

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Diatermia ovariana guiada por ecografia transvaginal utilizando
animais como modelo experimental**

Anita Mylius Pimentel

Orientador: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre, novembro de 2012

Dedicatória

Minha tese de doutorado é especialmente dedicada a minha mãe Sandra e ao meu marido Marcelo, os dois grandes amores da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, por tudo, pela vida.

A minha mãe, Sandra, pelo apoio em tudo, meu exemplo de pessoa, mãe, mulher, guerreira.

Ao meu marido, Marcelo, pelo apoio constante, pelo orgulho que tem de mim e por me apoiar muito em tudo que eu faço.

A professora Helena von Eye Corleta pela oportunidade, orientação e disposição. Pelos ensinamentos e incentivo. Pessoa que tenho grande admiração.

Ao professor Edison Capp pela coorientação e auxílio em todos esses anos de doutorado.

À Profa. Ilma Simoni Brum da Silva pelos ensinamentos e constante apoio.

Aos colegas do LaGOM e do GERAR pelo apoio, amizade, companheirismo. A Ana Paula Kussler por “segurar as pontas” no Gerar nas minhas ausências pela tese. Ao Diego Alcoba, sempre ajudando nas pequenas coisas que fazem uma grande diferença, sem palavras pela amizade. A Ana Paula Santin e Ana Luiza Berwanger da Silva pelo grande auxílio na análise do HAM.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal, em especial a Médica Veterinária Fabíola Schons Meyer, que através da sua dedicação, colaborou muito para que desse certo o experimento com as ovelhas. Sempre com muito carinho e dedicação a todos animais.

Aos colegas, Médicos Veterinários, Dra. Daniela dos Santos Brum, Dr. Fábio Gallas Leivas e Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro pelo auxílio no experimento com as vacas. Foram todos de extrema importância para a realização deste trabalho. Sem vocês, eu não teria terminado essa tese.

Á Dra. Lucia Kliemann pelo apoio na análise histológica do experimento, pelos ensinamentos.

Á colega Elise Hill pela grande produção das fotos utilizadas nesse trabalho.

Aos animais (ovelhas e vacas) que colaboraram para que esse experimento desse certo e possa, no futuro, ser utilizado com segurança nos humanos.

A todas aquelas pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu pudesse estar onde estou hoje. Sem todos vocês eu não teria terminado essa tese.

MUITO OBRIGADA!

Sumário

Agradecimentos	4
Lista de abreviaturas.....	7
Resumo	8
ABSTRACT	10
Introdução	12
Revisão bibliográfica	16
Síndrome dos Ovários Policísticos	16
Anovulação.....	19
Tratamentos da infertilidade na SOP	19
Eletrocautério/Eletrocirurgia.....	28
Riscos da diatermia ovariana.....	31
Cauterização ovariana com modelos experimentais	34
Objetivos	36
Referências bibliográficas	37
Artigo 1 - Transvaginal ultrasound ovarian diathermy: sheep as an experimental model	47
Artigo 2 - Adequacy of ovarian diathermy under ultrasound control: an experimental model	64
Considerações finais.....	85

Lista de Abreviaturas

CC – citrato de clomifeno

DVLPC – diatermia ovariana videolaparoscópica

ECR – estudos clínicos randomizados

FSH – hormônio folículo estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

hMG – gonadotrofina humana menopausada

LH – hormônio luteinizante

LOD – diatermia ovariana laparoscópica

LOMNI – *laparoscopic ovarian multi-needle intervention*

OR – *odds ratio* (razão de possibilidades)

RCO – ressecção em cunha do ovário

SHBG – globulina ligadora de hormônios esteroides

SHO – Síndrome do hiperestímulo ovariano

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

TVOD – *transvaginal ovarian drilling*

VLPC - videolaparoscopia

Resumo

Introdução: A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) afeta 5 a 10% de mulheres em idade reprodutiva. O tratamento da infertilidade de causa anovulatória em pacientes com SOP envolve a indução da ovulação, sendo o citrato de clomifeno (CC) a medicação de primeira escolha. Nos casos resistentes ao CC, a segunda linha de tratamento pode ser medicamentosa (gonadotrofinas) ou cirúrgica (cauterização ou diatermia ovariana), realizada por videolaparoscopia (VLPC). A indução com gonadotrofinas aumenta muito o risco de multigestação, o que não ocorre com a diatermia ovariana, que restaura a ovulação fisiológica (monovulação). A ecografia transvaginal é um procedimento simples, menos invasivo do que a VLPC, que permite a punção ovariana através do fórnice vaginal. Objetivos: desenvolver uma técnica minimamente invasiva de cauterização ovariana monopolar guiada por ecografia transvaginal, utilizando animais (ovelhas e vacas) como modelo experimental. Métodos: em um primeiro experimento foram utilizadas ovelhas (15 Corriedale e 2 Suffolk) e no segundo experimento foram utilizadas 11 vacas Angus, todos animais em idade reprodutiva e com integridade ovariana anatômica e funcional. Para a cauterização monopolar foi utilizado o eletrocautério Valleylab Force FX e uma agulha especialmente desenvolvida para esse fim. Os animais tiveram os ovários cauterizados em 4 pontos cada e foram abatidos 2 dias após para coleta dos ovários e inspeção do trajeto da agulha. Resultados: Nas ovelhas, dos 34

ovários cauterizados, apenas 3 apresentaram a lesão característica. Dos 22 ovários cauterizados nas vacas, 20 apresentaram a lesão característica, tanto macro quando microscopicamente. Nas duas espécies animais, não houve lesões no trajeto da agulha. Conclusão: A cauterização ovariana se mostrou segura nos dois modelos experimentais, nenhum animal apresentou lesões térmicas ou pela punção no trajeto da agulha. Nas vacas, a identificação ecográfica e a cauterização, além de segura, foram efetivas. A eficiência e segurança dessa técnica devem ser estudadas em mulheres com anovulação por SOP.

Palavras-chave: diatermia ovariana, ecografia transvaginal, síndrome dos ovários policísticos, modelo experimental.

Abstract

Introduction: The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) affects 5-10% of women at reproductive age. Treatment of anovulatory infertility in patients with PCOS involves the induction of ovulation, with clomiphene citrate (CC) the drug of first choice. In cases resistant to CC, the second line of treatment can be medicated (gonadotropins) or surgery (ovarian diathermy or cautery), performed by laparoscopic video (LPCV). The induction with gonadotrophins increases the risk of multi pregnancy, which does not occur with ovarian diathermy, which restores physiological ovulation (monovulation). The transvaginal ultrasound is a simple procedure, less invasive than the LPCV allowing ovarian puncture through the vaginal fornix. Objectives: To develop a minimally invasive technique of monopolar ovarian cauterization guided by transvaginal ultrasound, using animals (sheep and cattle) as an experimental model. Methods: In a first experiment were used sheep (15 Corriedale and 2 Suffolk). In the second experiment were used 11 cows Angus, all animals at reproductive age with anatomic and functional ovarian integrity. For cauterized were used Valleylab Force FX electrocautery and a needle specially developed for this purpose. The animals had ovaries cauterized at 4 points each and were slaughtered 2 days after for collection of the ovaries and inspection of the needle path. Results: In sheep, from the 34 ovaries cauterized, only 3 showed the characteristic lesion. From the 22 ovaries cauterized in cows, 20 had the characteristic lesion, both macro and microscopically. In both species, there were no

injuries in the path of the needle. Conclusion: The ovarian cauterization proved safe in experimental models, no animal showed thermal injury or puncture in the path of the needle. In cows, the sonographic identification and cauterization, beyond safe, were effective. The efficiency and safety of this technique should be studied in women with SOP anovulatory.

Keywords: ovarian diathermy, transvaginal ultrasound, polycystic ovary syndrome, experimental model.

Introdução

A Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é a desordem endócrino-metabólica, que mais frequentemente afeta mulheres em idade reprodutiva, com a prevalência de 5 a 10%. Esta síndrome se caracteriza por irregularidade menstrual ou anovulação, hiperandrogenismo clínico e/ou bioquímico, assim como imagem ecográfica ovariana demonstrando vários pequenos folículos ovarianos (1).

O tratamento da infertilidade de causa anovulatória na paciente com SOP envolve a indução da ovulação. Para que ocorra a ovulação além de medidas gerais como redução de peso e atividade física regular são utilizadas medicações indutoras da ovulação.

O fármaco mais comumente utilizado é o citrato de clomifene (CC). Desde o final da década de 90, a metformina, fármaco que diminui a resistência à insulina, também tem mostrado bons índices de ovulação quando utilizado isoladamente ou em associação com o CC nos casos de SOP (2). Recentemente, Legro e cols. observaram taxas de gestação de 39% em mulheres com SOP e uso de CC, de 21% com metformina, e quando a metformina e o CC foram usados em associação as taxas de gestação foram de 46% (3).

A complicação do uso de CC em relação à metformina é o aumento das taxas de gestação múltipla (3, 4). Entretanto em torno de 20% das mulheres com SOP não ovulam com estes tratamentos mais simples e de menor custo. As pacientes resistentes ao CC têm como opção a indução cirúrgica da ovulação ou a indução com gonadotrofinas. As gonadotrofinas além de serem de uso parenteral diário são de difícil manejo, e com elas raramente se alcança a ovulação única. Conseqüentemente seu principal efeito indesejável é a alta incidência de gestação múltipla além da ocorrência de hiperestímulo ovariano e o custo elevado dessa medicação (5).

O primeiro tratamento cirúrgico para a SOP, proposto por Stein and Leventhal em 1935, foi a ressecção em cunha do ovário (6). Esta técnica, mesmo tornando os ciclos ovulatórios, foi abandonada devido a alta probabilidade de provocar aderências pélvicas (7). Atualmente, este princípio pioneiro de ressecção em cunha do ovário foi substituído pelo *ovarian drilling* (perfuração ovariana ou diatermia ovariana), que é realizado por via laparoscópica (8). A versão moderna da ressecção em cunha emprega eletrocoagulação monopolar ou punção da cápsula ovariana com laser em 4 a 10 pontos em cada ovário com profundidade de 4 a 10 mm (9).

Análise de 6 estudos clínicos randomizados (ECR) que compararam o tratamento com gonadotrofinas à diatermia ovariana em pacientes resistentes ao CC concluiu que 6 a 12 meses após a cauterização ovariana as taxas de gestação foram similares a 3 a 6 ciclos de indução com gonadotrofinas. A ovulação monofolicular é principal benefício da diatermia ovariana, com significativa redução das gestações múltiplas ocasionadas pelo tratamento com gonadotrofinas (10).

A diatermia ovariana videolaparoscópica (DVLPC) é realizada em caráter ambulatorial, induz menos aderências do que a ressecção em cunha do ovário e, pelo menos temporariamente, torna os ciclos ovulatórios. Entretanto a presença de aderências após a cirurgia laparoscópica já foi relatada por alguns autores (9, 11-13). Mesmo não estando claro se as aderências provocadas induzem a infertilidade, seriam desejável procedimentos ainda menos invasivos do que a VLPC. Foram descritas técnicas menos invasivas como a minilaparoscopia com anestesia local e a fertiloscopia (14, 15), no intuito de diminuir a formação de aderências.

Zhu e cols., em 2006, desenvolveram a cauterização do estroma ovariano com laser por via transvaginal, mediante utilização de fibra ótica e agulha de punção por ultrassonografia transvaginal acoplada ao Yag-Laser (16). A incidência de aderências pós-operatórias parece ser maior com cauterização a laser do que com eletrocautério (17).

A ecografia transvaginal é um procedimento simples, não invasivo que permite o acesso aos ovários. Uma agulha acoplada ao transdutor transvaginal com guia possibilita a coleta do líquido folicular contendo os oócitos para uma fertilização *in vitro* (18). A punção folicular por via transvaginal é realizada desde 1988 (19). Atualmente é o padrão ouro para coleta de oócitos em programas de reprodução assistida. Estudo prospectivo sobre complicações da coleta de óvulos por via transvaginal demonstrou em mais de 1000 punções que a técnica é muito segura (20).

A punção ovariana por via transvaginal com uma agulha especialmente desenvolvida para realizar a cauterização dos ovários é uma técnica simples, que

pode ser realizada em caráter ambulatorial apenas com sedação. Entretanto, a segurança da cauterização ovariana por esta via nunca foi descrita.

Revisão bibliográfica

Síndrome dos Ovários Policísticos

A SOP é uma desordem complexa e heterogênea que afeta 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. Caracteriza-se pela evidência clínica ou bioquímica de hiperandrogenismo, anovulação crônica ou irregularidades menstruais, ovários policísticos à ecografia, e está associada à infertilidade, obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo II. Sendo uma síndrome, nenhum critério isolado é suficiente para obtenção do diagnóstico (21).

