

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE  
OÓCITOS HUMANOS PRÉ E PÓS-VITRIFICAÇÃO EM  
PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***



**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de  
Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos  
do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**Maria das Graças Rocha de Santana Camargos**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE  
OÓCITOS HUMANOS PRÉ E PÓS-VITRIFICAÇÃO EM  
PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

**Belo Horizonte**  
**2013**

**Maria das Graças Rocha de Santana Camargos**

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE  
OÓCITOS HUMANOS PRÉ E PÓS-VITRIFICAÇÃO EM  
PROCEDIMENTOS DE FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para o título de Doutor.

Linha de pesquisa: Técnicas de Reprodução Assistida

Orientador: Professor Doutor Fernando Marcos Reis.

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina – UFMG**

**2013**

Aos amores da minha vida

Aroldo, André e Marcelo

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Aroldo, exemplo de força e determinação que me impulsionou , apoiou e ajudou durante todo o trabalho, com carinho, incentivo, e competência.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, meu orientador, pela paciência, apoio e incentivo constantes na execução deste trabalho.

A Bióloga e amiga Verônica Nere de Magalhães Lobach, pela valiosa ajuda na execução deste trabalho e por constante incentivo nas horas difíceis

A Dra. Claudia Navarro Carvalho Duarte Lemos, a Dra. Ines Damasceno Cavallo e ao Dr. Francisco de Assis Nunes Pereira, meus amigos, que tanto me ajudaram nas horas difíceis, sempre me incentivando e apoiando.

Ao Bioquímico Marco Aurélio Fernandes Vieira que sempre estava disposto a ajudar em qualquer momento e em qualquer hora.

A Secretária Juliana Alves Oliveira, Enfermeira Edna Câmara Sant'Anna pelos suportes técnicos e administrativos e apoio constante.

A todo o corpo clínico do Laboratório de Reprodução Humana, professores, médicos e residentes pela seleção das pacientes e constante incentivo.

As técnicas de enfermagem Cristiane, Tábita e Maria Helena pelo cuidado com as pacientes.

Aos meus filhos André e Marcelo por me ensinarem a acreditar, a lutar e a seguir em frente mesmo quando tudo parecia difícil.

As minhas filhas/sobrinhas Renata e Fernanda por estarem sempre presentes mesmo estando distantes, acompanhando e incentivando com carinho.

A toda minha família pelo carinho, apoio e força durante a realização deste trabalho.

A Deus por iluminar o meu caminho e me acompanhar nesta difícil jornada.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi correlacionar as alterações morfológicas e morfométricas de oócitos humanos antes e após a vitrificação. Também, avaliar se as características morfométricas de oócitos pré-vitrificação estão relacionadas à sobrevivência dessas células para criopreservação e verificar se as características morfométricas após o descongelamento de oócitos estão relacionadas à ocorrência de fertilização, após a ICSI. **PACIENTES E MÉTODOS:** os voluntários envolvidos neste estudo foram pacientes do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas - UFMG, que foram submetidos à indução da ovulação para reprodução assistida. O estudo incluiu 28 pacientes e 71 oócitos vitrificados. Os oócitos foram identificados na placa de cultura usando-se lupa estereoscópica. Os oócitos foram deixados numa incubadora de CO<sub>2</sub> durante pelo menos uma hora, fotografados para avaliação morfológica e morfométrica e vitrificados individualmente, seguindo o protocolo da *Irvine Scientific*. Medições e avaliações de oócitos, zigotos e embriões nos segundo e terceiro dias de cultura foram realizadas utilizando-se *software* Cronus TM. As seguintes características morfológicas dos oócitos foram avaliados: grânulos citoplasmáticos, a fragmentação do corpo polar, inclusões citoplasmáticas e vacúolos. **RESULTADOS:** não houve correlação entre as características morfológicas e morfométricas dos 71 oócitos avaliados antes de vitrificação. Os diâmetros dos oócitos e as medidas do espaço perivitelino (EPV), zona pelúcida (ZP) e corpúsculo polar (CP) foram semelhantes nos oócitos classificados como morfologia ótima (n=40) e naqueles com morfologia alterada (n=31). De 49 oócitos descongelados, 22 haviam degenerado e 27 ficaram preservados, incluindo 20 com ótima morfologia e sete com morfologia abaixo do ideal. Enquanto o diâmetro do oócito, as medidas do EPV e ZP foram semelhantes nos oócitos descongelados e com a morfologia ótima e de qualidade inferior, o último grupo mostrou significativa redução da medida de CP (11,8 [10,5-13,0] µm *versus* 13,2 [12,2-15,3] µm P=0,013). Os parâmetros morfométricos de oócitos frescos não foram preditivos de sobrevivência do oócito para vitrificação e descongelamento. Dos 27 oócitos que sobreviveram ao processo de criopreservação e submetidos à ICSI, 13 foram fertilizados. Os diâmetros de oócitos após o descongelamento foram menores nos oócitos fertilizados (76,0 [73,0-78,3] µm), em comparação com aqueles que não fertilizaram (80,5 [73,9-82,6] µm, P=0,043). Este último grupo também apresentou EPV menor. **CONCLUSÃO:** as características morfológicas e morfométricas de oócitos frescos não estão relacionadas com a sua resistência à vitrificação. No entanto, após o descongelamento, a falha da fertilização está associada a oócitos de diâmetro maior e EPV menores.

