

Preservação da fertilidade em mulheres com câncer: atualização e perspectivas

Fertility preservation in women with cancer: update and perspectives

Ricardo Mello Marinho¹, Jhenifer Kliemchen Rodrigues², Rívia Mara Lamaita³, Ana Marcia de Miranda Cota⁴, Alberto Julius Alves Wainstein⁵, Ana Paula Drummond Lage Wainstein⁶, Fernanda Parreiras⁷, Ana Luisa Menezes Silva⁸, João Pedro Junqueira Caetano⁹

DOI: 10.5935/2238-3182.20130078

RESUMO

Com o aumento do diagnóstico de câncer em mulheres jovens e os avanços no seu tratamento, muitas pacientes que poderão ter sua fertilidade comprometida com a quimioterapia têm manifestado desejo de engravidar futuramente. O congelamento de embriões, após fertilização *in vitro*, para preservar a fertilidade está bem estabelecido. A criopreservação de oócitos por vitrificação evoluiu bastante nos últimos anos, deixando de ser experimental. Até 2009 nasceram mais de 900 crianças a partir de oócitos criopreservados, sem aumento do risco de anomalias congênitas. O uso de análogos do GnRH para a supressão ovariana durante a quimioterapia na tentativa de prevenir a falência ovariana prematura apresenta resultados incertos. Outras técnicas ainda são consideradas experimentais, como a criopreservação e posterior autotransplante de tecido ovariano. Já foram relatados 24 nascimentos com o seu uso, persistindo, entretanto, dúvidas que motivam o seu estudo. A maturação de folículos ovarianos *in vitro* é alternativa promissora para preservação da fertilidade nessas pacientes e tem apresentado resultados positivos em roedores, macacos e humanos. Muita cautela deve ser tomada com o uso de técnicas experimentais, especialmente quando oferecidas para pacientes diante de fragilidade emocional. Por isso, é importante transmitir corretamente informações sobre chances de gravidez com tratamentos existentes e as limitações das técnicas experimentais.

Palavras-chave: Preservação da Fertilidade; Criopreservação; Fertilização in Vitro; Ovário/antomia & histologia; Estruturas Embrionárias; Oócitos; Técnicas de Maturação in Vitro de Oócitos; Hormônio Liberador de Gonadotropina/análogos & derivados.

ABSTRACT

With the increased number of cancer diagnoses among young women and the advances in treatment, many patients who may have had their fertility compromised by chemotherapy express desire to become pregnant in the future. Freezing embryos for later IVF so as to preserve fertility is a well established process. Oocyte cryopreservation by vitrification has evolved greatly in recent years and is no longer considered experimental. By 2009 more than 900 children were born from cryopreserved oocytes, without increased risk of congenital anomalies. The preventive use of GnRH analogues for ovarian suppression during chemotherapy to avoid premature ovarian failure has uncertain outcomes. Other techniques such as cryopreservation of ovarian tissue for later autograft are still considered experimental. Although use has already been reported in 24 births, doubts still persist and motivate further study. In vitro maturation of ovarian follicles is a promising alternative for preserving patient fertility and has shown positive results in rodents, monkeys, and humans. Caution should be used with experimental techniques, especially when offered

Recebido em: 10/09/2012
Aprovado em: 23/10/2013

Instituição:
Clínica Pró-Criar Medicina Reprodutiva/Mater Dei
Belo Horizonte, MG – Brasil

Autor correspondente:
Ricardo Mello Marinho
E-mail: ricardommarinho@gmail.com

to emotionally fragile patients. Therefore it is important to thoroughly convey information on the chances of pregnancy with existing treatments and the limitations of experimental techniques.