Em 2003, um consenso entre a Sociedade Européia de Reprodução e Embriologia Humana (ESHRE) e a Sociedade Americana para Medicina Reprodutiva (ASRM), em Roterdam, Holanda, definiu os critérios diagnósticos da SOP e alguns fatores de risco para outras doenças, relacionados com a síndrome. Neste consenso, definiu-se SOP como uma síndrome de disfunção ovariana que apresenta no mínimo dois dos três critérios a seguir: oligomenorréia ou anovulação; sinais clínicos e/ou bioquímicos de hiperandrogenismo e ovários policísticos à ecografia, devendo ser excluídas causas secundárias como hiperplasia adrenal congênita, tumores andrógeno-secretóres e síndrome de Cushing (22, 23).

A anovulação crônica é manifestada por oligomenorréia (menos de nove períodos menstruais por ano) ou amenorréia, produzindo sangramento uterino disfuncional e diminuição da fertilidade.

O hirsutismo é geralmente o primeiro sinal clínico de hiperandrogenismo, embora sua caracterização, às vezes, seja dificultada pelas diferenças raciais, e também pela falta de utilização de escores padronizados. O Escore de Ferriman e Gallwey é um método semiquantitativo simples para avaliação da distribuição e intensidade do excesso de pelos (24). A acne é outro indicador de hiperandrogenismo, entretanto existem estudos que são discordantes quanto às dosagens séricas de androgênios em pacientes com acne (25). A dificuldade em definir o hiperandrogenismo, através de dosagens séricas, ocorre devido à inacurácia e a variabilidade de métodos comumente empregados. Apesar destas limitações, dosagens elevadas de androstenediona, testosterona (total ou livre), são evidências bioquímicas de hiperandrogenismo (5).

A imagem ultrasonográfica característica da SOP é a de ovários com tamanho aumentado, contendo vários pequenos folículos em volta do córtex ovariano como um colar de pérolas, com a presença de um aumento na luminosidade do estroma ecogênico (26).

A exata fisiopatologia da SOP permanece incerta. Mulheres com SOP apresentam um aumento da amplitude e da frequência dos pulsos de LH (hormônio luteinizante) e uma concentração normal ou baixa de FSH (hormônio folículo estimulante), quando comparadas a mulheres normais. A resistência à insulina e a hiperinsulinemia compensatória estão envolvidas na secreção anormal de LH.

Parece haver uma hipersensibilidade das células da teca a ação da insulina, defeito intrínseco ao estímulo crônico pelo LH, que pode ocorrer com ou sem hiperinsulinemia (27).

O menor tônus de FSH em relação ao LH permite o crescimento dos folículos ovarianos, porém não a ponto de maturação e ovulação, e o LH promove uma hiperplasia das células tecais ovarianas que se dispõem em torno desses folículos. Esses folículos estão sujeitos a atresia e recrutamento de outros folículos com mesmo potencial deficiente de crescimento, porém com produção constante de esteróides e manutenção da alteração na pulsatilidade da secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) com conseqüente inadequação dos níveis de gonadotrofinas (5).

O hiperandrogenismo clínico ou bioquímico na SOP é secundário a diversos fatores. A maior produção de androstenediona e testosterona pelas células da teca, uma maior conversão da androstenediona em testosterona nos tecidos extra-ovarianos, redução dos níveis de SHBG (globulina ligadora de hormônios esteróides), que é produzida no fígado e cuja síntese é controlada por um balanço hormonal, onde a testosterona e a insulina reduzem e o estradiol aumenta sua produção. Em mulheres com SOP, os níveis de SHBG estão reduzidos em aproximadamente 50%, o que permite o aumento dos níveis de esteróides biologicamente ativos. O tônus suprimido de FSH em relação ao LH, e o aumento dos androgênios livres inibem a produção de SHBG, fechando um ciclo vicioso que leva a anovulação e hiperandrogenismo (5).

Anovulação

A infertilidade nas mulheres com SOP é causada pela anovulação. Devido à alta incidência desta síndrome, ela também é a principal etiologia da infertilidade de causa anovulatória.

O diagnóstico de anovulação é mais fácil que o de hiperandrogenismo, devido às manifestações clínicas – oligomenorréia ou amenorréia. Oligomenorréia é definida como menos de nove ciclos menstruais por ano, ou ciclos maiores que 35 dias, amenorréia é a ausência de menstruação por mais de 3 meses, excluída a gestação (28).

Os ovários de mulheres SOP apresentam acúmulo de folículos antrais com 2 a 8 mm de diâmetro. Parece haver uma falha na seleção do folículo dominante e os outros folículos antrais maiores (5 a 8 mm) sofrem uma parada no seu desenvolvimento. Isso ocorre devido aos baixos níveis de FSH, insuficientes no início da fase folicular para estimular a maturação folicular normal. A hipersecreção de androgênios reflete uma anormalidade intrínseca no funcionamento das células da teca. Essa anormalidade gera um ambiente endócrino anormal, alguns autores levantam a hipótese de que a causa dessa anormalidade funcional dos folículos antrais estaria nos estágios iniciais de desenvolvimento de folículos pré-antrais (29).

Tratamentos da infertilidade na SOP

O tratamento da paciente com SOP que deseja gestar visa promover a ovulação da forma mais fisiológica possível, com menor custo e complexidade e,

ainda, com menor risco de gestações múltiplas (30). A simples mudança de hábitos pode resultar em ciclos ovulatórios.

A obesidade, presente em muitas pacientes com SOP, está associada à anovulação (31), perda reprodutiva e complicações tardias da gestação (pré-eclâmpsia, diabetes gestacional) (32). A perda de peso é recomendada como tratamento de primeira linha em mulheres com SOP que desejam engravidar, tendo impacto positivo também para as comorbidades de médio e longo prazo como o diabetes e as doenças cardiovasculares (30). A perda de peso antes da concepção aumenta as taxas de ovulação espontânea e de nascidos vivos em mulheres obesas com ou sem SOP (33).

O CC é atualmente o fármaco de primeira linha na indução da ovulação em pacientes com SOP (21). É uma substância antiestrogênica, de uso por via oral, que promove a liberação do FSH pela glândula pituitária no período de recrutamento e seleção folicular. Há mais de quatro décadas é utilizado para tratamento da anovulação associada à SOP (34). O tratamento com CC restaura a ovulação em 75 a 80% das usuárias (3, 35). Em relação às taxas de gestação, os resultados são controversos, entretanto estudos maiores e com maior tempo de observação indicam taxa de concepção de até 22% por ciclo (36, 37). O uso do CC está associado com uma taxa de gestação múltipla de 5 a 10% (34).

Entretanto, 15 a 20% das mulheres com SOP são resistentes ao CC, ou seja, continuam anovulatórias (38). Os principais fatores associados à resistência ao CC são a obesidade, a hiperandrogenemia e a idade da paciente. Imani e cols. publicaram um nomograma para calcular a chance de ovular após o uso do CC

baseado nestes fatores (39). O tempo de amenorréia e o volume ovariano também podem ser utilizados como preditores de resposta ao CC (40).

A indução da ovulação com CC para SOP apresenta a desvantagem de não tratar a hiperinsulinemia e hiperandrogenismo. Baseado nessas observações, Nestler e cols. (41) postularam que a metformina, fármaco que reduz a hiperinsulinemia, poderia ser efetivo no tratamento da obesidade e na infertilidade em mulheres com SOP. Outros fármacos que melhoram a sensibilidade à insulina também podem melhorar a ovulação, o hiperandrogenismo e as alterações metabólicas das pacientes com SOP (4).

Em 2003, Lord e cols., publicaram os resultados da primeira meta-análise com 13 estudos em que a metformina foi administrada a 543 pacientes, apresentou um OR (*odds ratio*) para ovulação de 3,88 (95% IC 2,25 – 6,69) comparada ao placebo e de 4,41 (95% IC 2,37 - 8,22) para a metformina associado ao CC comparado ao CC isolado (4).

Em 2007, foi publicado o ECR de Legro e cols. comparando três tipos de tratamentos (CC, Metformina e CC + Metformina) quanto a taxas de ovulação, gestação única e múltipla. Os resultados mostraram taxas de ovulação de 49% com CC, de 29% com metformina e de 60% com CC + metformina; quanto à taxa de gestação foi de 24% no grupo CC, 9% no grupo metformina, e 31% no grupo CC + metformina (3). As taxas de gestação múltipla deste ECR foram 6% com CC, 3% no grupo CC + metformina e 0% no grupo metformina. Após este ECR foi publicado o consenso para indução da ovulação na SOP (30) onde o CC aparece como primeira linha de indutor de ovulação, sendo a metformina indicada apenas em pacientes

com SOP obesas e hiperinsulinêmicas. Este assunto ainda suscita algum debate, principalmente porque a metformina induz a ovulação sem elevar as taxa de gestação múltipla (42).

Como segunda linha de tratamento para indução da ovulação em pacientes com SOP, resistentes ou que não gestaram com o CC, estão as gonadotrofinas exógenas e a indução cirúrgica ou diatermia ovariana (30).

A indução com gonadotrofinas nas pacientes resistentes ao CC visa apenas regularizar a função ovariana – induzir a ovulação monofolicular – ou seja, deve ser utilizada a menor dose para atingir este objetivo. O uso é diário e a via de administração é intramuscular ou subcutânea. A resposta ao uso de gonadotrofinas varia muito de paciente para paciente e de ciclo para ciclo, fazendo com que o limite entre a dose de FSH (ou LH/FSH) para que ocorra ovulação monofolicular e o estímulo ovariano seja tênue. Os protocolos para uso de gonadotrofinas nas pacientes com SOP mais utilizados são os seguintes (43):

a) protocolo “*step-up*” no qual se aumenta lenta e gradativamente a dose de gonadotrofinas, até atingir o limiar de estímulo para o recrutamento folicular. Inicia-se com doses baixas de 37,5 a 75 UI e a dose é aumentada em 37,5 UI a cada 5 a 7 dias até haver crescimento folicular ou até atingir 225 UI/dia; este protocolo pode demorar muito tempo até que o limiar de seleção folicular seja atingido, e quando este é atingido, mesmo que se diminua a dose, existe acúmulo de FSH na fase folicular tardia, com risco importante de crescimento multifolicular (43);

b) protocolo “*step down*” tenta mimetizar a variação do FSH no ciclo menstrual

normal; inicia-se com a dose de FSH que atinge o limiar de recrutamento, normalmente 150 UI até algum folículo atingir tamanho maior que 10 mm no exame ecográfico transvaginal, então se reduz a dose, até que 1 ou 2 folículos atinjam estágio pré-ovulatório (43).

Independente do tipo de protocolo de gonadotrofinas utilizado, a monitorização ecográfica do ciclo deve ser rigorosa, quase diária. A identificação do número de folículos maiores que 10 mm se apresenta como preditor do risco de gestações múltiplas. Na maioria dos estudos, quando mais de 3 folículos tiverem diâmetro maior do que 16 mm ao controle ecográfico, o ciclo deve ser cancelado para prevenção de multigestação e hiperestímulo ovariano (44, 45).

A indução com gonadotrofinas com baixas doses resulta em 70% de ovulação monofolicular, com taxa de gestação de 20% sendo 5,7% de gestação múltipla e menos que 1% de síndrome do hiperestímulo ovariano. Nos protocolos clássicos, mais antigos, ocorria 36% de gestação múltipla e 4,6% de hiperestímulo ovariano (46).

Os problemas vinculados ao uso de gonadotrofinas na SOP apresentados são a via de administração, a necessidade de controle ecográfico rigoroso, altas taxas de cancelamento de ciclos (para tentar diminuir hiperestímulo e gestações múltiplas), custo elevado da medicação, a impossibilidade de evitar casos de multigestação e hiperestímulo (30).

O primeiro tratamento cirúrgico para a SOP, proposto por Stein and Leventhal em 1935, foi a ressecção em cunha do ovário (RCO) (6). Eles realizaram a RCO em 7 pacientes retirando aproximadamente 50% a 75% do tecido de cada ovário. A RCO restaurou a ovulação em todas as pacientes e houve duas gestações após a cirurgia. Os pesquisadores sugeriram que a superfície espessa do ovário poderia impedir os folículos de atingirem a superfície e a RCO fornece uma passagem mecânica para os folículos ovularem (6).

Mais tarde, outros trabalhos demonstraram que a RCO restaura a ovulação (80%), entretanto com variação nas taxas de gestação, entre 25% e 86% (47, 48), possivelmente devido à grande incidência de aderências pélvicas (30-100%) (49-51). A RCO, bastante utilizada na época, acabou abandonada por causar severas aderências pélvicas (7, 9, 12, 13). Essas aderências podem diminuir a fertilidade, causando infertilidade secundária a fator tubário e peritoneal (12).