Palavras-chave: Criopreservação de oócitos. Vitrificação, descongelamento, morfologia do oócito e morfometria. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

## ABSTRACT

The aim of this study was to correlate oocyte morphological and morphometric changes before and after vitrification, to evaluate if the morphometric characteristics of oocytes pre-vitrification are related to the survival of these cells to cryopreservation and to verify whether the morphometric characteristics after thawing of oocytes are related to the occurrence of fertilization after ICSI.

**PATIENTS AND METHODS:** The volunteers involved in this study were patients admitted to the Professor Aroldo Fernando Camargos Laboratory of Human Reproduction at Hospital das Clínicas – UFMG who underwent ovulation induction for assisted reproduction. The investigation included 28 patients and 71 vitrified oocytes. Oocytes were identified in the culture dish using magnifying stereomicroscope. The oocytes were left in a CO<sub>2</sub> incubator for at least 1 hour, photographed for morphological and morphometric evaluations and then vitrified individually following the protocol of Irvine Scientific. Measurements and ratings of oocytes, zygotes and embryos in the second and third days of culture were performed using Cronus Software TM. The following morphological features of oocytes were assessed: cytoplasmic granules, polar body fragmentation, cytoplasmic inclusions and vacuoles. **RESULTS:** There was no correlation between morphological and morphometric characteristics of the 71 evaluated oocytes before vitrification. The oocyte diameters and the measurements of perivitelline space (PS), zona pellucida (ZP) and polar body (PB) were similar in oocytes classified as optimal morphology (N=40) and those with altered morphology (N=31). Out of 49 thawed oocytes, 22 had degenerated and 27 were preserved, including 20 with optimal morphology and 7 with suboptimal morphology. While the oocyte diameter, the PS and ZP measurements were similar in thawed oocytes with optimal and suboptimal morphology, the latter group showed a significant reduction of the measure of PB (11.8 [10.5 to 13.0]  $\mu\text{m}$  *versus* 13.2 [12.2 to 15.3]  $\mu\text{m}$  P=0.013). The morphometric parameters of fresh oocytes were not predictive of oocyte survival to vitrification and thawing. Of the 27 oocytes that survived the cryopreservation process and underwent ICSI, 13 were fertilized. The diameters of oocytes after thawing were lower in the fertilized oocytes (76.0 [73.0 to 78.3]  $\mu\text{m}$ ) compared to those not fertilized (80.5 [73.9 to 82.6]  $\mu\text{m}$ , P=0.043). The latter group also had shorter PS. **CONCLUSION:** The morphologic and morphometric characteristics of fresh oocytes are not related to their resistance to vitrification. However, after thawing, fertilization failure is associated with larger oocyte diameter and shorter PS.

Key words: Oocyte cryopreservation. Vitrification, thawing oocyte morphology and morphometry. Intracytoplasmic sperm injection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHO	Bloqueio hipotalâmico ovariano
BLST	Blastômero
cAPM	Adenosina monophosfato cíclica
CG	Células da granulosa
CL	Congelamento lento
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CP	Corpúsculo polar
CPF	Corpúsculo polar fragmentado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Solução de diluição
E	Espermatozoide
EG	Etilenoglicol
EPV	Espaço perivitelino
ES	Solução de equilíbrio
ESCA	Esterelidade sem causa aparente
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOP	Falência ovariana prematura
G	Granulações
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IC	Inclusão citoplasmática
ICSI	Injeção intracitoplasmática
IU	Inseminação intrauterina
LH	Hormônio luteinizante
LHRH	Hormônio liberador de hormônio luteinizante
LN <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido

LRH	Laboratório de Reprodução Humana
MCL	Massa Celular Interna
N	Nucléolo
Na	Não avaliada
OF	Óvulos frescos
PH	Pipeta de Holding
PI	Pipeta de injeção
PN	Pronúcleo
PROH	Propanodiol
PVP	Polivinilpirridona
QT	Quimioterapia
R-hCG	Alfa-coriogonadotrofina recombinante
rpm	Rotação por minuto
RT	Radioterapia
SSS	Soro sintético substituto
STB	Salpingotripsia bilateral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TS	Solução de descongelamento
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Vacúolo
VS	Solução de vitrificação
WS	Solução para lavar
ZP	Zona pelúcida

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

FIGURA 1 - Protocolo para vitrificação de oócito em metáfase II (Cryo Tip).....	50
FIGURA 2 - Protocolo para preenchimento da palheta Cryo Tip.....	51
FIGURA 3 - Protocolo para descongelamento Cryo Tip.....	55
FIGURA 4 - Medidas pré e pós-vitrificação do diâmetro do oócito.....	56
FIGURA 5 - Corpúsculo polar (CP).....	57
FIGURA 6 - Características morfológicas dos oócitos.....	58
FIGURA 7 - Oócitos que sobreviveram após o descongelamento.....	59
FIGURA 8 - Oócitos que degeneraram após o descongelamento.....	60
FIGURA 9 - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide, oócito em metáfase II.....	62
FIGURA 10 - Disposição dos pronúcleos.....	63
FIGURA 11 - Disposição dos nucléolos.....	64
FIGURA 12 - Disposição dos pronúcleos em relação ao corpúsculo polar.....	64
FIGURA 13 - Embriões no segundo e terceiro dia de cultivo.....	66