Key words: *Fertility Preservation; Cryopreservation; Fertilization in Vitro; Ovary/anatomy & histology; Oocytes; Embryonic Structures; In Vitro Oocyte Maturation Techniques; Gonadotropin-Releasing Hormone/analogs & derivatives.*

INTRODUÇÃO

A cada ano um número maior de mulheres jovens terá diagnóstico de câncer. No Brasil, em 2008, foram relatados cerca de 30.000 casos de câncer em mulheres abaixo de 44 anos e estima-se que em 2012 foram 52.680 novos casos de câncer de mama e 4.450 de linfoma não Hodgkin.¹ Com o diagnóstico precoce e avanços no tratamento, muitas mulheres têm sido curadas, muitas ainda não tendo engravidado ou não tendo a prole definida no momento do tratamento, desejando engravidar futuramente. A radioterapia realizada na pelve pode levar à falência ovariana e algumas das drogas e esquemas utilizados na quimioterapia podem ter efeito tóxico sobre as gônadas, podendo levar à infertilidade por diminuição da reserva ovariana e até a ooforectomia em alguns casos.²⁻⁵

Quase três quartos das mulheres sem filhos no momento do diagnóstico do câncer desejam engravidar futuramente e 81% dos adolescentes e 93% dos seus pais estão interessados na preservação da sua fertilidade, mesmo que os tratamentos sejam experimentais.⁶ Algumas mulheres descrevem a perda da fertilidade, consequente ao tratamento do câncer, como evento tão dramático quanto o diagnóstico do câncer.⁵

As mulheres entre 14 e 40 anos candidatas à quimioterapia e com chance elevada de comprometimento da função ovariana devem ser aconselhadas por especialista em Medicina Reprodutiva e em concordância com o oncologista responsável em relação aos métodos de preservação de fertilidade.^{7,8} Entretanto, por se tratar de momento crítico, com muitas decisões a serem tomadas em curto período de tempo, essa conduta não é frequentemente seguida pelos oncologistas. Além disso, pacientes e médicos sentem também dificuldade em obter informações atualizadas e acesso aos procedimentos de preservação da fertilidade. Niemasik *et al.*⁵ avaliaram o que as mulheres sobreviventes de câncer se recordavam sobre os riscos de infertilidade relacionados ao tratamento no momento do seu diagnóstico, com o objetivo de identificar as barreiras para o aconselhamento

da preservação da fertilidade. Quase a metade das mulheres não se lembrava a respeito do aconselhamento sobre reprodução e preservação da fertilidade. O prognóstico incerto, o risco de recorrência e a barreira de comunicação médico-pacientes podem levar à ausência de informações adequadas a essa população de pacientes.^{9,10}

OPÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE FEMININA

Algumas das técnicas usadas atualmente para a preservação da fertilidade já estão bem estabelecidas, como a fertilização *in vitro* e posterior congelamento de embriões. Outras são mais recentes e ainda apresentam resultados incertos, como o congelamento de oócitos maduros e o uso de análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). E ainda existem técnicas consideradas experimentais, como a criopreservação e posterior autotransplante de tecido ovariano.

Criopreservação de oócitos ou embriões

A criopreservação de embriões e a criopreservação de oócitos são alternativas para pacientes que serão submetidas ao tratamento contra o câncer e manifestam desejo em preservar sua fertilidade. São destinadas a pacientes em período reprodutivo e que podem ser submetidas à estimulação ovariana previamente ao tratamento do câncer. Incluem as etapas de estimulação ovariana com análogos do GnRH, gonadotrofinas urinárias ou recombinantes (hormônio folículo estimulante – FSH; hormônio luteinizante – LH; e gonadotrofina coriônica humana – hCG), monitoração ultrassonográfica e punção ovariana para aspiração folicular, guiada por ultrassonografia transvaginal, sob analgesia. Os oócitos obtidos podem ser congelados no mesmo dia da coleta ou fertilizados com espermatozoides do parceiro e os embriões congelados no terceiro ao quinto dias de cultivo.

Em caso de boa resposta ao tratamento do câncer, com bom prognóstico e autorização pelo oncologista responsável, os embriões podem ser descongelados e transferidos para o útero da paciente após breve preparo hormonal. Em caso do congelamento de oócitos, eles devem ser descongelados e fertilizados com os espermatozoides do parceiro. Após breve

período de cultivo em laboratório, os embriões serão transferidos para o útero da paciente.