Atualmente, este princípio pioneiro da ressecção em cunha para favorecer a ovulação foi substituído pelo *ovarian drilling* (perfuração ou diatermia ovariana), que é realizado por via laparoscópica. A versão moderna da ressecção em cunha emprega punção ovariana em 4 a 10 pontos em cada ovário com profundidade de 4 a 10 mm (8).

A diatermia ovariana laparoscópica (LOD) tem se mostrado efetiva para indução da ovulação de pacientes SOP resistentes ao tratamento com CC. Apresenta altas taxas de ovulação (80% a 90%) e de gestação (60% a 80%) (8, 10, 11). Esse tratamento oferece vantagens em relação ao CC, uma única LOD leva a repetidos ciclos ovulatórios e potenciais gestações sem a necessidade de

tratamentos medicamentosos repetidos. Em comparação com a RCO, esta técnica se mostrou bem menos invasiva. Além disso, LOD resulta em mono-ovulação, ao contrário de indutores da ovulação (CC e gonadotrofinas) que estão associados a no mínimo 5-10% de chance de gestações gemelares (35).

A laparoscopia para realização da diatermia ovariana permite também a avaliação da anatomia pélvica e da permeabilidade tubária evitando a necessidade de um procedimento em separado como a histerosalpingografia. A maior desvantagem da LOD é a necessidade de anestesia geral e internação ambulatorial. Outras complicações como a formação de aderências e o risco de falência ovariana prematura também podem ocorrer (9, 35).

O mecanismo de ação da LOD ainda está incerto, parece haver uma redução na produção androgênica ovariana através de uma diminuição do estroma, ou uma ruptura no fluxo de sangue do parênquima. No ovário, o aumento dos níveis de androgênio intrafolicular pode inibir o funcionamento das células da granulosa e o crescimento folicular (17). A alteração de um ambiente androgênico para um estrogênico melhora o *feedback* ovariano-pituitário, permitindo estimulação gonadotrófica apropriada para o desenvolvimento folicular e a ovulação (52).

Após a diatermia ovariana, é observada diminuição na amplitude dos pulsos de LH, ocorrendo a redução da concentração de androgênios. Isso ocorre, provavelmente, pela destruição do estroma ovariano produtor de androgênio (49).

Existem outros fatores, como a inibina e substâncias autócrinas e parácrinas que também podem estar envolvidas na regulação ovariana. A remoção desses fatores inibitórios através da destruição de tecido ovariano permite o recrutamento

de uma nova coorte de folículos, seja espontaneamente ou através da estimulação exógena de FSH (14).

Além das taxas espontâneas de ovulação após o procedimento, a diatermia ovariana também melhora a resposta ovulatória nas mulheres que após o procedimento ainda necessitam induzir a ovulação (8). Após a diatermia ovariana há redução no número de ampolas, na dose diária e na duração do tratamento com hMG (gonadotrofina humana da menopausa), havendo também redução na incidência da síndrome do hiperestímulo ovariano (49).

O trabalho de Kaya e cols. demonstrou uma laparoscopia ovariana com intervenção de uma multi-agulha (LOMNI – *laparoscopic ovarian multi-needle intervention*) desenvolvida pelos próprios pesquisadores que se mostrou eficiente em restaurar os ciclos. As pacientes anovulatórias foram divididas em dois grupos: 17 mulheres realizaram a LOMNI e 18 mulheres fizeram tratamento com indução da ovulação. Todas foram acompanhadas por 6 meses. Não houve diferença significativa entre os grupos na taxa de gestação, entretanto houve uma melhora na regularidade do ciclo no grupo LOMNI. Em 8 pacientes que não engravidaram foi realizada uma segunda laparoscopia para acompanhamento e não foi observado a formação de aderências pélvicas. Outro dado interessante deste estudo é que as pacientes que realizaram LOMNI apresentaram taxas de gestação semelhantes às obtidas após 3 ciclos de inseminação intrauterina, sem o risco da síndrome do hiperestímulo ovariano e de gestação múltipla com metade do custo (53).

Devido à comprovada eficácia da cauterização laparoscópica, procedimentos ainda menos invasivos, de menor custo e com menor potencial para causar

aderências do que a VLPC tem sido pesquisado. Técnicas menos invasivas como a minilaparoscopia com anestesia local e a fertiloscopia, já foram descritas (14, 15).

A aspiração folicular simples por ecografia transvaginal (*transvaginal ovarian drilling* - TVOD) foi realizada em 18 pacientes com SOP, apresentando taxas de ovulação (87,5%) e de gestação (50%) (15).

Mais tarde, foi demonstrada essa mesma proposta em 11 pacientes SOP com má resposta em ciclos anteriores de estimulação com gonadotrofinas para fertilização *in vitro*. Essas pacientes realizaram a TVOD antes da nova indução folicular, não houve nenhum cancelamento de ciclo e apenas uma paciente apresentou a SHO (síndrome do hiperestímulo ovariano). A técnica mostrou-se menos invasiva e com menos aderências pélvicas que a LOD (cauterização laparoscópica), permitindo a aspiração de folículos menores e mais profundos que são visíveis à ecografia (14).

Em 2009, Gordts e cols. realizaram a cauterização ovariana através de hidrolaparoscopia transvaginal com eletrocautério bipolar. De 28 pacientes que realizaram essa cirurgia, 12 (43%) ovularam espontaneamente sendo que 7 engravidaram e 16 (57%) pacientes necessitaram induzir a ovulação com CC e hMG. Entretanto, a técnica se mostrou segura com menor risco de aderências pélvicas, principalmente em pacientes obesas (54).

Em 1998, uma breve comunicação sobre a eletrocauterização guiada por ecografia transvaginal em pacientes com ovário policístico foi publicada (55). Os autores cauterizaram os ovários de 6 pacientes, destas, 4 ovularam espontaneamente e duas engravidaram após o procedimento.

Zhu e cols, em 2006, desenvolveram a cauterização do estroma ovariano em pacientes com SOP resistentes ao CC mediante utilização de fibra ótica e agulha de punção por ultrassonografia transvaginal acoplada ao Yag-Laser. A técnica se mostrou segura, houve ovulação espontânea em 19 das 22 pacientes tratadas (86%) e gestação em 8 pacientes (36%) após 6 meses. Não houve abortamentos e 3 pacientes (14%) não ovularam espontaneamente. Essa técnica em comparação com a cauterização por via laparoscópica mostrou algumas vantagens como a redução nas horas de hospitalização, diminuição do risco anestésico e menor custo (16).

Em 2010, esse mesmo grupo de pesquisadores publicou um trabalho similar, porém randomizado, utilizando 80 pacientes com SOP resistentes ao CC. Foram divididas em 4 grupos segundo o número de pontos cauterizados no ovário: grupo A – apenas um ponto de laser; grupo B – dois pontos; grupo C – três pontos; grupo D – quatro ou cinco pontos. As taxas de ovulação e de gestação foram significativamente melhores nos grupos C e D. Novamente demonstraram a segurança e eficiência da técnica. Foi comprovado que 3 pontos de coagulação em cada ovário com 10 mm de diâmetro apresenta ótimos resultados em pacientes com SOP resistentes ao CC (56).

Eletrocautério/Eletrocirurgia

Eletrocirurgia é o termo usado para descrever a passagem de corrente elétrica de alta frequência pelo tecido para criar um efeito clínico desejado. A corrente elétrica é liberada através de um eletrodo ativo, percorre o corpo do paciente e sai através de um eletrodo neutro ou de uma placa de dispersão. Ao

encontrar a resistência dos tecidos, essa corrente elétrica é transformada em calor (57).

A densidade da corrente se reflete como a quantidade de eletricidade que flui através de uma área do tecido, ou seja, tecido exposto à maior densidade de corrente sofre maiores efeitos. Quando a placa de dispersão é colocada próxima ao campo operatório, teremos menor quantidade de energia perdida no circuito, sendo necessárias menores densidades de corrente para se alcançar os efeitos teciduais desejados (57).

A resistência dos tecidos é um fator importante, pois quanto maior a resistência à corrente elétrica, maior a quantidade de calor produzido, sendo que essa resistência depende da quantidade de água e vasos sanguíneos presente no tecido (58). Os tecidos adiposo e ósseo apresentam resistência superior à da pele, à do tecido muscular e das áreas bem vascularizadas. Isso se reflete na escolha do local em que se posiciona a placa dispersiva, deve-se dar preferência a áreas mais vascularizadas e com presença de tecido muscular, evitando-se áreas com maior concentração de gordura e proeminências ósseas (59).

A placa dispersiva deve ser grande para que a eletricidade disperse em uma área ampla de forma a não causar danos teciduais. O uso de geléias e pastas que aumentem o contato da placa com a pele e reduzam a resistência oferecida por ela, também são utilizadas (58). Quando essa placa se encontra bem posicionada, o efeito eletrocirúrgico desejado fica apenas nos eletrodos ativos, sem dispersão de energia (60).

Existem duas modalidades de eletrocirurgia: o sistema monopolar e o bipolar. Na técnica monopolar, é utilizado um eletrodo ativo para conduzir a corrente e um eletrodo (placa) de dispersão, para a saída da corrente. O eletrodo neutro está distante do eletrodo ativo. Na técnica bipolar, são utilizados dois eletrodos semelhantes a uma pinça, que formam um só instrumento bipolar, esses eletrodos estão separados por pequena distância (1 mm a 3 mm), limitando o fluxo da corrente elétrica no tecido (61). Por essa aproximação nos eletrodos, são necessárias baixas voltagens para atingir os efeitos desejados na técnica bipolar. Esse sistema tem uma área limitada de dispersão térmica comparada com o sistema monopolar, sendo similar a do laser (60).

No sistema monopolar, a corrente elétrica ao ser transmitida pelo eletrodo ativo, percorre maior área do corpo do paciente antes de encontrar o eletrodo dispersivo. Na ponta do eletrodo, uma maior densidade de corrente é produzida com efeito térmico resultante e ocorre a destruição localizada no tecido. A placa dispersiva é relativamente maior em área do que a do eletrodo, isso para reduzir a densidade de corrente elétrica do local onde foi colocado e evitar queimaduras indesejáveis (62). Esse sistema oferece maiores riscos, pois maior quantidade de tecido está exposta à eletricidade. As lesões em eletrocirurgia monopolar ocorrem mais frequentemente no local da placa dispersiva (59).

A maior vantagem do sistema monopolar, sobre o sistema bipolar, consiste na facilidade de uso. Essa característica constitui a principal razão da utilização do sistema monopolar, antes da técnica bipolar. Entretanto, as questões de segurança, da técnica monopolar (lesões térmicas no local da placa dispersiva) estimularam o

uso do sistema bipolar (58). A energia elétrica proporcionada pelo eletrodo bipolar, por se manter em um trajeto entre as duas hastes, produz lesões térmicas mais superficiais e mais localizadas que as produzidas pelo eletrodo monopolar (63).

Riscos da diatermia ovariana

Quando utilizado o eletrocautério para diatermia ovariana, as maiores complicações observadas seriam a formação de aderências pélvicas e falência ovariana precoce (8, 64). A laparoscopia produz menos aderências em relação à ressecção em cunha dos ovários preconizada por Stein e Leventhal. Comparando-se a diatermia ovariana realizada com laser, com aquela provocada pelo eletrocautério, observa-se que a primeira provoca maiores aderências. Além disso, o laser estaria associado a menores taxas de gestação, provavelmente porque o laser produz maiores danos na superfície do ovário, pela característica de sua lesão em formato de cone, sendo a base maior do cone situada no estroma ovariano (49, 65). Outro estudo comparando a diatermia por laser e por eletrocautério demonstrou que o eletrocautério produz menor dano superficial ao ovário e provavelmente menos aderências (9).

Taskin e cols. compararam a quantidade e extensão das aderências provocadas pela cauterização ovariana realizada por videolaparoscopia e por *minilaparoscopia*. Os grupos foram divididos conforme o procedimento realizado e após 3 semanas uma minilaparoscopia avaliava as aderências. No grupo da minilaparoscopia houve menor exposição ao pneumoperitônio com CO₂, menor tempo cirúrgico e recuperação mais rápida. O grupo da videolaparoscopia além de

apresentar significativamente mais aderências (48% vs 24%, $p < 0,05$), estas eram mais extensas do que as encontradas no grupo da minilaparoscopia (12).