### Gráficos

GRÁFICO 1 - Morfometria pré-vitrificação de oócitos classificados como morfologia ótima (n=40) e alterada (n=31).....	69
GRÁFICO 2 - Morfometria pós-descongelamento de oócitos preservados e classificados como morfologia ótima (n=7) e alterada (n=20).....	70
GRÁFICO 3 - Morfometria pré-vitrificação de oócitos que resultaram preservados (n=27) e degenerados (n=22) ao fim do processo de criopreservação.....	72
GRÁFICO 4 - Morfometria pós-descongelamento de oócitos que resultaram fertilizados (n=13) e não fertilizados (n=14) após criopreservação, descongelamento e ICSI.....	74

GRÁFICO 5 - Variação de medidas obtidas pré-vitrificação e pós-descongelamento de oócitos que resultaram fertilizados (n=13) e não fertilizados (n=14).....	75
---	----

**Quadros**

QUADRO 1 – Resultados de criopreservação de oócitos dos trabalhos publicados entre 1996 e 2007, totalizando 52.....	32
QUADRO 2 – Resumo dos recentes estudos clínicos que investigaram congelamento lento ou vitrificação de oócitos.....	37
QUADRO 3 – Resumo do estudo controlado randomizado comparando oócito fresco <i>versus</i> vitrificado.....	39
QUADRO 4 – Classificação do zigoto.....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características clínicas dos participantes do estudo.....	46
TABELA 2 - Número de casos de acordo com o tipo de diagnóstico.....	46
TABELA 3 - Características da amostra.....	46

# SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Princípios da criopreservação.....	18
1.2 Características morfológicas dos oócitos.....	23
1.2.1 Células do <i>cumulus-oophorus</i> .....	23
1.2.2 Zona pelúcida.....	24
1.2.3 Espaço perivitelino.....	25
1.2.4 Corpúsculo polar.....	25
1.2.5 Ooplasma.....	26
2 OBJETIVOS.....	43
3 PACIENTES E MÉTODOS.....	44
3.1 Pacientes.....	44
3.1.1 Critérios de inclusão.....	44
3.1.2 Critérios de exclusão.....	44
3.2 Métodos.....	45
3.2.1 Características da amostra.....	45
3.2.2 Hiperestimulação ovariana controlada.....	47
3.2.3 Aspiração folicular.....	47
3.2.4 Protocolo de vitrificação.....	48
3.2.4.1 Descongelamento de oócito vitrificado.....	52
3.2.4.2 Protocolo de descongelamento.....	53
3.2.5 Avaliação morfométrica dos oócitos.....	56
3.2.5.1 Diâmetro do oócito.....	56
3.2.5.2 Zona pelúcida.....	57
3.2.5.3 Espaço perivitelino.....	57
3.2.5.4 Corpúsculo polar.....	57

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

3.2.6 Avaliação morfológica dos oócitos.....	58
3.2.6.1 Preparo do sêmen.....	60
3.2.7 Técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	61
3.2.8 Avaliação morfológica dos zigotos.....	63
3.3 Análise estatística.....	66
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Correlação entre morfologia e morfometria dos oócitos antes e após a vitrificação.....	68
4.2. Morfometria dos oócitos pré-vitrificação e sua relação com a sobrevivência à criopreservação.....	71
4.3 Morfometria dos oócitos pós-descongelamento e sua relação com a fertilização.....	73
5 DISCUSSÃO.....	76
5.1 Correlação entre morfologia e morfometria dos oócitos antes e após a vitrificação.....	76
5.2 Morfometria dos oócitos pré-vitrificação e sua relação com a sobrevivência à criopreservação.....	79
5.3 Morfometria dos oócitos pós-descongelamento e sua relação com a fertilização.....	80
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE E ANEXO.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços no tratamento do câncer têm permitido taxas de sobrevida cada vez mais elevadas, estando as sobreviventes expostas às consequências da quimioterapia (QT) e/ou radioterapia (RT), como a falência ovariana prematura (FOP)<sup>1,2</sup>.

A elevada taxa de sobrevida tem gerado acentuado interesse na qualidade de vida dessas pacientes, o que deve incluir a manutenção da capacidade de constituir e criar uma família<sup>3</sup>.

A manutenção da capacidade reprodutiva em pacientes submetidas à RT e QT para tratamentos de neoplasias malignas, doenças autoimunes - como o lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide - e ooforectomias bilaterais em casos de endometriose levou ao desenvolvimento de procedimentos para preservação da fertilidade feminina, destacando-se: o uso de medicamentos inibidores de apoptose e que levam à quiescência ovariana, a transposição ovariana, a criopreservação de tecido ovariano, xenotransplante, autotransplante, criopreservação de óvulos e criopreservação de embriões<sup>3</sup>.