Essas duas opções exigem 15 a 20 dias para a indução e coleta dos oócitos antes do tratamento oncológico. Para muitos oncologistas e pacientes, essa espera pode ser impediante do processo, por temerem a piora do prognóstico, principalmente em câncer hormônio-dependente, pela elevação dos níveis de estradiol durante a indução, o que pode ser evitado quando se associa um inibidor da aromatase como oletrozol ao processo de estimulação ovariana.

A criopreservação de embriões é técnica bem estabelecida, com taxas de gravidez por ciclo de embriões descongelados semelhante à dos ciclos com transferência de embriões a fresco.

As chances de gravidez futura dependerão da idade da paciente no momento do congelamento, podendo ser de 20 a 40%¹¹⁻¹⁴ e atingir 50% por transferência em mulheres com menos de 35 anos.¹⁵⁻¹⁷

A criopreservação de oócitos por vitrificação evoluiu bastante nos últimos anos, deixando de ser considerada experimental.¹⁸

Até 2009 nasceram mais de 900 crianças a partir de oócitos criopreservados, sem aumento do risco de anomalias congênitas.^{19,20}

Embora eficaz, o congelamento de oócitos e embriões exige o uso da tecnologia de fertilização *in vitro* e cultura de embriões, uso de medicação indutora de ovulação, monitoramento da ovulação, equipamentos e laboratório sofisticados e equipe treinada. Não restauram a função ovariana, mas dão chances de se obterem gestações futuramente. No caso do congelamento de embriões, existem questões éticas potenciais futuras, caso ocorra o falecimento da paciente ou separação do casal. Só se aplicam às mulheres no menacme, com função ovariana estabelecida, não podendo ser utilizadas em crianças, e exige em torno de 15 a 20 dias antes do tratamento oncológico.

Criopreservação de tecido ovariano

O congelamento de tecido ovariano retirado da paciente antes do início do tratamento e posterior autotransplante é técnica promissora, em evolução, e necessita de pesquisa adicional. Já foi realizada com sucesso em diversas espécies animais.²¹ Foi realizada em humanos pela primeira vez em 1996, em paciente que já havia sido submetida à quimioterapia. São relatados casos e pequenas séries desde então, com o

reimplante do tecido ovariano no local original (ortotópico)^{22,23} ou em localizações diversas, como parede abdominal ou antebraço.^{24,25}

Foram relatados alguns casos com retorno da função ovariana após o transplante do tecido e outros em que foi possível a aspiração de oócitos após estimulação do ovário implantado em antebraço ou abdome. Em 2004, na Bélgica, foi descrita a primeira gestação espontânea após transplante ortotópico.²⁶

A relação entre essa gestação e o transplante do tecido criopreservado foi colocada em dúvida logo após a sua publicação.²⁷ O debate foi retomado em 2012, após reanálise dos prontuários e de sinais de ovulação no tecido ovariano que restou na paciente. Foi questionado se a gravidez havia resultado do tecido transplantado ou desse tecido ovariano residual.²⁸⁻³⁰

A função ovariana residual antes do transplante, que poderia levar à gestação espontânea, é questão recorrente quando se discutem os relatos de gestação.^{31,32}

Outros relatos de gestação, incluindo um nascimento após o reimplante de tecido ovariano em paciente submetida à ooforectomia bilateral por abscessos ovarianos, confirmam a sua eficácia.³³

Estima-se que 24 nascimentos tenham ocorrido após o transplante de ovários criopreservados, nenhum ainda no Brasil.³²⁻³⁴ Mais quatro gestações estão em evolução, tendo ocorrido até então mais de 60 casos, em três centros europeus.³⁵ Diversos centros em todo o mundo realizam esse procedimento com resultados positivos;³⁶ e ainda existem pacientes com câncer que têm fragmentos de tecido ovariano criopreservado aguardando o término do tratamento e a liberação dos oncologistas para a recolocação do mesmo no organismo.