A frequência de aderências provocadas por LOD foram também estudadas após diferentes números punções ovarianas: um grupo de 48 mulheres foram tratadas com 6 punções no ovário esquerdo e 12 no lado oposto; e o outro grupo com mesmo número de mulheres que tiveram 6 punções no ovário direito e 12 no ovário contralateral. Após 6 semanas foi realizada a segunda laparoscopia para avaliação. Sessenta por cento das mulheres apresentavam aderências, sendo 53,7% bilaterais e 46,3% monolaterais. Os autores observaram que o ovário esquerdo parece mais propenso a formação de aderências firmes do que o ovário direito. Essa pré-disposição pode ocorrer pela diminuição da movimentação de fluidos no lado esquerdo da pélvis causado pela anatomia do cólon sigmoide (13).

Para minimizar a ocorrência das aderências, devem-se evitar lesões na superfície ovariana. Isso pode ser realizado com a utilização de agulhas com isolante em sua extensão, exceto na ponta que irá penetrar o ovário. A ponta da agulha deve ser bem afiada para penetrar com segurança o ovário e realizar a coagulação do estroma ovariano. A aplicação de energia só inicia após a extremidade não isolada estar dentro do ovário, prevenindo as lesões superficiais ovarianas, bem como, em órgãos vizinhos como trompas, intestino e grandes vasos (66).

Para diminuir o risco de falência ovariana precoce, deve ser evitada eletrocoagulação próximo ao hilo do ovário. Realizar mais de 20 punções por ovário, além de não ser necessário, pode provocar destruição de todas as unidades

foliculares, levando a falência ovariana (49). Alguns autores sugerem 6 a 12 perfurações em cada ovário, dependendo do tamanho do mesmo (66). Amer e cols. demonstraram que 3 a 6 punções (450 - 900 joules) por ovário apresentam taxas significativamente melhores para ovulação e gestação em mulheres com SOP (67).

Outro limitante da diatermia ovariana laparoscópica é a necessidade de anestesia, obrigatoriamente geral (68). Quanto ao tipo de anestesia, estudos com a minilaparoscopia demonstraram vantagens ao utilizarem apenas a sedação em caráter ambulatorial, com recuperação mais rápida da paciente, sem necessidade de internação e com menos intercorrências causadas pela anestesia geral (12).

Em 1998, Li e cols. compararam a cauterização ovariana a laser com a realizada com eletrocautério. Este último requer uma agulha especializada que pode ser esterilizada e reutilizada, o laser necessita de um equipamento mais sofisticado e uma ponteira de uso único. Os autores demonstraram que os equipamentos da diatermia elétrica são mais fáceis de manipular e o aprendizado foi mais rápido (9). O estudo da minilaparoscopia mostra vantagens deste procedimento, entretanto, os autores concluem que o mesmo é efetivo quando o material necessário para realização da cauterização a laser é adequada e os cirurgiões são capacitados (12).

Em 2009, Api fez algumas críticas a tecnologia utilizada no estudo de Zhu e cols. Inicialmente, relata que a fibra ótica de 400 µm de diâmetro não é fácil de ser visualizada mesmo pelo ultrassom de alta definição, os equipamentos necessários são de alto custo, e a maioria dos hospitais não dispõe do material necessário nem de pessoal capacitado para operar o laser. Este autor acredita que por não estar sob

anestesia geral, a paciente pode mover-se involuntariamente podendo provocar lesões indesejadas (69).

Cauterização ovariana com modelos experimentais

Os animais destinados ao abatedouro são importantes para a pesquisa científica. Como são animais que já estão destinados ao abate por causas comerciais, quando não for prejudicado seu destino como alimento e o mesmo não sofrer, nada impede que sejam utilizados para pesquisa científica. Devemos sempre cuidar o bem-estar do animal, fazendo analgesias e sedações adequadas para o procedimento que se quer testar.

Antes da realização de procedimentos invasivos em humanos, é prudente que se comprove a segurança, eficácia e efetividade da técnica em modelos experimentais. A cauterização ovariana com laser foi testada inicialmente em cabras, demonstrando um dano mínimo superficial no ovário e nenhuma formação de aderência (70).

Para comprovar a viabilidade de lesão ovariana com laser, os pesquisadores utilizaram sete cabras maduras, divididas em 2 grupos: no grupo I (2 cabras) foi realizada uma laparotomia, cauterização a laser por diferentes voltagens nos dois ovários e as cabras abatidas 1 dia após a cirurgia. No grupo II (5 cabras) a abordagem laparoscópica, cauterização a laser com diferentes voltagens em um ovário, sendo o contralateral controle. Esses animais foram abatidos 81 dias após a cirurgia sendo realizada a inspeção da pelve para identificar aderências e os ovários

encaminhados para exame histopatológico (70). Os resultados do grupo I demonstraram que quanto maior a energia utilizada no centro do ovário, mais as lesões se estendiam até a superfície. No grupo II não foram observadas aderências quando utilizado menor potência, entretanto, maiores voltagens resultaram em aderências periovarianas. Os pesquisadores concluíram que a cauterização ovariana com laser é possível e que, com baixas voltagens, não há formação de aderências (70).

Em 2008 Hendriks e cols., avaliaram as lesões térmicas produzidas pelo eletrocautério (monopolar e bipolar) e com o laser CO₂ em 6 ovários de vacas coletados em abatedouro (65). O objetivo era comparar a extensão da lesão ovariana provocada pelas formas mais frequentes de *drilling* ovariano utilizado em pacientes com SOP. A lesão do laser CO₂, 25 W por 6 segundos, foi superficial em forma de cone, com menor lesão tecidual por área (24 mm³). O eletrocautério bipolar, com 25 W por 3-5 segundos, ocasionou uma lesão maior em forma de cilindro de 287,6 mm³ e o eletrocautério monopolar, com 30 W por 4 segundos, provocou menor dano na superfície do ovário, com uma lesão também cilíndrica intermediária de 70 mm³. Esse estudo demonstrou haver diferenças significativas nas lesões provocadas pelas diferentes formas de cauterização. Os autores enfatizam a dificuldade para estudar cauterização em ovários de humanos e consideram os ovários de vacas pelo tamanho, morfologia celular, fisiologia, ciclo ovariano e endocrinologia um excelente modelo experimental (65).

Objetivos

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a segurança e eficiência da eletrocauterização monopolar por via transvaginal, sob controle ecográfico em animais de experimentação (ovelhas e vacas em idade reprodutiva).

Referências bibliográficas

1. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800.
2. Eisenhardt S, Schwarzmann N, Henschel V, Germeyer A, von Wolff M, Hamann A, et al. Early effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):946-52.
3. Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, et al. Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2007;356(6):551-66.
4. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj.* 2003;327(7421):951-3.
5. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(12):1223-36.
6. Stein I, Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries *American Journal of Obstetric & Gynecology.* 1935;29:181-91.

7. Homburg R. Management of infertility and prevention of ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(5):773-88.
8. Gjönnaess H. Polycystic ovarian syndrome treated by ovarian electrocautery through the laparoscope. *Fertil Steril.* 1984;41(1):20-5.
9. Li TC, Saravelos H, Chow MS, Chisabingo R, Cooke ID. Factors affecting the outcome of laparoscopic ovarian drilling for polycystic ovarian syndrome in women with anovulatory infertility. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105(3):338-44.
10. Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, Vandekerckhove P. Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(3):CD001122.
11. Donesky BW, Adashi EY. Surgically induced ovulation in the polycystic ovary syndrome: wedge resection revisited in the age of laparoscopy. *Fertil Steril.* 1995;63(3):439-63.
12. Taskin O, Sadik S, Onoglu A, Gokdeniz R, Yilmaz I, Burak F, et al. Adhesion formation after microlaparoscopic and laparoscopic ovarian coagulation for polycystic ovary disease. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1999;6(2):159-63.
13. Mercurio F, Mercurio A, Di Spiezio Sardo A, Barba GV, Pellicano M, Nappi C. Evaluation of ovarian adhesion formation after laparoscopic ovarian drilling by second-look minilaparoscopy. *Fertil Steril.* 2008;89(5):1229-33.

14. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, Iammarrone E, Feliciani E, Fortini D. Transvaginal ovarian drilling: a new surgical treatment for improving the clinical outcome of assisted reproductive technologies in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2001;76(4):812-6.
15. Mio Y, Toda T, Tanikawa M, Terado H, Harada T, Terakawa N. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in the management of anovulatory infertility associated with polycystic ovaries. *Fertil Steril*. 1991;56(6):1060-5.
16. Zhu WJ, Li XM, Chen XM, Lin Z, Zhang L. Transvaginal, ultrasound-guided, ovarian, interstitial laser treatment in anovulatory women with clomifene-citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Bjog*. 2006;113(7):810-6.
17. Pirwany I, Tulandi T. Laparoscopic treatment of polycystic ovaries: is it time to relinquish the procedure? *Fertil Steril*. 2003;80(2):241-51.
18. Franco JG, Baruffi RL. Introduction to methods for collecting human gametes in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2002;5(2):187-97.
19. Seifer DB, Collins RL, Paushter DM, George CR, Quigley MM. Follicular aspiration: a comparison of an ultrasonic endovaginal transducer with fixed needle guide and other retrieval methods. *Fertil Steril*. 1988;49(3):462-7.
20. Ludwig AK, Glawatz M, Griesinger G, Diedrich K, Ludwig M. Perioperative and post-operative complications of transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval: prospective study of >1000 oocyte retrievals. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3235-40.

21. group REA-SPcw. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004;19(1):41-7.
22. Group REA-SPCW. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2004;81(1):19-25.
23. Azziz R. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal. *Fertil Steril.* 2005;83(5):1343-6.
24. FERRIMAN D, GALLWEY JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961;21:1440-7.
25. Slayden SM, Moran C, Sams WM, Boots LR, Azziz R. Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril.* 2001;75(5):889-92.
26. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet.* 1985;2(8469-70):1375-9.
27. Baillargeon JP, Nestler JE. Commentary: polycystic ovary syndrome: a syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):22-4.
28. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet.* 2007;370(9588):685-97.
29. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2008;14(4):367-78.

30. Group TEA-SPCW. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008;89(3):505-22.
31. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):359-72.
32. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):673-83.
33. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(2):812-9.
34. Guzick DS. Treating the polycystic ovary syndrome the old-fashioned way. *N Engl J Med*. 2007;356(6):622-4.
35. Amer SA, Li TC, Metwally M, Emarh M, Ledger WL. Randomized controlled trial comparing laparoscopic ovarian diathermy with clomiphene citrate as a first-line method of ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009;24(1):219-25.
36. Hammond MG, Halme JK, Talbert LM. Factors affecting the pregnancy rate in clomiphene citrate induction of ovulation. *Obstet Gynecol*. 1983;62(2):196-202.
37. Kousta E, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):359-65.

38. Chong AP, Lee JL, Forte CC, Tummillo ME. Identification and management of clomiphene citrate responses. *Fertil Steril*. 1987;48(6):941-7.
39. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *Fertil Steril*. 2002;77(1):91-7.
40. Eijkemans MJ, Imani B, Mulders AG, Habbema JD, Fauser BC. High singleton live birth rate following classical ovulation induction in normogonadotrophic anovulatory infertility (WHO 2). *Hum Reprod*. 2003;18(11):2357-62.
41. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1998;338(26):1876-80.
42. Palomba S, Pasquali R, Orio F, Nestler JE. Clomiphene citrate, metformin or both as first-step approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review of head-to-head randomized controlled studies and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70(2):311-21.
43. van Santbrink EJ, Eijkemans MJ, Laven JS, Fauser BC. Patient-tailored conventional ovulation induction algorithms in anovulatory infertility. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(8):381-9.
44. Nugent D, Vandekerckhove P, Hughes E, Arnot M, Lilford R. Gonadotrophin therapy for ovulation induction in subfertility associated with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000(4):CD000410.

45. Fauser BC, Diedrich K, Devroey P, 2007 EARWG. Predictors of ovarian response: progress towards individualized treatment in ovulation induction and ovarian stimulation. *Hum Reprod Update*. 2008;14(1):1-14.
46. Hamilton-Fairley D, Franks S. Common problems in induction of ovulation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1990;4(3):609-25.
47. Vejlsted H, Albrechtsen R. Biochemical and Clinical Effect of Ovarian Wedge Resection in the Polycystic Ovary Syndrome. *Obstet Gynecol*. 1976;47(5):575-80.
48. Stein IF. Duration of fertility following ovarian wedge resection. STEIN-LEVENTHAL SYNDROME. *West J Surg Obstet Gynecol*. 1964;72:237-42.
49. Tulandi T, al Took S. Surgical management of polycystic ovarian syndrome. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1998;12(4):541-53.
50. Buttram VC, Vaquero C. Post-ovarian wedge resection adhesive disease. *Fertil Steril*. 1975;26(9):874-6.
51. Weinstein D, Polishuk WZ. The role of wedge resection of the ovary as a cause for mechanical sterility. *Surg Gynecol Obstet*. 1975;141(3):417-8.
52. Parsanezhad ME, Bagheri MH, Alborzi S, Schmidt EH. Ovarian stromal blood flow changes after laparoscopic ovarian cauterization in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1432-7.
53. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O. Evaluation of a new surgical approach for the treatment of clomiphene citrate-resistant infertility in polycystic ovary syndrome:

laparoscopic ovarian multi-needle intervention. *J Minim Invasive Gynecol.* 2005;12(4):355-8.