A primeira gravidez anunciada, de embrião criopreservado, descongelado e transferido, ocorreu em 1983<sup>4</sup>.

O primeiro nascimento obtido a partir de oócito congelado foi em 1986. As primeiras fertilizações realizadas por fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) foram em 1978 e 1995, respectivamente<sup>5</sup>.

Para pacientes que vão se submeter a tratamentos de FIV, criopreservar oócitos excedentes pode evitar repetidas estimulações ovarianas e coletas ovulares ou pode ser fonte de doação de oócitos. Um banco de oócitos viabiliza um *screening* mais adequado das doadoras, tornando a ovodoação procedimento mais seguro.

Em estudo incluindo 47 doadoras e 57 receptoras, foram vitrificados 693 oócitos e a taxa de sobrevivência foi de 96,1% (destes, 487 - 73,1% - fertilizaram-se e 170 embriões foram transferidos para 57 receptoras). A taxa de gravidez por

transferência foi de 63,2% e de implantação de 38,5%, com 28 nascidos vivos, 4,2%<sup>6</sup>.

Em outra publicação, foram coletados oócitos imaturos de uma portadora de ovário policístico durante o ciclo menstrual natural; 16 de 18 oócitos coletados encontravam-se em fase de vesícula germinativa e foram maturados; 17 oócitos foram vitrificados e quatro sobreviveram ao descongelamento; três embriões foram transferidos e um gerou um nascido vivo<sup>7</sup>.

Tem sido preconizado o uso de criopreservação de oócito para situações em que existe a possibilidade de aceleração da atresia folicular, como nos casos de mosaico da síndrome de Turner e para mulheres que querem adiar a sua maternidade<sup>8</sup>.

Entretanto, deve-se considerar que os gametas envelhecem com a mulher. O risco de uma mulher não ter filhos quando procria com idades de 20 a 24 anos é de 5,7%; de 25 a 29 anos é de 9,3%; de 30 a 34 anos é de 15,5%; de 35 a 39 anos é de 29,6%; e de 40 a 44 anos é de 63,6%<sup>9</sup>.

A vitrificação de oócitos pode ser uma opção para pacientes que possuem elevado número de oócitos e, dependendo do país, somente um número limitado de oócitos pode ser inseminado<sup>10</sup>.

A criopreservação de oócitos também pode ser útil nos casos esporádicos em que não se pode colher sêmen no dia da coleta ovular. E pode ser uma alternativa para evitar os problemas éticos e religiosos causados quanto à criopreservação de embriões<sup>11,12</sup>.

Prevenir gravidez múltipla é o maior desafio em pacientes que fazem tratamento com estimulação ovariana para inseminação intrauterina (IIU). Estudo-piloto tentou minimizar gravidez múltipla, realizando aspiração folicular de oócitos de folículos extranumerários antes da inseminação intrauterina, e avaliar o benefício da vitrificação desses oócitos para uso futuro. Foram submetidas 31 pacientes à aspiração de folículos extranumerários, sendo vitrificados 112 oócitos dos. Pacientes com ovário policístico obtiveram 6,07 oócitos vitrificados e as que não possuíam ovário policístico obtiveram 1,3 oócito vitrificado por ciclo. O tratamento de IIU resultou em taxa de gravidez clínica de 23,5% por ciclo. Todas as gestações foram únicas. Concluiu-se que a coleta de oócitos excedentes antes da IIU em ciclos estimulados reduz a taxa de cancelamento, diminui o risco futuro

de gravidez múltipla e leva à gravidez adicional futura utilizando os oócitos excedentes que foram vitrificados<sup>13</sup>.

Durante tratamentos de fertilização assistida, muitos oócitos podem ser coletados e, conseqüentemente, vários embriões podem ser gerados e parte deles criopreservada.

Os principais processos utilizados em criopreservação de oócitos, embriões e espermatozoides podem ser descritos em três categorias: congelamento lento, vitrificação e congelamento rápido. O congelamento lento é realizado utilizando-se concentrações iniciais baixas do crioprotetor, o que se associa à baixa toxicidade enquanto o oócito está sob temperatura que permite manter o seu metabolismo. O metabolismo celular se reduz 50% cada vez que a temperatura baixa 10°C. Na vitrificação, o crioprotetor é permeável e adicionado em altas concentrações. O congelamento é feito de maneira rápida para evitar que o crioprotetor cause toxicidade ao oócito. A vitrificação possui benefícios, como a não formação de cristais de gelo, porque promove o decréscimo da temperatura com muita rapidez, o que permite o uso de altas concentrações de crioprotetores e com menos efeito tóxico para o oócito<sup>14</sup>.

As variáveis que influenciam a eficácia da vitrificação são: tipo e concentração do crioprotetor, temperatura da solução de vitrificação no momento da exposição ao oócito, duração da exposição final do crioprotetor antes de colocá-lo dentro do nitrogênio líquido, tipo de dispositivo usado na vitrificação, qualidade do oócito e a realização sem o auxílio de máquinas de congelamento<sup>15</sup>.