Persistem diversas dúvidas relacionadas ao procedimento, que ainda motivam a realização de diversos estudos na área, tais como: quantidade de tecido a ser criopreservado; melhor técnica de criopreservação; riscos de transplantar células malignas; melhor local para o transplante; técnicas para reduzir a isquemia tecidual e melhorar a implantação e função do tecido ovariano; quanto tempo a função ovariana será mantida; quanto tempo o tecido pode permanecer criopreservado; qual a probabilidade de se conseguir uma gestação.

Os fragmentos de tecido ovariano são obtidos por videolaparoscopia, cirurgia minimamente invasiva, bem estabelecida e com baixos índices de morbimortalidade. Geralmente a recuperação pós-operatória é rápida e a paciente é encaminhada para início da quimioterapia. São retiradas amostras de tecido,

que são levadas ao laboratório para a realização do processo de criopreservação. É proposta a retirada e o congelamento de um ovário inteiro;^{37,38} contudo, esse tipo de procedimento pode comprometer a fertilidade caso o tratamento do câncer não cause falência ovariana. Além disso, o congelamento do ovário inteiro é mais difícil, pelo número de células envolvidas e a dificuldade de penetração dos crioprotetores. Atualmente, o que se tem feito é a criopreservação de fragmentos do córtex ovariano, que pode ser transplantado de volta ao corpo da paciente após a recuperação e restabelecimento da saúde da mesma após o tratamento do câncer.^{6,34}

O padrão-ouro para a criopreservação de tecido ovariano tem sido o congelamento lento. Entretanto, o método de vitrificação tem ganhado popularidade, em virtude dos seus bons resultados obtidos com oócitos e embriões.³⁹⁻⁴² O período pelo qual o tecido ovariano permanece criopreservado parece não interferir na eficácia do método ou nos resultados. Os danos causados pelo processo de criopreservação em até 30 dias parecem se manter após 180 dias ou mais.⁴³

Os nascidos vivos até o momento foram obtidos a partir de criopreservação de tecido ovariano pelo congelamento lento. O congelamento lento possui como principal característica a utilização da curva de congelamento, que reduz gradualmente a temperatura. Geralmente utiliza-se uma curva de 0,3°C por minuto dependendo do material a ser criopreservado. Para se obter equilíbrio entre os diversos elementos celulares, concentrações baixas de crioprotetores são utilizadas na tentativa de favorecer a não formação de cristais de gelo intracelular.⁴⁴ No entanto, essas concentrações podem não ser capazes de eliminar toda a água do interior do material, formando, assim, cristais de gelo, que poderão causar danos celulares.

A formação de gelo acontece quando o efluxo da água intracelular não ocorre de modo eficiente, impossibilitando a desidratação celular adequada. Neste caso, a água que permanece no interior da célula congela, formando os cristais de gelo. A formação desses cristais precisa ser prevenida por meio da remoção da maior quantidade de água intracelular possível, o que ocorre quando o resfriamento é suficientemente lento, na tentativa de evitar a injúria celular. A formação de cristais de gelo, o choque osmótico e a toxicidade dos crioprotetores limitam o sucesso da criopreservação, pois afetam a sobrevivência e alteram a funcionalidade dos folículos ova-

rianos após o procedimento de criopreservação do tecido ovariano.

Com o objetivo de minimizar essas questões, o método de vitrificação vem ganhando mais atenção e sendo testado, pois age de maneira rápida a baixíssimas temperaturas, além de transformar o líquido de dentro da célula em estágio semelhante ao do vidro.

Atualmente a vitrificação é técnica amplamente usada para o congelamento de oócitos, embriões e tecido ovariano. Contudo, trata-se de técnica que requer altas concentrações de agentes crioprotetores e alta velocidade durante o congelamento. Essa alta concentração dos crioprotetores pode induzir toxicidade celular e causar trauma osmótico.⁴⁵ Diante disso, ainda existem muitas especulações a respeito de qual seria a técnica mais adequada para ser usada rotineiramente.