54. Gordts S, Puttemans P, Valkenburg M, Campo R, Brosens I. Transvaginal hydrolaparoscopy in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2009;91(6):2520-6.

55. Syritsa A. Transvaginal ultrasound-guided electrocautery of the ovaries in infertile patients with polycystic ovarian disease. *Int J Gynaecol Obstet.* 1998;63(3):293-4.

56. Zhu W, Fu Z, Chen X, Li X, Tang Z, Zhou Y, et al. Transvaginal ultrasound-guided ovarian interstitial laser treatment in anovulatory women with polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial on the effect of laser dose used on the outcome. *Fertil Steril.* 2010;94(1):268-75.

57. Waldron RP, Copeland GP, Murphy AF. Surgical diathermy: a potential hazard. *Br J Clin Pract.* 1984;38(7-8):283.

58. Trindade MRM, Grazziotin RU, Grazziotin RU. Eletrocirurgia: sistemas mono e bipolar em cirurgia videolaparoscópica. *Acta Cirurgica Brasileira.* 1998;13(3):1678-2674.

59. Afonso CT, Silva AL, Fabrini DS, Afonso CT, Cortes MGW, Sant'anna LL. Risco do uso de Eletrocautério em pacientes portadores de adornos metálicos. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.* 2010;23(3):183-6.

60. Wu MP, Ou CS, Chen SL, Yen EY, Rowbotham R. Complications and recommended practices for electrosurgery in laparoscopy. *Am J Surg.* 2000;179(1):67-73.
61. Afonso CT, Silva AL, Fabrini DS, Afonso CT, Cortes MGW, Sant'anna LL. Risco do uso de Eletrocautério em pacientes portadores de adornos metálicos. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.* 2010;23:183-6.
62. Gallagher K, Dhinsa B, Miles J. Electrosurgery. *Surgery.* 2010;29(2):70-2.
63. Merchant RN. Treatment of polycystic ovary disease with laparoscopic low-watt bipolar electrocoagulation of the ovaries. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1996;3(4):503-8.
64. Fernandez H, Morin-Surruca M, Torre A, Faivre E, Deffieux X, Gervaise A. Ovarian drilling for surgical treatment of polycystic ovarian syndrome: a comprehensive review. *Reprod Biomed Online.* 2011;22(6):556-68.
65. Hendriks ML, van der Valk P, Lambalk CB, Broeckaert MA, Homburg R, Hompes PG. Extensive tissue damage of bovine ovaries after bipolar ovarian drilling compared to monopolar electrocoagulation or carbon dioxide laser. *Fertil Steril.* 2010;93(3):969-75.
66. Rose BI. Ovarian drilling in infertile women with polycystic ovary syndrome. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1996;3(3):461-8.

67. Amer SA, Li TC, Cooke ID. Laparoscopic ovarian diathermy in women with polycystic ovarian syndrome: a retrospective study on the influence of the amount of energy used on the outcome. *Hum Reprod.* 2002;17(4):1046-51.
68. Amer SA, Li TC, Cooke ID. Repeated laparoscopic ovarian diathermy is effective in women with anovulatory infertility due to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2003;79(5):1211-5.
69. Api M. Could transvaginal, ultrasound-guided ovarian interstitial laser treatment replace laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovary syndrome resistant to clomiphene citrate? *Fertil Steril.* 2009;92(6):2039-40.
70. Beek JF, Kaaijk EM, van der Veen F, de Boer K, Ankum WM, ten Kate FJ, et al. Interstitial laser treatment of the ovary: an experimental study in goats. *Lasers Surg Med.* 1996;18(1):34-8.

**Artigo 1 - Transvaginal ultrasound ovarian diathermy: sheep as an
experimental model**

**Artigo 1 - Transvaginal ultrasound ovarian diathermy: sheep as an
experimental model**

Publicado na revista científica Journal of Ovarian Research, em janeiro de 2012.

Anita Mylius Pimentel¹, Danielle Kobayashi², Lucia Maria Kliemann³, Renato Franjdlich⁴, Edison Capp^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{2,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁴Gerar - Núcleo de Reprodução Humana do Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

Abstract

Study objective: to develop a minimally invasive ovarian cauterization technique under transvaginal ultrasound control, and to evaluate the safety of the transvaginal ovarian monopolar cauterization, female sheep at reproductive age were used as an experimental model. **Design:** experimental study. **Design classification:** II-3. **Setting:** university research center. **Animals:** seventeen female sheep (15 Corriedale e 2 Suffolk) in reproductive age were included in this study. **Interventions:** transvaginal ovarian cauterization with a monopolar Valleylab Force 2 electrocautery. **Measurements and main results:** macroscopic and microscopic lesions were assessed. Ovarian size were $1.31 \text{ cm}^2 \pm 0,43$ (Corriedale) and $3.41 \text{ cm}^2 \pm 0,64$ (Suffolk). From 30 ovaries from Corriedale sheep punctured, only 3 were cauterized, presenting macroscopic and typical microscopic lesion. In the Suffolk sheep group, only one ovary was cauterized. No lesion could be found in the needle path. **Conclusion:** this is the first experimental animal model described for ovarian cauterization needle guided by transvaginal ultrasound. The sheep does not seem to be the ideal animal model to study this technique. Another animal model, whose ovaries are better identified by transvaginal ultrasound should be sought for this technique, theoretically less invasive, before it could be offered safely to women with polycystic ovary syndrome.

Keywords: transvaginal ovarian drilling; ovarian diathermy; sheep; polycystic ovary syndrome

Introduction

The polycystic ovarian syndrome (PCOS) is the endocrine-metabolic disorder that affects more women on reproductive age, with a prevalence of 5 to 10 % (1). This syndrome is characterized by anovulation, clinical or biochemical hyperandrogenism and ultrasound image showing several small ovarian follicles (2). In addition, 60 % of the patients are obese and several have insulin resistance (1).

Clomiphene citrate (CC) is the recommended first-line treatment for ovulation induction in PCOS patients (3). However, around 20 % of PCOS women are resistant to CC, requiring the second-line intervention: exogenous gonadotropins or laparoscopic ovarian surgery (3).

Ovulation induction with gonadotropins requires daily parenteral injections, intense monitoring of ovarian response, and is associated with increased occurrence of multiple pregnancy and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) (4).

Laparoscopic ovarian surgery alone is as effective as gonadotropins to induce ovulation and has similar pregnancy rates. Laparoscopic drilling induces unifollicular ovulation with no risk of OHSS or high-order multiples (3). Nonetheless, laparoscopic electrosurgical drilling requires hospital treatment, general anesthesia, and the risk of postoperative adhesions cannot be ignored (5, 6).

Some techniques of transvaginal ovarian drilling have been described in elegant studies (7, 8), nevertheless a monopolar transvaginal ovarian cauterization, that use the expertise and safety of transvaginal puncture for oocyte captation (9), seems to be an easier and feasible approach (10).

The aim of this study was to develop a minimally invasive ovarian cauterization technique under transvaginal ultrasound control. To evaluate the safety of the transvaginal ovarian monopolar cauterization, female sheep at reproductive age were used as an experimental model.

Materials and methods

Seventeen female sheep in reproductive age were included in this study. Ten days before the procedure, menstrual cycle in the sheep was induced and synchronized with the use of intravaginal pessaries with 50 mg of medroxyprogesterone acetate. Before the ovarian cauterization (48 h), the pessaries were removed and 300 to 600 IU of eCG (Novormon 5000, Intervet Schering-Plough Animal Health) was administered IM.

On the day of the procedure, the sheep was sedated with a combination of xylazine 2 % and ketamine 10 %. The animal was positioned in right lateral position and immobilized, the bladder emptied through catheterization. The pelvic structures were identified by transvaginal ultrasound. In the vaginal probe, a guide was attached guide and the puncture needle was inserted through this guide. The ultrasound equipment used was an Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japan) with vaginal probe of 6.5 MHz.

The needle for cauterization was exclusively developed for this study by Helena von Eye Corleta and manufactured in the Department of Biomedical Engineering of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. It was made of stainless steel

with 1.5 mm in diameter and 35 cm long, insulated throughout its length except for 3 mm distal. The proximal end was connected to the electrocautery (figure 1).

The left ovary (LO) was punctured in four points and applied a voltage of 40 W for 5 s at each point, resulting in a total of 800 J (Joules) of thermal energy. In the right ovary (RO), the procedure was similar, with the same power for 10 s, resulting in a thermal energy of 1600 J. The electrocautery used was a Valleylab Force FX with monopolar coagulation (Valleylab, Boulder, USA).

Histological analysis was performed by experienced pathologist and changes caused by the puncture and cauterization were identified. Two days after the procedure, the sheep were slaughtered and a thorough inspection in the needle path, looking for lesions secondary to cauterization or puncture was performed.

Ovaries were collected, fixed in 10 % formalin, sliced and submitted to the routine histological processing, dehydrating in alcohol, clearing in xylene, and paraffin impregnation. Slices (4 μ m) were obtained and stained with hematoxylin-eosin technique.

This experiment was performed in accordance to the Brazilian College of Animal Experimentation (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA) and was approved by the Ethics Committee of the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#07113).

Results

The procedure was performed in 15 Corriedale and 2 Suffolk female sheep. The weight of the animals and the size of the ovaries are shown in table 1.

Of the 30 ovaries of Corriedale sheep, whose average size was 1.31 cm³, only 3 were affected by ovarian cauterization, presenting macroscopic (figure 2) and typical microscopic lesion (figure 3). In the Suffolk sheep group, only one ovary was cauterized.

Forty eight hours after cauterization, animals were sacrificed and injuries due to puncture or cauterization in the needle path were searched. Although the total thermal dose (n puncture X n second X Power W) delivered was 800 J (4 x 5s x 40W) on the left side and 1600 J (4 x 10s x 40W) on the right (5), no lesion could be found in the needle path.

Discussion

Since 1990, less invasive methods for conducting and ovarian drilling (8, 10, 11) have been investigated, and a number of surgical procedures that destroy or remove ovarian tissue to restore ovulation in SOP patients have been described (12, 13). Although the surgical of new modalities have easy applicability and low cost with shorter hospital stay, the safety of the procedures remain to be defined (7).

In this study, the practicability and security of a transvaginal ovarian cauterization in a medium size animal (sheep), with the monopolar eletrocautery

Valleylab was tested. The most frequently reported complication is alternate site burns due to high current density at an erroneously applied ground (return) electrode. This risk has been reduced by modern generators that are isolated from earth ground and have detectors that disable the machine and activate an alarm if the ground electrode circuit is faulty (14).

The main difficulty of the experiments was the correct identification of the sheep ovaries. Ovarian size and antral follicles count are much smaller in the sheep than in cattle or humans. This may help explain the high variation in the gray-scale pixel values observed in the ultrasound image (15).

Even in the largest sheep, the ovaries (3.41 cm^3) are much smaller than those found in women with PCOS, which have up to twice the size of the ovaries from ovulatory women (10 cm^3) and are easily identified for ovarian puncture.

Besides the small size of the ovaries, another important factor contributing to the difficult identification of the gonads was the vaginal approach. In the sheep, follicles and uterus examination tend to have better results with rectal ultrasound (16). However, for better simulation of the technique used in women, the transvaginal ultrasound and puncture, the same technique for oocyte retrieval in IVF procedures, was preferred.

In the four ovaries punctured and cauterized the histological lesions were characteristic with hemorrhage, necrosis and perivascular infiltration of neutrocytarian cells. Similar histological findings have been previously described 48 h after laser cauterization of sheep ovaries (17).

The positive aspect of this work is that no intrabdominal lesions secondary to puncture or cauterization were found in the needle path. It was surprising that after 2400 J of total thermal dose administered to the pelvis, no lesion was found. Probably, the area cauterized was a pelvic intra-abdominal fat, which showed no apparent tissue injury after 48 h.

Conclusions

This is the first experimental animal model described for ovarian cauterization needle guided by transvaginal ultrasound. The sheep does not seem to be the ideal animal model to study this technique: their ovaries are too small and too difficult to identify by transvaginal ultrasound. Another animal model, whose ovaries are better identified by transvaginal ultrasound should be sought for this technique, theoretically less invasive, before it could be offered safely to women with PCOS.

