Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, et al. Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008. *Fertil Steril*. 2009; 91:1619-29.

10. Fritz MA, Speroff L. The ovary: embryology and development. In: Fritz MA, Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.105-20.
11. Kim S.S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril*. 2006; 85:1-11.
12. 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;1:166-73.
13. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *Oncologist*. 2007;12:1044-54.
14. Gosden RG. Ovary and uterus transplantation. *Reproduction*. 2008;136: 671-80.
15. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004; 363:837-40.
16. Prates LFVS. Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento. [Tese – Mestrado] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
17. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update*. 2004; 10:251-66.
18. Schüffner AG, Piazza MJ, Costa SL, Centa LJR. Criopreservação de tecido ovariano. Revisão histórica. *Femina*. 2003;31:63-6.
19. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Hum Reprod*. 1994; 9:597-603.
20. Salle BJ, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Gruerin JF, Lomage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril*. 2002;77:403-8.
21. Barros FSV. Transplante de tecido ovariano autólogo em peritônio de ratas. [Dissertação – Mestrado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.
22. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ferreira JO, Franco RL, Cavalcante AA, et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod*. 2004; 19:1287-93.
23. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ceschin AP, Krieger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril*. 2004; 81:160-4.
24. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, et al. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*. 2004; 428: 137-8.
25. Parkes AS. Survival time of ovarian homografts in two strains of rats. *J Endocrinol*. 1956; 13:201-10.
26. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004; 64:1405-10.
27. Hovatta O. Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;113:S50-4.
28. Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2005; 353:318-21.
29. Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Roger Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*. 1996; 11:1487-96.
30. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*. 1997;12:1032-6.
31. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KTL, Nyboe AA, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod*. 2006; 21:2006-9.
32. Silber SJ. Fresh ovarian tissue and whole ovary transplantation. *Semin Reprod Med*. 2009; 27:479-85.
33. Silber SJ, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010; 94:2191-6.

Trabalho recebido: 19/09/2010
Trabalho aprovado: 26/02/2011