Quando se trata de tecido ovariano, muitos esforços têm sido feitos no sentido de comparar o congelamento lento com a vitrificação. Os resultados ainda são controversos, reflexos de tamanhos variados de tecido criopreservado, uso de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores e heterogeneidade do tecido folicular, que podem favorecer o método de congelamento lento⁴⁶⁻⁴⁸ ou a vitrificação⁴⁹ ou considerar que são equivalentes em eficácia.^{50,51}

A técnica de criopreservação de tecido ovariano tem sido vista como tratamento promissor, visto que, em vários animais, como primatas⁵² e humanos, tem apresentado bons resultados,⁵²⁻⁵⁴ já tendo sido reportados atualmente 24 nascidos vivos no mundo após congelamento de tecido ovariano e posterior autotransplante.^{6,32,34,55}

Contudo, atualmente, ainda existem obstáculos em relação ao autotransplante de tecido ovariano criopreservado, devido a fatores como lesão isquêmica, assim como danos causados pelo processo durante o congelamento lento. A maior preocupação em investir no autotransplante é a reinserção de células malignas de volta às pacientes após o tratamento de câncer.⁵⁶ Ao considerar essa possibilidade, seria recomendável a maturação de folículos *in vitro* após a criopreservação do tecido ovariano. Essa técnica, porém, ainda é considerada bastante experimental. A magnitude do risco de reinserção de células malignas é desconhecida, não tendo sido relatado algum caso em humanos. Têm sido desenvolvidas técnicas para se identificarem células malignas no tecido, utilizando imuno-histoquímica e reação em cadeia de polimerase (PCR). Recomenda-se, atualmente, evitar

o retransplante em pacientes com alto risco de apresentarem metástase ovariana.³

Para evitar totalmente esse risco, a maturação dos folículos *in vitro* e a fertilização em laboratório poderiam ser boa alternativa;⁴ além disso, a alternativa para se evitar o risco de recidiva constitui-se no transplante de folículos isolados, que após o descongelamento são transplantados em suspensão, o que tem mostrado bons resultados e até nascidos vivos em experimentos com camundongos.⁵⁷ Estudos com xenotransplante mostram que folículos humanos isolados após transplantados são capazes de sobreviver e crescer.⁵⁸

Muitas dúvidas ainda existem em relação ao melhor local para o retransplante. Já foram colocados fragmentos de tecido ovariano no antebraço, parede abdominal e torácica ou ortotópica. Em situações de retransplante fora da superfície ovariana já se conseguiu, com estímulo com gonadotrofinas, o crescimento folicular, captação de oócitos e produção de embriões após fertilização *in vitro*, mas ainda não foi obtida gravidez. Existe dificuldade para o crescimento folicular que não atinge o diâmetro habitual pré-ovulatório.⁵⁹

A tendência tem sido o transplante do tecido sobre a superfície ovariana restante para permitir a gestação espontânea ou para uma bolsa de peritônio feita na cavidade pélvica, ambos por videolaparoscopia. Existem, entretanto, dificuldades técnicas importantes a serem estudadas, incluindo a necessidade de reconstituição vascular do tecido ovariano ou estímulo da angiogênese no local receptor. Talvez o maior obstáculo à função ovariana seja a isquemia que ocorre até que o ovário esteja adequadamente implantado. A maior parte das perdas de conteúdo folicular acontece nesse período. Estudos têm sido feitos com o uso de componentes potencialmente capazes de estimular a angiogênese e facilitar a implantação.⁶⁰ Mesmo com as dificuldades, existem vários registros de nascidos vivos após criopreservação do tecido ovariano e seu retransplante ortotópico.

Maturação *in vitro* de folículos e fertilização *in vitro*

A técnica consiste no isolamento de folículos pré-antrais a partir do córtex do tecido ovariano e a maturação *in vitro* dos folículos isolados, até que os mesmos atinjam o estágio antral e possam ser obtidos oócitos maduros a partir deles, que poderiam ser fertilizados em laboratório com o sêmen do companheiro.