Acknowledgements

We would like to thank the Engineer Paulo Roberto Stefani Sanches, who made the special needle for this work and the Veterinary Fabiola Meyer who sedated the animals. This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470852/2009-7) and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp and Danielle Kobayashi are scholarships recipients from CNPq.

References

1. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800.
2. Strowitzki T, Capp E, von Eye Corleta H. The degree of cycle irregularity correlates with the grade of endocrine and metabolic disorders in PCOS patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(2):178-81.
3. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2008;89(3):505-22.
4. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352(12):1223-36.
5. Amer SA, Li TC, Cooke ID. Laparoscopic ovarian diathermy in women with polycystic ovarian syndrome: a retrospective study on the influence of the amount of energy used on the outcome. *Hum Reprod.* 2002;17(4):1046-51.
6. Donesky BW, Adashi EY. Surgically induced ovulation in the polycystic ovary syndrome: wedge resection revisited in the age of laparoscopy. *Fertil Steril.* 1995;63(3):439-63.
7. Api M. Could transvaginal, ultrasound-guided ovarian interstitial laser treatment replace laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovary syndrome resistant to clomiphene citrate? *Fertil Steril.* 2009;92(6):2039-40.

8. Zhu WJ, Li XM, Chen XM, Lin Z, Zhang L. Transvaginal, ultrasound-guided, ovarian, interstitial laser treatment in anovulatory women with clomifene-citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006;113(7):810-6.
9. Ludwig AK, Glawatz M, Griesinger G, Diedrich K, Ludwig M. Perioperative and post-operative complications of transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval: prospective study of >1000 oocyte retrievals. *Hum Reprod*. 2006;21(12):3235-40.
10. Syritsa A. Transvaginal ultrasound-guided electrocautery of the ovaries in infertile patients with polycystic ovarian disease. *Int J Gynaecol Obstet*. 1998;63(3):293-4.
11. Badawy A, Khiary M, Ragab A, Hassan M, Sherief L. Ultrasound-guided transvaginal ovarian needle drilling (UTND) for treatment of polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1164-7.
12. Gordts S, Puttemans P, Valkenburg M, Campo R, Brosens I. Transvaginal hydrolaparoscopy in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2520-6.
13. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O. Evaluation of a new surgical approach for the treatment of clomiphene citrate-resistant infertility in polycystic ovary syndrome: laparoscopic ovarian multi-needle intervention. *J Minim Invasive Gynecol*. 2005;12(4):355-8.
14. Gallagher K, Dhinsa B, Miles J. Electrosurgery. *Surgery*. 2011;29(2):70-2.

15. Toosi BM, Seekallu SV, Pierson RA, Rawlings NC. Evaluation of the ultrasound image attributes of developing ovarian follicles in the four follicular waves of the interovulatory interval in ewes. *Theriogenology*. 2009;72(7):902-9.
16. Gonzalez-Bulnes A, Pallares P, Vazquez MI. Ultrasonographic imaging in small ruminant reproduction. *Reprod Domest Anim*. 2010;45 Suppl 2:9-20.
17. Tozawa H, Brännström M, Petrucco O, Walker S, Chambers H, Pascoe V, et al. Distribution of leukocyte subtypes in the sheep ovary after laser drilling. *Hum Reprod*. 1995;10(3):544-50.

Legends

Figure 1. Needle developed for transvaginal ovarian cauterization: (a) the needle; (b) the connexion for eletrocautery; (c) the distal tip not insulated.

Figura 2. Lesion in cauterized ovary of a Corriedale sheep (macroscopy).

Figure 3. Cauterization lesion (histology): (a) 40 X, general injury; (b) 100 X, bleeding; (c) 200 X blood vessels with neutrophiles; (d) 400 X, granulation tissue.

Table 1. Sheep weight and ovaries sizes.

Figure 1.



Figure 2.



Figure 3.

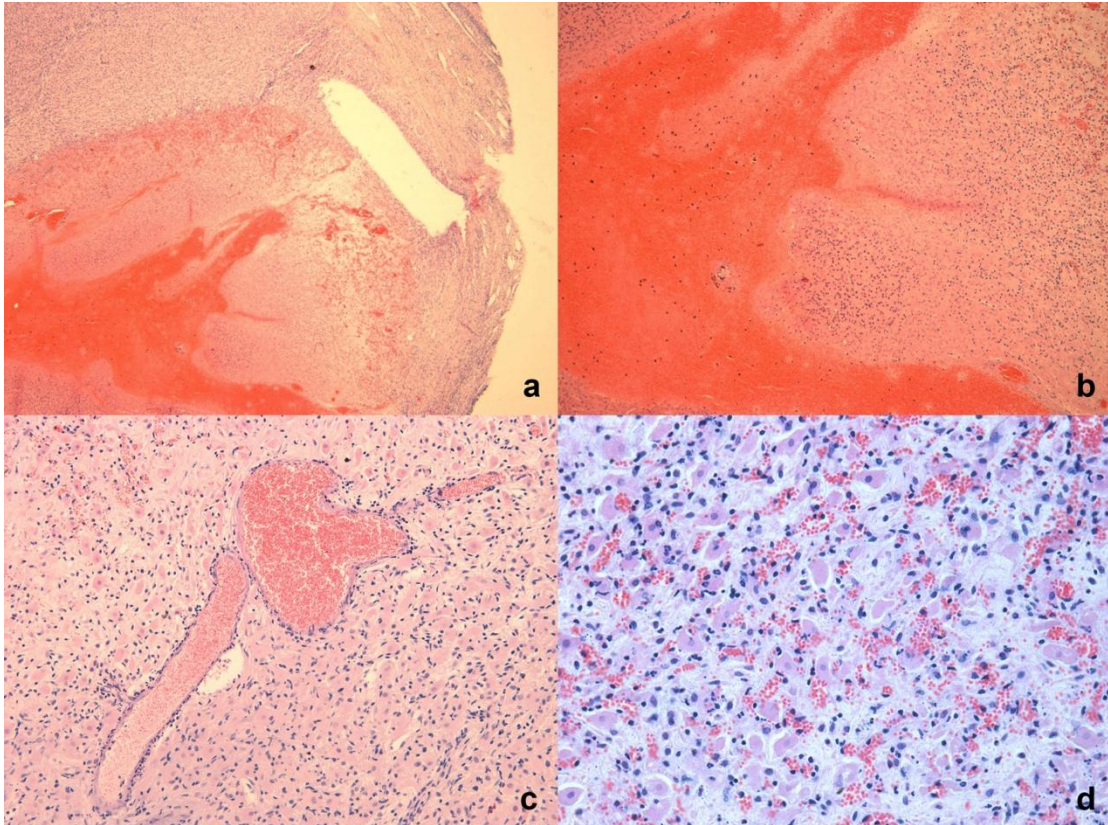


Table 1

Breed	Sheep weight (mean \pm SD)	Ovaries sizes (mean \pm SD)
Corriedale (n = 15)	34.5 kg \pm 3.0	1.3 cm ³ \pm 0.4
Suffolk (n = 2)	105.0 \pm kg \pm 27.5	3.4 cm ³ \pm 0.6

**Artigo 2 - Adequacy of ovarian diathermy under ultrasound control: an
experimental model**

Adequacy of ovarian diathermy under ultrasound control: an experimental model

Anita Mylius Pimentel¹, Lucia Maria Kliemann², Daniela dos Santos Brum³, Fábio Gallas Leivas³, Paulo Roberto Stefani Sanches⁴, Edison Capp^{1,5}, Helena von Eye Corleta⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

³ Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

⁴ Serviço de Pesquisa e Desenvolvimento em Engenharia Biomédica-GPPG, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Corresponding author:

Prof. Dr. Helena von Eye Corleta

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: hcorleta@portoweb.com.br

Abstract

Study objective: develop a minimally invasive ovarian cauterization technique under transvaginal ultrasound control, and evaluate the safety and efficacy to cause the injury of the ovarian monopolar cauterization with female cattle at reproductive age used as an experimental model. **Design:** experimental study. **Design classification:** II-3. **Setting:** university research center. **Animals:** eleven female bovine in reproductive age were included in this study. **Interventions:** transvaginal ovarian cauterization with a monopolar Valleylab Force FX electrocautery. **Measurements and main results:** macroscopic and microscopic lesions were assessed. From 22 ovaries punctured 20 were cauterized, presenting macroscopic and typical microscopic lesion. No lesion could be found in the needle path. The measures of the areas calculated by estimates of volume cylindrical showed a median of 1.12% in the right ovary and 1.65% in the left ovary. When the estimate was calculated by spherical shape, the medians were 1.77% in the right ovary and 3.06% in the left ovary. There was a statistically significant difference in these two estimates, when sphere $p=0.008$ and when cylinder $p=0.021$. **Conclusion:** This experimental animal model described for ovarian cauterization needle guided by transvaginal ultrasound seems to be adequate. The safe and effectiveness of this technique, theoretically less invasive, could be tested in anovulatory women with PCOS.

Keywords: transvaginal ovarian drilling; ovarian diathermy; bovine; polycystic ovary syndrome

Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a multifactorial syndrome characterized by at least two of the following three changes: anovulation, hyperandrogenism, and enlarged ovaries on ultrasound (1, 2). Due to its high prevalence it is the most common cause of anovulatory infertility. The consensus on infertility treatment related to PCOS published in 2008 enforces the use of clomiphene citrate (CC) as the first line treatment for ovulation induction (3, 4). However, around 20% of PCOS patients are resistant to CC requiring second-line intervention to ovulate: exogenous gonadotrophins or surgical ovulation induction (ovarian diathermy) (3). After six months of treatment both interventions have equal pregnancy rates (5). Ovulation induction with gonadotropins requires intense monitoring of ovarian response, is associated with increased occurrence of multiple pregnancy and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) (6).

Laparoscopic ovarian diathermy (LOD) presents high rates of ovulation (80% to 90%) and pregnancy (60% to 80%) (5, 7, 8). A single LOD leads to repeated ovulatory cycles and potential pregnancies without the need of repeated drug treatments, it is important to provoke mono-ovulation without multiple pregnancy risk (9).

Nonetheless, LOD requires hospital treatment, general anesthesia, and risk of postoperative adhesions cannot be ignored (8, 10). With the aim to reduce adhesions and simplify ovarian cauterization, microlaparoscopy without general anesthesia (11) and techniques of transvaginal ovarian drilling (TVOD) with laser has been described (11-14).

A brief communication from Syritsa e cols. in 1998 reported a transvaginal ovarian electrocoagulation in 6 anovulatory PCO patients. There were no complications and after 8 weeks 4 patients were pregnant (15).

To test the efficacy and safety of ultrasound TVOD, we are pursuing an animal experimental model. Using sheep as an experimental model (16), there were no intrapelvic thermal injuries secondary to transvaginal cauterization, however the effectiveness could not be demonstrate. The aim of this study was to establish the efficacy and safety of the transvaginal ultrasound ovarian diathermy with monopolar cauterization using cows in reproductive age.

Materials and methods

Eleven female cattle of 2-3 years old were included in this study. Two days before being sent to the slaughterhouse, cows were submitted to ovarian cauterization. The needle for cauterization was exclusively developed for TVOD by Helena von Eye Corleta and manufactured in the Department of Biomedical Engineering of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. It was made of stainless steel with 1 mm in diameter and 55 cm long, insulated throughout its length except for 3 mm distal. The proximal end was connected to the electrocautery (figure 1).

On the day of the experiment the animals were contained in appropriate local for immobilization. Acepromazine 1% was used for tranquilization of animals and 2% lidocaine for low epidural anesthesia. An ultrasound device Aloka SSD-500 and 5 MHz sector transducer (UST9111) coupled to a guide with transvaginal chuck

external drive allowing the operator of the needle was used for the visualization of the ovaries.

After ovarian identification, ultrasonography measure of the size of the ovaries was performed by measuring three different dimensions in centimeters (length, width and thickness) and then adjusted by the classical formula for a prolate ellipsoid ($V = L \times W \times T \times 0.523$) (17).

The right ovary (RO) was punctured in four points and applied a voltage of 40 W for 5 s at each point, resulting in a total of 800 J (Joules) of thermal energy. In the left ovary (LO), the procedure was similar, with the same time and 80 W of voltage, resulting in a thermal energy of 1600 J. The electrocautery was a Valleylab Force FX with monopolar coagulation (Valleylab, Boulder, USA).

Two days after the procedure, the cows were slaughtered and macroscopic examination of the ovaries was performed with a thorough inspection of the needle path, looking for lesions secondary to cauterization or puncture. Immediately after, the ovaries were collected and volumes were measured by water displacement with the help of a Becker glass of water. Ovaries were fixed in 10% formalin and histological analysis was performed by experienced pathologist and changes caused by the puncture and cauterizations were identified.