A criopreservação dos oócitos apresenta alguns desafios:

- a) O volume celular do oócito é grande e a relação superfície celular/volume celular é muito pequena, o que torna a sua desidratação difícil. A membrana celular do oócito é diferente da dos embriões; as membranas dos embriões facilitam a passagem de crioprotetores e água, o que possibilita a desidratação, levando à pequena formação de cristais de gelo e, logo, mais sobrevivência. O aumento da distensibilidade da membrana dos embriões permite mais tolerância à pressão plasmática durante o descongelamento; por isso, embriões são mais tolerantes do que oócitos aos processos de congelamento e descongelamento<sup>16,17</sup>.

- b) O aumento da espessura da zona pelúcida e a liberação prematura de granulações corticais podem ocorrer durante o congelamento dos oócitos, entretanto, esses achados são superados com emprego da ICSI.
- c) Os oócitos, quando vão ser congelados, encontram-se em metáfase II, com o sistema do fuso organizado; o fuso meiótico consiste de microtúbulos construídos por polímeros de tubulina; os microtúbulos iniciam em um polo central e ancoram os cromossomos em um outro polo, permitindo o alinhamento destes no plano equatorial. A lesão do fuso pode levar à dispersão dos cromossomos e à falência da fertilização ou à parada do desenvolvimento. Existe um tempo necessário para permitir a repolarização adequada do fuso, portanto, as inseminações realizadas duas a três horas após a incubação melhoram a fertilização. A desorganização ou o desaparecimento do fuso meiótico pode causar aneuploidias ou poliploidias. Se o fuso se desintegrar, não ocorrerá a extrusão do corpúsculo polar e, logo, poliploidia (dois pronúcleos femininos e um masculino). Lesões menores causam aneuploidia. Oócitos congelados no estágio de vesícula germinativa têm baixas taxas de lesão do aparelho do fuso, induzidas pela criopreservação, entretanto, devem sofrer maturação in vitro.
- d) Existe a possibilidade de indução de partenogênese e dano mitocondrial; a seleção dos oócitos para congelamento é muito difícil, exceto em caso de manifestações grosseiras de dimorfismo e heterogeneidade da morfologia dos oócitos (zona pelúcida espessa, granulosidade do citoplasma, aumento do espaço perivitelino ou fragmentação do primeiro corpúsculo polar). A inabilidade em predizer qual é o oócito de boa qualidade leva à dificuldade em demonstrar a capacidade do mesmo em desenvolver um bom embrião<sup>18</sup>; as gestações com oócitos criopreservados são dependentes do tempo; a maioria dos investigadores insemina os oócitos entre uma e quatro horas após a coleta ovular. Com o congelamento lento, após três horas de incubação consegue-se fertilização de 59% e clivagem de 91%. Com a vitrificação, a sobrevivência foi de 63 a 92% de quatro a seis horas e clivagem de 60 a 77%<sup>19-20</sup>.
- e) Os primeiros nascidos de criopreservação de oócito não apresentaram aumento de incidência de cariótipos anormais ou de malformações

congênitas; os números são baixos e necessitam de análise a longo prazo<sup>21</sup>.

Encontram-se relatos de mais de 500 bebês nascidos de criopreservação de oócito; a taxa de nascidos vivos por oócitos era em torno de 5 a 6%<sup>22</sup>. A técnica de congelamento por vitrificação era considerada promissora em 2008<sup>23</sup>.

A melhor escolha para a preservação da fertilidade seria criopreservar embriões antes dos tratamentos radioterápico e quimioterápico<sup>24</sup>.

O método clássico para criopreservar embriões é o protocolo de congelamento lento utilizando-se uma máquina específica de congelamento com programa para cada fase do embrião; entretanto, a tendência atual é usar a vitrificação. Isso porque:

- a) Durante o congelamento lento cristais de gelo são formados causando efeito deletério na célula.
- b) A formação de cristais de gelo intracelular pode danificar a parede e estruturas celulares.
- c) Um balanço entre esses fatores deve ser mantido durante o processo de congelamento lento para garantir a sobrevivência da célula.

Outra variável importante é a qualidade oocitária para garantir a sobrevivência após o descongelamento. Quanto melhor a qualidade do oócito, melhor será a taxa de sobrevivência.

O estágio de maturação também é importante, porque melhora a taxa de sobrevivência e de fertilização. Geralmente o ócito é congelado em fase de metáfase II<sup>25</sup>.

### **1.1 Princípios da criopreservação**

Para estocar células com sucesso em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , são necessários seguir os seguintes critérios:

- a) Deter o metabolismo da célula de forma reversível.
- b) Manter a integridade estrutural e genética da célula.
- c) Alcançar taxas aceitáveis de sobrevivência após o descongelamento.

- d) Manter competência de desenvolvimento após o descongelamento.
- e) Aplicar técnicas confiáveis<sup>26</sup>.