Essa técnica pode descartar o risco teórico da recidiva da doença em caso de retransplante, principalmente diante de câncer ovariano,⁴ embora não existam estudos que reportem esse fato.

A maturação folicular *in vitro* ainda é considerada experimental. O desenvolvimento das condições ideais de cultivo folicular é dos maiores desafios da tecnologia da reprodução. É necessária mais compreensão dos requisitos fisiológicos dos oócitos, das células da granulosa e da teca e até mesmo das células estromais. A fisiologia que envolve o desenvolvimento folicular é complexa e ainda não compreendida integralmente.⁶¹

Existem resultados positivos em experimentos com roedores,⁶⁰ primatas não humanos (macacos *Rhesus*)^{62,63} e humanos.⁶⁴ São descritos nascidos vivos de camundongos férteis obtidos a partir de oócitos que vieram de folículos maturados *in vitro*⁶⁵ e embriões de primatas não humanos foram produzidos com sucesso.⁶⁶

São ainda necessários extensos estudos acerca da foliculogênese e da técnica de maturação para que esta possa ser de fato estabelecida rotineiramente e oferecida às pacientes.

Uso de análogos do GnRH

A supressão ovariana temporária com o uso de análogos do GnRH durante a quimioterapia tem sido proposta para prevenir falência ovariana prematura, entretanto, o seu valor é controverso. A razão para uso dessa técnica consiste na maior resistência dos ovários pré-puberais à quimioterapia observada em animais e em humanos.^{67,68} O mecanismo de ação desse medicamento ainda não está totalmente definido, já que o principal efeito conhecido do bloqueio hipotalâmico seria sobre a coorte ovulatória e não sobre os folículos primordiais, que são os principais componentes da reserva ovariana. Não estão demonstradas taxas de amenorreia diferentes em pacientes que usaram o análogo do GnRH^{69,70} e seu papel real aguarda novos estudos.

CONCLUSÕES

A oncofertilidade (área de preservação da fertilidade em pacientes com câncer) apresenta grandes avanços e ótimas perspectivas. Devem ser envol-