After 10 days in formalin, the ovaries were measured with a ruler in centimeters through three different measures: height, length and width, than adjusted by the same formula ($V = L \times W \times T \times 0.523$) (17).

Macroscopic analysis was done by the pathologist and the specimens were subjected to serial sections of 3 mm thick. The puncture site, any anomalous areas were identified, and to control normal ovarian parenchyma, the ovaries were sent for microscopic examination. The specimens followed the routine histological processing with dehydration in alcohol, clarified in xylene and impregnation in paraffin. The blocks were sectioned in 4 μm thick, on two levels with 50 μm apart, and stained using hematoxylin-eosin. The microscopic analysis aimed to the effects caused by electric current and to temperature change due to the different applied voltage. Microscopic analysis was also performed by a pathologist without knowledge of the laterality of the ovary.

The area of the lesion caused in the ovary were quantified using the software ImageJ 1.40G (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Washington, D.C., USA, public domain). The slides were reviewed and the largest lesion in each ovary was quantified by ImageJ and lesion area was estimated as part of a cylinder or a sphere. To calculate the first approximation, it was estimated that the lesion had a uniform thickness of 3mm because as the needle has a diameter of 1 mm was considered an extension of the lesion 100% for each side with an injury cylinder-shaped, as described (18). To calculate the second approximation the lesion was considered as the volume of a sphere ($V=4/3*\pi*r^3$), whose radius is equal to the square root of the area calculated from ImageJ over π ($r=\sqrt{A/\pi}$).

To define the percentage of lesions in each ovary we divided the lesion volume defined by the two approaches (cylindrical and spherical) by the estimated volume by water displacement caused by the ovary.

We performed the Shapiro-Wilk test with correction of Lilliefors for review of normal results. As the results did not show a normal distribution and to compare the variables (both features as outcomes) between the right ovary (800J) and left (1600J), was applied the Wilcoxon Signed Ranks Test. To compare the ovarian volume in three different moments (ultrasound, after slaughter and after formalin) we used the Friedman test. The correlation between ovarian volumes obtained by ultrasound, after slaughter and after formal was evaluated by Spearman correlation coefficient. For all tests will be considered statistically significant when $P \leq 0.05$. All analyzes will be done through the data processor SPSS 19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

This experiment was performed in accordance to the Brazilian College of Animal Experimentation (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA) and was approved by the Ethics Committee of the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#110072).

Results

The ovary cauterization was performed in 11 female cattle with 2-3 years old and average weight of 466 (± 23.3 SD) kg. The ecographic characteristics of the ovaries, the volume measured by ultrasound, on the day of slaughter and after 10 days in 10% formalin are shown in table 1. At the right ovaries, 5 had 1 follicle larger than 10mm and one had 2 follicles, and 6 had a luteous body. In the left ovaries, 4 had 1 follicle larger than 10mm, 4 had 2 follicles larger than 10mm and 4 had a luteous body. The characteristics of right and left ovaries were similar, being possible

to compare both after the use of different energies (volts) for ovarian cauterization (table 1).

The correlation between the different methods for determining the ovarian volumes is shown in Figure 2. There was a strong correlation ($r = 0.841$) between the volumes of ovarian after slaughter (measured by volume displacement of water) and after formalin. The volume estimated by ultrasound did not correlate with other measures being significantly higher ($p = 0.003$).

From 22 cauterized ovaries just two did not show lesions, due to problems during ovarian collection at slaughterhouse, where these two ovaries were sectioned and a small piece of each was left to examination. The LO of cow SB1RA and RO of cow 6351 was sectioned and no lesion could be identified in the pieces left. Although the total thermal dose delivered was 800 J (4 x 5s x 40W) on the right side and 1600 J (4 x 5s x 80W) on the left, no lesion could be found in the needle path. The 20 ovaries showed macroscopic and histological lesions as expected (figure 3). The microscopic histological lesion characteristic two days after cauterization is identified as hemorrhage, necrosis and perivascular infiltration of neutrocytarian cells (16, 19, 20).

The measures of the areas calculated by estimates of volume cylindrical showed a median of 1.12% in the right ovary and 1.65% in the left ovary. When the estimate was calculated by spherical shape, the medians were 1.77% in the right ovary and 3.06% in the left ovary. There was a statistically significant difference in these two estimates, the lesion area of the right ovary (800J) and left (1600J) (p

<0.05) shown in figure 4. The amount of tissue cauterized, when sphere $p=0.008$ and when cylinder $p=0.021$.

Discussion

The ultrasound TVOD proved effective and safe in this experimental model. Cows present themselves as a suitable experimental model due to the similarity of the ovaries size and location in the vaginal vault and the characteristic of the estrous cycle, similar to that of women (18, 21). All animals submitted to the procedure showed typical macroscopic and microscopic lesions due to monopolar ovarian cauterization, without lesions found in the needle path.

The ovarian volume measured by ultrasound was quite different from the other two measurements. This results is compatible with the study from Brett and cols. that demonstrated a lack of precision in ovarian volume measurement by 2D and 3D ultrasound, which is greater for lower ovarian volumes (22). The authors advise that the error possibility should be taken into account when making clinical decision. The ovarian volumes measured after slaughter and after formalin were correlated, as expected.

There are only two studies reporting the amount of histological damage after ovarian drilling procedures. El-Sheikhan *et al* (2004) demonstrated lesions between 0.38 and 1 % of the ovary (in 42–45 year-old patient without PCO) using 4 (800 J) and 8 (1600J) punctures of 40 W over 5 seconds that are removed immediately after

drilling (20). Hendriks *et al* compared the extent and characteristics from tissue damage in bovine ovaries (*in vitro*) after bipolar, monopolar or carbon dioxide laser ovarian drilling (18). The bipolar electrocoagulation resulted in significantly more ovarian destruction than CO₂ laser and monopolar electrocoagulation. The damaged with CO₂ and monopolar was approximately 0.2–1.0 cm³ in *in vitro* cow ovaries (18). These results are not comparable to the present study because the amount of energy was not comparable, and the study was *in vitro*. Vascularized tissue probably results in less damage than that produced *in vitro*, as differences in water content and heat sink effect might reduce the lesion (23).

This is the first publication addressing the *in vivo* ovarian damage 48hs after drilling. The extent of damage in the right ovary (800J) varies between 1.12–1.77% and in the left ovary (1600J) between 1.65–3.06%. The smaller cow ovaries, as the ovaries from women above the age of 40 years (20) could be more resistant to thermal damage compared to the soft large polycystic ovaries full of small micro and macrocysts in a younger women. The inflammatory response and the tissue reaction 48h after drilling even with 1600J were around 5% of the cow ovary, as patients with polycystic ovarian disease have an increased ovarian volume (>10cm³), the extent of ovarian injury is expected to be even smaller, especially with the use of non-aggressive protocols (<800J) as proposed by Amer *et al* (10). This amount of destruction will not cause premature ovarian failure, which is one of ovarian diathermy concern (24).

Another concern is the presence of periovarian adhesions after drilling. Mercorio *et al* described in second look laparoscopy high incidence of adhesion

formation after LOD (25). Hendriks *et al* demonstrated that the cylinder shaped lesion from the monopolar electrocautery reduce ovarian surface lesions compared to the cone of laser drilling (18). It is supposed that the greater the ovarian surface damage, higher the risk of periovarian adhesions (18). On the other hand Taskin *et al* associated adhesions in LOD with the CO₂ pneumoperitonium (11), that is not required in TVOD.

TVOD performed in PCO women with ovaries around 10cm³, using the expertise and safety of the transvaginal puncture for oocyte capitation (26) should be easier than in cows, and probably a simple and feasible approach as Syrirtsa suggested in 1998 (15).

Conclusions

This experimental animal model described for ovarian cauterization needle guided by transvaginal ultrasound seems to be adequate. The cattle are an ideal animal model to study this technique: their ovaries are similar to woman and ease to identify by transvaginal ultrasound. The safe and effectiveness of this technique, theoretically less invasive, could be tested in anovulatory women with PCOS.

Acknowledgements

We would like to thank the Veterinary Fabrício Desconsi Mozzaquatro who helped with the cattles. This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470852/2009-7) and Fundo

de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp is scholarships recipients from CNPq.

References

1. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007 Aug;370(9588):685-97.
2. Strowitzki T, Capp E, von Eye Corleta H. The degree of cycle irregularity correlates with the grade of endocrine and metabolic disorders in PCOS patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Apr;149(2):178-81.
3. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008 Mar;89(3):505-22.
4. Pfeifer GK, Corleta O, Gus P. [Evaluation of computed tomographic colonography for detection of colorectal polyps]. *Arq Gastroenterol*. 2008 Oct-Dec;45(4):301-7.
5. Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, Vandekerckhove P. Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(3):CD001122.
6. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2005 Mar;352(12):1223-36.
7. Gjönnaess H. Polycystic ovarian syndrome treated by ovarian electrocautery through the laparoscope. *Fertil Steril*. 1984 Jan;41(1):20-5.
8. Donesky BW, Adashi EY. Surgically induced ovulation in the polycystic ovary syndrome: wedge resection revisited in the age of laparoscopy. *Fertil Steril*. 1995 Mar;63(3):439-63.
9. Amer SA, Li TC, Metwally M, Emarh M, Ledger WL. Randomized controlled trial comparing laparoscopic ovarian diathermy with clomiphene citrate as a first-line method of ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2009 Jan;24(1):219-25.

10. Amer SA, Li TC, Cooke ID. Laparoscopic ovarian diathermy in women with polycystic ovarian syndrome: a retrospective study on the influence of the amount of energy used on the outcome. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):1046-51.
11. Taskin O, Sadik S, Onoglu A, Gokdeniz R, Yilmaz I, Burak F, et al. Adhesion formation after microlaparoscopic and laparoscopic ovarian coagulation for polycystic ovary disease. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1999 May;6(2):159-63.
12. Zhu WJ, Li XM, Chen XM, Lin Z, Zhang L. Transvaginal, ultrasound-guided, ovarian, interstitial laser treatment in anovulatory women with clomifene-citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 2006 Jul;113(7):810-6.
13. Zhu W, Fu Z, Chen X, Li X, Tang Z, Zhou Y, et al. Transvaginal ultrasound-guided ovarian interstitial laser treatment in anovulatory women with polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial on the effect of laser dose used on the outcome. *Fertil Steril.* 2010 Jun;94(1):268-75.
14. Api M. Could transvaginal, ultrasound-guided ovarian interstitial laser treatment replace laparoscopic ovarian drilling in women with polycystic ovary syndrome resistant to clomiphene citrate? *Fertil Steril.* 2009 Dec;92(6):2039-40.
15. Syritsa A. Transvaginal ultrasound-guided electrocautery of the ovaries in infertile patients with polycystic ovarian disease. *Int J Gynaecol Obstet.* 1998 Dec;63(3):293-4.
16. Pimentel AM, Kobayashi D, Kliemann LM, Franjdlich R, Capp E, Corleta HV. Transvaginal ultrasound ovarian diathermy: sheep as an experimental model. *J Ovarian Res.* 2012;5(1):1.
17. Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 2005 Oct;20(10):2893-8.
18. Hendriks ML, van der Valk P, Lambalk CB, Broeckaert MA, Homburg R, Hompes PG. Extensive tissue damage of bovine ovaries after bipolar ovarian drilling compared to monopolar electrocoagulation or carbon dioxide laser. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):969-75.
19. Tozawa H, Brännström M, Petrucco O, Walker S, Chambers H, Pascoe V, et al. Distribution of leukocyte subtypes in the sheep ovary after laser drilling. *Hum Reprod.* 1995 Mar;10(3):544-50.
20. El-Sheikhah A, Aboulghar M, Read R, El-Hendawi E. The extent of ovarian damage produced by ovarian cauterisation in the human. *J Obstet Gynaecol.* 2004 Sep;24(6):664-6.
21. Vigne JL, Halburnt LL, Skinner MK. Characterization of bovine ovarian surface epithelium and stromal cells: identification of secreted proteins. *Biol Reprod.* 1994 Dec;51(6):1213-21.

22. Brett S, Bee N, Wallace WH, Rajkhowa M, Kelsey TW. Individual ovarian volumes obtained from 2-dimensional and 3-dimensional ultrasound lack precision. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):348-51.
23. Api M. Is there any difference among the most frequently used laparoscopic ovarian drilling techniques? *Fertil Steril*. 2009 Jun;91(6):e9; author reply e10.
24. Tulandi T, al Took S. Surgical management of polycystic ovarian syndrome. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1998 Dec;12(4):541-53.
25. Mercurio F, Mercurio A, Di Spiezio Sardo A, Barba GV, Pellicano M, Nappi C. Evaluation of ovarian adhesion formation after laparoscopic ovarian drilling by second-look minilaparoscopy. *Fertil Steril*. 2008 May;89(5):1229-33.
26. Ludwig AK, Glawatz M, Griesinger G, Diedrich K, Ludwig M. Perioperative and post-operative complications of transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval: prospective study of >1000 oocyte retrievals. *Hum Reprod*. 2006 Dec;21(12):3235-40.