Criopreservar material biológico inclui seis passos principais:

- a) Exposição inicial ao crioprotetor (a água intracelular deve ser removida por desidratação gradual).
- b) Congelar lento/rápido até temperatura abaixo de zero (-196°C).
- c) Estocar em temperaturas baixas.
- d) Descongelar/aquecer reidratando gradualmente.
- e) Diluir e remover o agente crioprotetor e substituir o fluido intracelular e extracelular em tempo preciso.
- f) Recuperar e retornar a célula ao ambiente fisiológico<sup>26</sup>.

Vitrificação é um processo no qual alta concentração de solução de crioprotetores solidifica-se durante o congelamento sem a formação de cristais de gelo, em um fluido supercongelado e com alta viscosidade. O aumento da viscosidade celular utilizando agentes crioprotetores em altas concentrações e congelamento da célula em baixas temperaturas evita a formação de gelo. A estratégia básica para vitrificar células e tecidos é aumentar a velocidade da condutividade térmica e diminuir a concentração dos crioprotetores para reduzir o potencial de toxicidade. Existem dois principais caminhos para se alcançar a vitrificação da água dentro da célula com mais eficiência: utilizar materiais que possuem rápida transferência de calor e usar recipiente especial (palheta) que permita o uso de pequenos volumes de crioprotetor contendo a célula para que possa ser congelada rapidamente. Existem três principais objetivos na criopreservação de oócitos: evitar a formação de cristais de gelo, evitar o efeito tóxico da solução crioprotetora e evitar choque osmótico<sup>27</sup>.

Quando a água é congelada abaixo do ponto de congelamento, ela se solidifica e forma cristais de gelo. Devido ao gelo ser menos denso do que a água, é necessário que os cristais de gelo ocupem um volume maior do que o volume da água, partindo do ponto em que foi formado. O volume da água dentro da célula solidifica-se e se expande em forma de gelo, causando pressão nas organelas intracelulares, as quais podem sofrer consideráveis danos<sup>28</sup>.

O choque osmótico pode ocorrer durante o descongelamento rápido, quando a célula encolhe e aumenta de tamanho para acomodar alterações da pressão osmótica extracelular. Isso pode causar deformidades no oócito e danos no citoesqueleto. Durante o processo de reidratação, choques osmóticos podem causar excessivo aumento da célula, ruptura da membrana, lise e morte celular. Esses danos podem estar relacionados à despolimerização dos microtúbulos, alinhamento inadequado dos cromossomos e aumento do risco de aneuploidia<sup>28</sup>.

Agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação das células. Os crioprotetores são substâncias com alta solubilidade em água e toxicidade proporcional à sua concentração e temperatura<sup>29</sup>.

Crioprotetores reduzem a concentração eletrolítica em meios não congelados. A adição de crioprotetores reduz a quantidade de água que cristaliza. A eficácia dos crioprotetores depende da temperatura que vai ser adicionada ao meio de congelamento<sup>25</sup>.

Basicamente, existem dois grupos de crioprotetores: penetrantes e não penetrantes..

- a) Crioprotetores penetrantes: são pequenas moléculas que penetram nas membranas das células. Elas formam ligações de hidrogênio com as moléculas da água, prevenindo a formação de cristais de gelo. Em baixas concentrações em água, os crioprotetores diminuem a temperatura de congelamento da mistura resultante. No entanto, em concentrações elevadas, eles inibem a formação de cristais de gelo e levam ao desenvolvimento de um sólido tipo vidro, chamado de estado vitrificado, em que a água é solidificada, mas não expandida. Os agentes penetrantes são: glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido<sup>30</sup>.
- b) Crioprotetores não penetrantes: os crioprotetores não penetrantes permanecem fora da célula. Eles agem extraíndo a água da célula, desidratando o espaço intracelular. Como resultado, quando são usados em combinação com os crioprotetores penetrantes, a concentração de líquido do crioprotetor penetrante aumenta no espaço intracelular. Durante o descongelamento, a água gerada pelo gelo derretido diminui rapidamente a pressão osmótica extracelular. Choque osmótico pode ocorrer se o crioprotetor intracelular não pode difundir-se rapidamente o suficiente para

evitar excessivo influxo de água livre e a ruptura ou inchaço da célula. Os agentes não penetrantes são: sacarídeos, proteínas e polímeros<sup>30</sup>.

O principal componente da solução de vitrificação é o agente penetrante. Esses compostos são hidrofílicos, não eletrolíticos e possuem grande efeito desidratante. A toxicidade desses agentes é o fator limitante em criobiologia. Por serem tóxicos, evita-se o uso de altos níveis desses aditivos. A toxicidade pode ser manifestada na forma de danos celulares (toxicidade osmótica e formação de gelo) durante a criopreservação. Diferentes crioprotetores têm sido testados para verificação do grau de toxicidade. Etilenoglicol é o crioprotetor menos tóxico, seguido do glicerol. Esses crioprotetores penetrantes são também mais fáceis de difundirem-se para fora da célula, fazendo com que a célula alcance seu volume original mais rápido, prevenindo, assim, danos osmóticos. O crioprotetor mais utilizado em procedimentos de vitrificação é o etilenoglicol (EG). O EG é mais usado em uma mistura equimolar com dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>26</sup>.