vidos, de forma multidisciplinar, oncologistas, hematologistas, mastologistas, especialistas em Medicina reprodutiva, urologistas, embriologistas e psicólogos para prestarem atendimento rápido, eficiente e acolhedor às pacientes. A opção pelo uso de técnicas experimentais, especialmente quando oferecidas para pacientes em situações de fragilidade emocional, deve ser cautelosa. Vários fatores, especialmente idade da paciente, tipo histológico do tumor, estadiamento da doença, regimes de quimioterapia e/ou radioterapia e prognóstico do tratamento devem ser exaustivamente discutidos⁷ com a paciente e seus familiares, que devem receber apoio psicológico adequado e informação correta sobre as reais chances de obtenção de gestação futura com as técnicas estabelecidas e as limitações das técnicas experimentais.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. [Citado em 2012 set. 09]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>
2. Ajala T, Rafi J, Larsen-Disney P, Howell R. Fertility preservation for cancer patients: a review. *Obstet. Gynecol Int.* 2010; ID 160386, 9 pages. [Citado em 2012 set. 09]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/160386>
3. Jeruss JS, Woodruff TK. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360:902-11.
4. Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, et al. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010; 16(4): 395-414.
5. Niemasik EE, Letourneau J, Dohan D, Katz A, Melisko M, Rugo H, et al. Patient perceptions of reproductive health counseling at the time of cancer diagnosis: a qualitative study of female California cancer survivors. *J Cancer Surviv.* 2012 Sep;6(3):324-32.
6. Donnez J, Kim SS. Principles and practice of fertility preservation. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press-Medicine; 2011.
7. Rosa e Silva ACJ. Preservação de Fertilidade. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2006; 28(6):365-72.
8. ISFP Practice Committee – International Society for Fertility Preservation Practice Committee. Kim SS, Donnez J, Barri P, Pellicer A, Patrizi P, Walks ZR, et al. Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29:465-8.
9. Rosen A, Rodriguez-Wallberg KA, Rosenzweig I. Psychosocial distress in young cancer survivors. *Semin Oncol Nurs.* 2009; 25(4):268-77.
10. Azvolinsky A. Preserving Fertility in Cancer Patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 2012; 104(10):724-5.
11. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2006; 86(1):70-80.
12. Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril.* 2010; 93(2):391-6.
13. Teng XM, Li KM, Wang Y, Pan JP, Yin P, Liang SS, et al. Vitrification of oocytes for in vitro fertilization and embryo transfer. *Zhonghua Nan KeXue.* 2012; 18(6):531-3.
14. Konc J, Kanyo K, Kriston R, Zeke J, Cseh S. Freezing of oocytes and its effect on the displacement of the meiotic spindle: short communication. *Scientific World J.* 2012; 2012:785421.
15. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, et al. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod.* 1998; 13(3):161-74.
16. Check JH, Katsoff B, Wilson C, Choe JK, Brasile D. Pregnancy outcome following fresh vs frozen embryo transfer into gestational carriers using a simplified slow freeze protocol. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012; 39(1):23-4.
17. Valle M, Guimarães F, Cavagnoli M, Sampaio M, Geber S. Birth of normal infants after transfer of embryos that were twice vitrified/warmed at cleavage stages: Report of two cases. *Cryobiology.* 2012 Dec; 65(3):332-4.
18. The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril.* 2013; 99(1):37-43.
19. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod BioMed Online.* 2009; 18(6):769-76.
20. Cobo A, Garcia-Velasco J, Domingo J, Remohi 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.
21. Souza JHK, Prates LFV, Moreira AC, Sampaio M, Geber S. Folliculogenesis in transplanted rat ovaries after freezing/thawing. *JBRA Assist.Reprod.* 2010; 14(2):36-40.
22. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N Engl J Med.* 2000; 342(25):1919.
23. Tryde Schmidt KL, Yding Andersen C, Starup J, Loft A, Byskov AG, Nyboe Andersen A. Orthotopic autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to a woman cured of cancer - follicular growth, steroid production and oocyte retrieval. *Reprod Biomed Online.* 2004; 8:448-53.
24. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA.* 2001; 286(12):1490-3.
25. Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril.* 2003; 80(1):193-8.
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; 364:1405-10.