Legends

Table 1. Characteristics of the ovaries from 11 cows.

Figure 1. Needle developed for transvaginal ovarian cauterization: (a) the needle; (b) the connexion for eletrocautery; (c) the distal tip not insulated.

Figure 2. Correlation of ovarian volumes after ultrasound, after slaughter and after formal.

Figura 3. Ovaries images: (a) ovaries of animal 6333 after slaughter showing the macroscopic lesions of left ovary and right ovary; (b) ovarian sections of animal 6333 after formal; (c) SB2 right ovarian histology (40X), after hematoxylin-eosin staining – red circle, normal ovary; red arrow, hemorrhagic area in the border of the lesion; blue arrow, center of the lesion with necrosis due to coagulation; (d) 6333 right ovarian histology (40X), after hematoxylin-eosin staining.

Figure 4. Box-and-whisker plot of the mean tissue damage at the ovaries. Lesions estimated by cylinder or sphere. The *upper line* of the box represents the upper quartile, the *thick line* in the middle represents the median, and the *lower line* represents the lower quartile.

Table 1

	Right ovary (SD)	Left Ovary (SD)
Volume at ultrasound (cm ³)	27.79 (12.62) ^a	19.51 (6.21) ^b
Volume after slaughter (cm ³)	10.27 (6.3)	11.45 (4.8)
Volume after formal (cm ³)	8.25 (5.75)	8.03 (5.18)
Presence of Follicles > 10 mm (n)	7	12
Presence of luteous body (n)	6	4

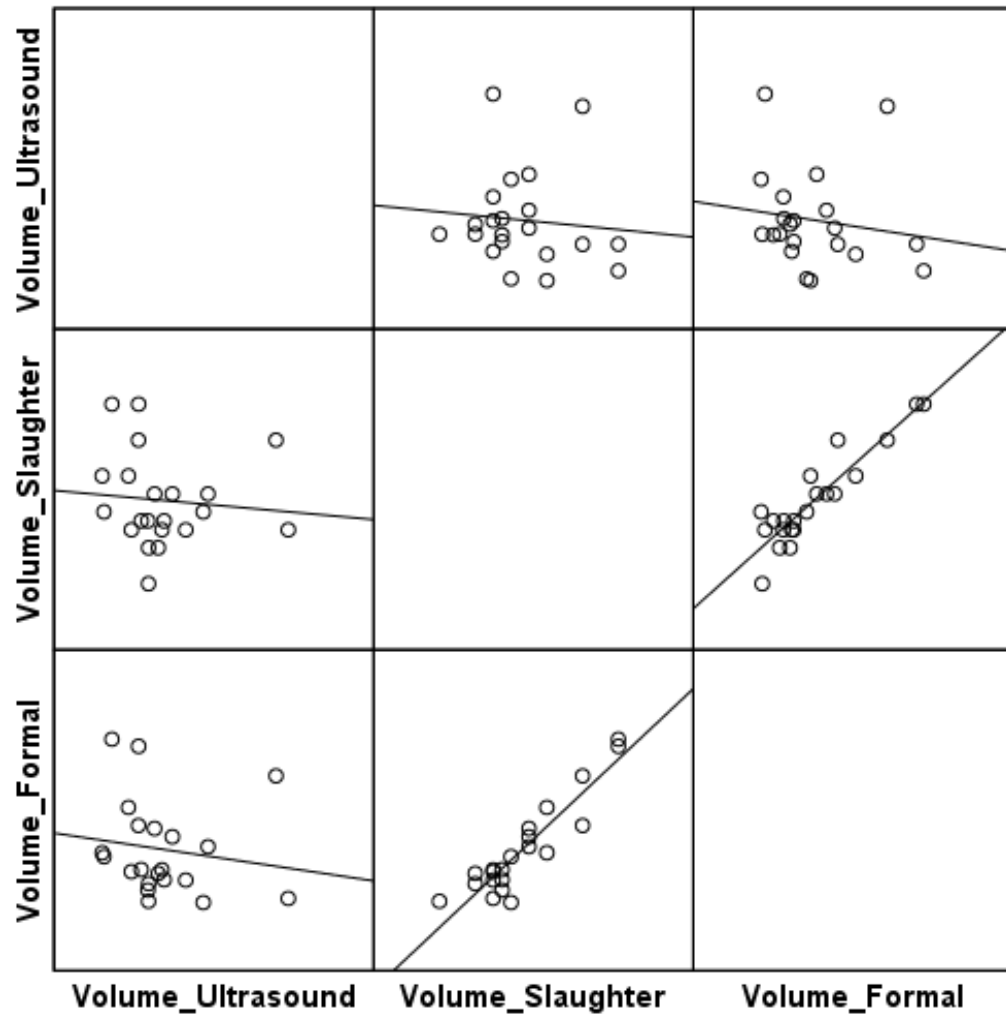
Volume at ultrasound was statistically different from the other two volumes measured (^ap=0.003; ^bp<0.000).

OBS: There were 11 ovaries at the day of the procedure (ultrasound) and after slaughter there were 10 ovaries at each side.

Figure 1



Figure 2



Correlation coefficient = 0,841

Figure 3

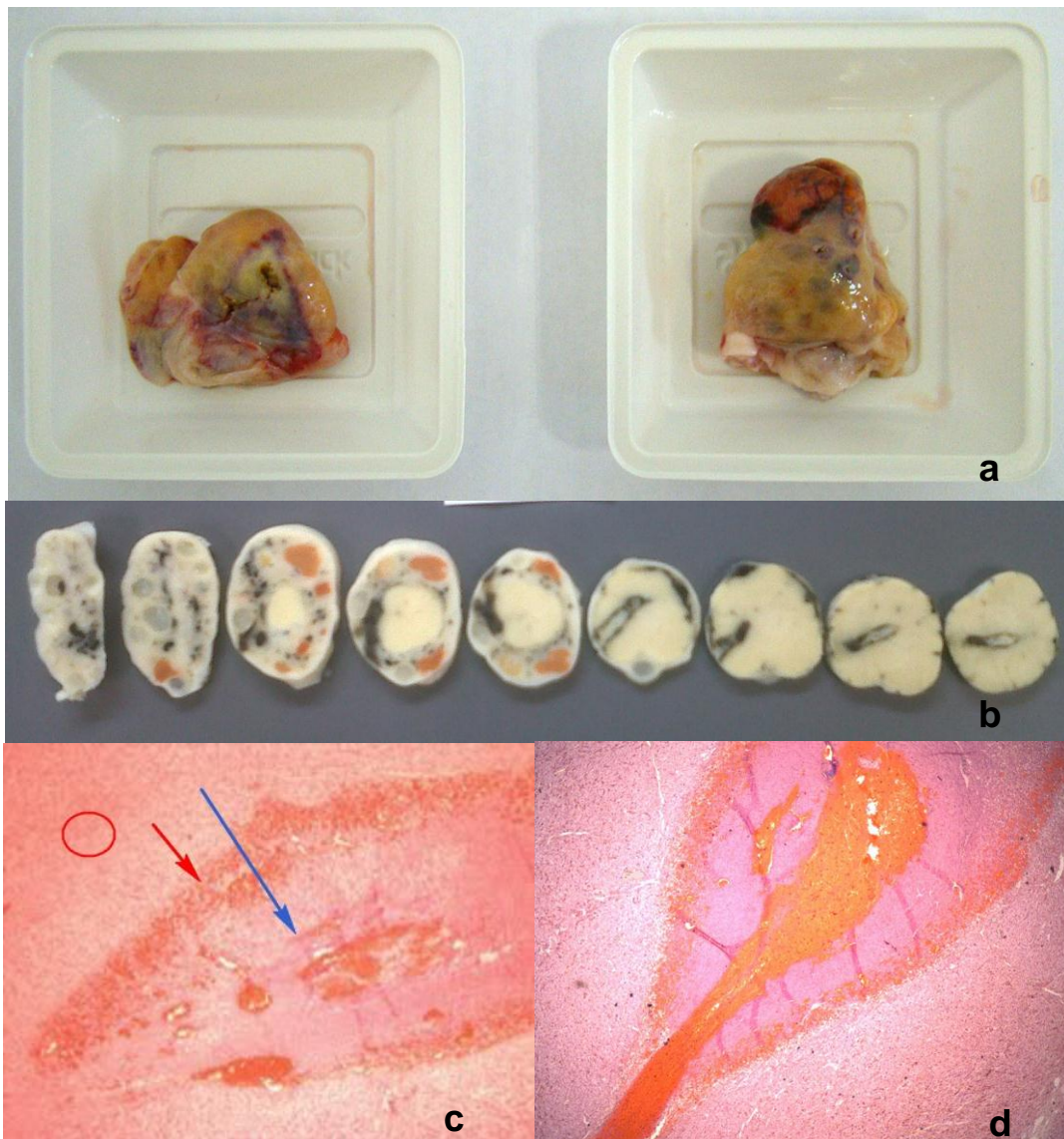
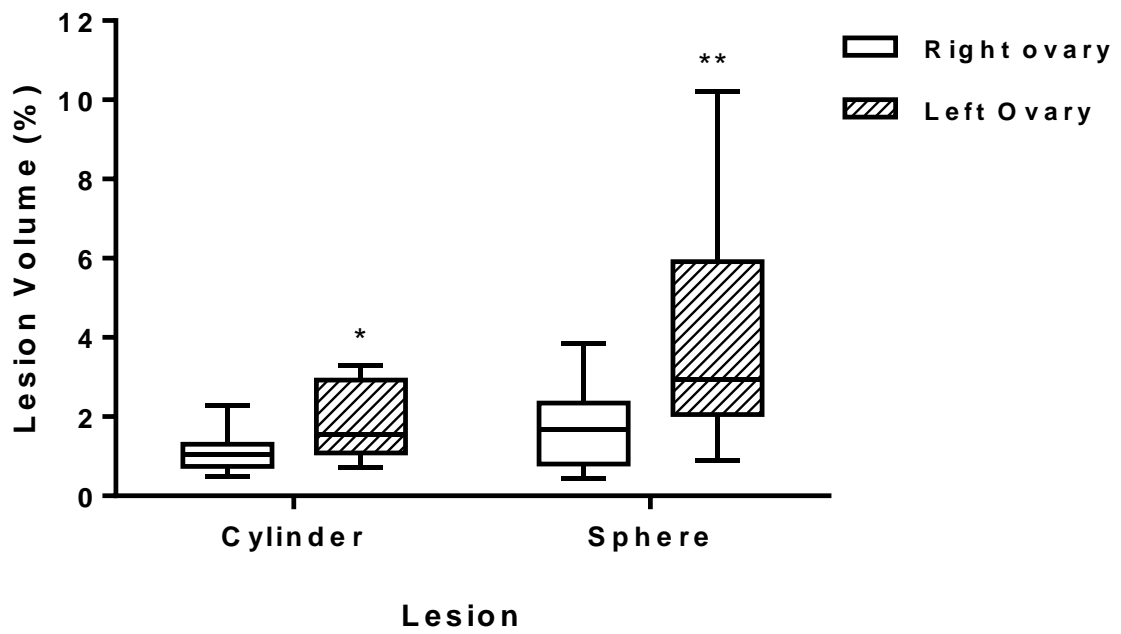


Figure 4



Lesion at the different estimates were statistically different from the two ovaries (* $p=0.021$ and ** $p=0.008$).

Considerações Finais

A indução cirúrgica da ovulação é uma das possibilidades de tratamento em pacientes com síndrome dos ovários policísticos. A diatermia ovariana por ecografia transvaginal é menos invasiva do que a cauterização realizada por videolaparoscopia. Este procedimento não necessita de anestesia geral, apenas sedação e tem menor custo. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental visando testar esta abordagem em mulheres.

Em animais de médio porte (ovelhas), com ovários pequenos, a cauterização não foi possível pela difícil identificação ecográfica do ovário. Contudo, quando realizada em vacas (animais de grande porte), foi possível identificar ecograficamente os ovários e cauterizá-los. Para este trabalho foi desenvolvida uma agulha especial revestida com material isolante e deixada apenas a ponta com capacidade de cauterização. Nos animais avaliados não houve lesões extraovarianas no trajeto da agulha, demonstrando a segurança da técnica.

A perspectiva é a utilização desta técnica em mulheres com anovulação por SOP resistentes ao citrato de clomifeno. Provavelmente, a experiência na punção ovariana para captação de oócitos e o volume ovariano das pacientes com SOP tornará este procedimento mais fácil em mulheres.