Dissacarídeos são adicionados a soluções de vitrificação, como, por exemplo, à sacarose. A sacarose não penetra na membrana celular, mas ajuda a extrair a água para fora da célula por osmose, reduzindo o tempo de exposição da célula aos efeitos tóxicos dos crioprotetores. A sacarose (agente não penetrante) também age como tampão osmótico para reduzir choque osmótico que pode resultar da diluição do crioprotetor após estocagem. Durante o descongelamento usando alta concentração de sacarose (ex: 1.0 M), contrabalança a alta concentração do agente crioprotetor na célula, reduzindo a diferença na osmolaridade entre o compartimento intra e extracelular. A alta concentração de sacarose não pode prevenir a célula de aumentar de tamanho, mas pode reduzir a velocidade e intensidade desse aumento<sup>26</sup>. O oócito é uma célula com curto período de vida, que precisa se submeter à fertilização para continuar sobrevivendo e desenvolver-se.

Para a fertilização ocorrer naturalmente, o oócito deve preservar a integridade das suas características estruturais. Essas características incluem zona pelúcida, grânulos corticais e fuso microtubular. Na criopreservação ocorre prematura liberação dos grânulos corticais, criando, assim, um bloqueio à penetração do espermatozoide. Pode também danificar a zona pelúcida,

resultando em penetração de múltiplos espermatozoides. Esses dois casos podem ser superados com o emprego da técnica de ICSI<sup>27</sup>.

O fuso microtubular é a estrutura na qual os cromossomos estão alinhados no oócito maduro (metáfase II) e são responsáveis pelo movimento desses cromossomos durante a divisão celular. O ácido desoxirribonucleico (DNA) materno é mantido suspenso no citoplasma no fuso meiótico, portanto, danos nos microtúbulos podem explicar o limitado sucesso em criopreservar oócitos. O fuso meiótico é extremamente sensível à temperatura. Se houver perda dos microtúbulos, os cromossomos podem se espalhar e causar aneuploidia. O oócito está detido em determinado estágio preparado para ser ativado. Trocas em seu ambiente podem causar ativação partenogênica. Possíveis danos causados nos oócitos após criopreservação: fratura da zona pelúcida, oócito escuro, contraído e citoplasma picnótico. A picnose (condensação da cromatina nuclear) é um processo que indica a necrose do tecido. Eventualmente pode haver fragmentação do núcleo picnótico<sup>27</sup>.

Os principais dispositivos usados em vitrificação são:

- a) Suportes abertos: Pulled Straws®, CryoLoop®, CryoEM®, Cryolea® e CryoTop®. O risco de contaminação devido ao uso de suportes abertos para vitrificação limita o uso desses dispositivos para células humanas e tecidos, de acordo com regulamentações europeias.
- b) Suportes fechados têm sido introduzidos com o intuito de reduzir o risco de contaminações. Infelizmente o uso dos suportes fechados diminui a velocidade de congelamento, necessitando aumentar a concentração de crioprotetores para garantir a mesma taxa de sobrevivência<sup>27</sup>.

O Cryotop®: foi introduzido por Kuwayama e é utilizado por muitos laboratórios para vitrificar oócitos e embriões. O *kit* contém o equipamento de Cryotop®, um tubo de plástico equipado com uma capa protetora para ser manipulado e estocado com segurança e os meios de cultura para lavar, equilibrar, vitrificar, descongelar e diluir. Essas soluções são baseadas em TCM199, meio de cultivo suplementado com soro sintético substituto (SSS) contendo etilenoglicol e DMSO como agentes penetrantes; e sacarose como agente não penetrante<sup>31,32</sup>.

Luccena *et al.* obtiveram taxa de 89,2% de sobrevivência de oócitos após vitrificação usando *cryotop*, taxa de gravidez de 56,5% (13 de 23 pacientes) com média de 4,63 embriões transferidos por paciente<sup>32-33</sup>.

## 1.2 Características morfológicas dos oócitos

### 1.2.1 Células do *cumulus-oophorus*

Durante o desenvolvimento folicular antral, as células do *cumulus* são células da granulosa especializadas que envolvem o oócito.

As células do *cumulus* são instrumentos, via *gap junctions*, que nutrem o oócito durante o crescimento e possivelmente passam fatores inibidores, como adenosina monofosfato cíclica (cAMP), necessários para a manutenção da meiose. A camada de células mais profunda das células do *cumulus* é chamada de corona. Essa camada se expande e apresenta aspecto radiante quando o oócito está maduro, em resposta à gonadotrofina coriônica humana (hCG) exógena ou ao surgimento do hormônio luteinizante (LH) no meio do ciclo. Existe interdependência entre células do *cumulus* e oócito comprometendo a qualidade do oócito quando ocorre a maturação do oócito sem a presença de células do *cumulus*<sup>34</sup>.