27. Oktay K, Tilly J. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation. *Lancet*. 2004; 364:2091-2.
28. Hubinont C, Debieve F, Biard JM, Bernard P. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue transplantation. *Lancet*. 2012; 380(9837):106.
29. J Donnez, MM Dolmans, D Demylle, P Jadoul, C Pirard, J Squifflet, *et al*. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue transplantation. Authors' reply – Correspondence. *Lancet*. 2012; 380(9837):107.
30. Spencer S, Horton R. Livebirth after cryopreserved ovarian tissue transplantation. Editors' reply – Correspondence. *Lancet*. 2012; 380(9837):107.
31. Steirteghem AV. Lack of ethical approval and omission of experimental evidence. *Hum Reprod*. 2012; 27(7):1881.
32. 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.
33. Donnez J, Jadoul P, Pirard C, Hutchings G, Demylle D, Squifflet J, *et al*. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril*. 2012; 98(3):720-5.
34. Donnez J, Dolmans MM. Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br J Haematol*. 2011; 154(2):175-84.
35. Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez-Serrano M, Schmidt KT, *et al*. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*. 2013; 99(6):1503-43.
36. Greve T, Schmidt KT, Kristensen SG, Ernerst E, Andersen CY. Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue. *Fertil Steril*. 2012; 97(6):1394-8.
37. Zhang JM, Sheng Y, Cao YZ, Wang HY, Chen ZJ. Effects of cooling rates and ice-seeding temperatures on the cryopreservation of whole ovaries. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28(7):627-33.
38. Milenkovic M, Diaz-Garcia C, Wallin A, Brännström M. Viability and function of the cryopreserved whole rat ovary: comparison between slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2012; 97(5):1176-82.
39. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005; 3:300-8.
40. Cobo A, Domingo J, Perez S, Crespo J, Remohi J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2008; 5:268-73.
41. Abdelhafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010; 2:209-22.
42. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod*. 2010; 9:2239-46.
43. Campos JR, Rosa-e-Silva JC, Carvalho BR, Vireque AA, Silva-de-Sá MF, Rosa-e-Silva AC. Cryopreservation time does not decrease follicular viability in ovarian tissue frozen for fertility preservation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(12):2093-7.
44. Maltaris T, Dimmler A, Müller A, Hoffmann I, Beckmann MW, Ditrach R. Comparison of two freezing protocols in an open freezing system for cryopreservation of rat ovarian tissue. *J Obstet Gynaecol Res*. 2006; 32(3):273-9.
45. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*. 1990; 3:247-68.
46. Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, Bonetti S, Brevini TA, Ragni G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*. 2006; 85(1):1150-6.
47. Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Kreienberg R, Woriedh M, *et al*. Human ovarian tissue vitrification versus conventional freezing: morphological, endocrinological, and molecular biological evaluation. *Reproduction*. 2009; 2:319-27.
48. Rahimi G, Isachenko V, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawaroth F, *et al*. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Cryo Letters*. 2009; 4:300-9.
49. Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, Gosden R. Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril*. 2010; 6:2191-6.
50. Yeoman RR, Wolf DP, Lee DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. *Fertil Steril*. 2005; 4(1):1248-54.
51. Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction*. 2009; 3:527-35.
52. 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(9):2461-72.
53. Gosden R, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to ooporectomized sheep by ovarian autographs stored at -196°C. *Hum Reprod*. 1994; 9:597-603.
54. Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(6):729-34.
55. Ernest E, Bergholdt S, Jorgensen JS, Andersen CY. The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010; 25(5):1280-1.
56. Sonmez M, Shamonki MI, Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation: benefits and risks. *Cell Tissue Res*. 2005; 1:125-32.
57. Carroll J, Gosden RG. Transplantation of frozen-thawed mouse primordial follicles. *Hum Reprod*. 1993; 8:1163-7.
58. Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Gadisseux E, Guiot Y, Yuan WY, Torre A, *et al*. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction*. 2007; 134:253-62.
59. Lee DM, Ting A, Thomas C, Bishop C, Xu F. Heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in macaques: assessment of follicular function, embryonic development and a novel microbubble assay for blood flow. Abstracts of the 68th American Society for Reproductive Medicine. San Diego/CA, USA: ASRM; Oct. 2012.

60. O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in-vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod.* 2003; 68:1682-6.
61. Telfer EE, Zelinski MB. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril.* 2013; 99(6):1523-33.
62. 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.
63. 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. *Reproduction.* 2010; 140(5):685-97.
64. Xu M, Barrett SL, West-Farrell E, Kondapalli LA, Kiesewetter SE, Shea LD, *et al.* In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth. *Hum Reprod.* 2009; 24(10):2531-40.
65. Xu M, Kreeger PK, Shea LD, Woodruff TK. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng.* 2006; 12:2739-46.
66. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barret SL, Zelinski MB, *et al.* Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotropins, oxygen and fetuin. *Hum Reprod.* 2011; 26(5):1061-72.
67. Lemos CN, Reis FM, Pena GN, Silveira LC, Camargos AF. Assessment of fertility protection and ovarian reserve with GnRH antagonist in rats undergoing chemotherapy with cyclophosphamide. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 18:8-51.
68. Chen H, Li J, Cui T, Hu L. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy induced premature ovarian failure in premenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; (11):CD008018.
69. Copland SC, Clowse M. Use of GnRH agonists for prevention of chemotherapy-induced gonadotoxicity. In: Donnez J, Kim SS. *Principles and practice of fertility preservation.* Cambridge: Cambridge University Press - Medicine; 2011. p.239-49.
70. Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, Cox CE, Lacevic M, Gross-King M, *et al.* Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012; 30(5):533-8.