As células do *cumulus* também dependem do oócito para diferenciação, regulação e funções normais. Projeções celulares especializadas (das células do *cumulus* para a superfície do oócito) permitem uma ligação física e fechada com o oócito. Um componente essencial do complexo *cumulus oophorus* é a matriz extracelular na qual as células do *cumulus* penetram. A ovulação é um evento complexo que implica a secreção e regulação da matriz extracelular, levando à expansão do *cumulus*. Esse processo provê o ambiente necessário para a penetração do espermatozoide e eventual fertilização. O complexo *cumulus oophorus* pode ser classificado e avaliado por meio de microscópio. O oócito pode ser classificado como maduro (metáfase II) quando possui um complexo *cumulus/corona* expandido. Um complexo *cumulus/corona* menos expandido corresponde a um estágio intermediário de maturidade (metáfase I)<sup>34</sup>.

A ausência de expansão do complexo *cumulus*/corona está associada à imaturidade (prófase). Remover as células do *cumulus* para a realização da ICSI dentro de duas a quatro horas após a coleta ovular é importante para a completa maturação do oócito. Prorrogar o tempo de cultura do oócito antes da ICSI pode permitir, para aqueles oócitos que estão um pouco imaturos quando foram puncionados, completar o seu amadurecimento<sup>34</sup>.

### 1.2.2 Zona pelúcida

A zona pelúcida é a camada da matriz extracelular que envolve o oócito diretamente. O desenvolvimento normal dos folículos e dos oócitos depende da integridade da zona pelúcida. A zona pelúcida possui importante papel na fertilização, permitindo a interação do espermatozoide/óocito na reação acrossômica e no bloqueio à poliespermia. A zona pelúcida é composta de uma glicoproteína que reveste o oócito. Mudanças nessas camadas desencadeadas pela ação de um único espermatozoide ligado a seus receptores induzem a liberação dos grânulos corticais. As enzimas liberadas dos grânulos corticais agem como ligações cruzadas de glicoproteínas da zona pelúcida, impedindo a penetração de outro espermatozoide.

A introdução da ICSI permitiu não só o tratamento da infertilidade masculina e a habilidade de tratar falhas de fertilização, como também a identificação da variação da morfologia da zona pelúcida. Elevado número de variantes da zona pelúcida tem sido descrito (aparência, largura, irregularidades, composição e organização) com o advento da ICSI. Zona pelúcida espessa tem sido associada à baixa taxa de fertilização, implantação e gravidez<sup>35,36</sup>.

A forma dinâmica da zona pelúcida também foi avaliada, medindo a variação de sua espessura ao longo de sua circunferência. Quanto mais variável a espessura, melhor a qualidade dos embriões<sup>37</sup> e melhor a taxa de implantação e gravidez<sup>38</sup>.

Estudos utilizando microscópio polarizado para detectar variações na organização da zona pelúcida têm relacionado esses achados com resultados embrionários e clínicos<sup>39,40</sup>. O uso desse microscópio permite a identificação das três camadas da zona pelúcida, mostrando a diferença entre elas em diversos

estágios de maturação do oócito. Avaliações da zona pelúcida no dia da coleta ovular indicam uma relação positiva entre a espessura da camada mais interna, embriões de boa qualidade e taxa de gravidez.

A zona pelúcida possui importante papel até o estágio de blastocisto, quando o embrião necessita sair da zona pelúcida para implantar no epitélio uterino. Nessa fase, uma zona pelúcida mais fina pode refletir-se na habilidade de o embrião fazer o *hatching* e implantar-se com sucesso. *Assisted hatching* é algumas vezes utilizado para facilitar a saída do embrião da zona pelúcida. Seu emprego restringe-se a casos específicos como aborto repetitivo, idade materna avançada e repetidas falhas de implantação<sup>38</sup>.

### 1.2.3 Espaço perivitelino

O espaço perivitelino representa o compartimento acelular entre a membrana plasmática do oócito e a zona pelúcida. Em um oócito maduro o espaço perivitelino (EPV) pode ser distinguido e em oócitos imaturos ele não pode ser visualizado<sup>41</sup>.

Estudo retrospectivo mostra a correlação entre EPVs largos e declínio na taxa de fertilização e qualidade embrionária<sup>42</sup>, enquanto outros mostram uma lacuna nessa correlação<sup>43-44</sup>.

Tem *et al.* salientaram que a espessura do EPV não influencia na taxa de fertilização, mas melhora a qualidade embrionária em oócitos com EPVs largos. Não há consenso sobre quando o EPV acessado sozinho pode predizer qualidade oocitária<sup>45</sup>.

### 1.2.4 Corpúsculo polar

O oócito está estacionado em fase de diacinese da prófase I até o nascimento. Retém um núcleo (vesícula germinal) até a ovulação, o qual é exposto ao LH, desencadeando a continuação da meiose. Após a ruptura da vesícula germinal, anáfase e telófase assumem e o primeiro corpúsculo polar faz a extrusão. O oócito permanece, então, no estágio de metáfase II até a

fertilização. Análise citogenética dos corpúsculos polares utilizando *fluorescent in situ hybridization* (FISH) permite predizer o estado parcial ou total dos cromossomos do oócito. Corpúsculos polares podem ser usados para *screening* de mutações e deleções de mitocôndrias, como também para diagnóstico genético antes da fertilização sem necessidade de biópsia embrionária<sup>46</sup>.

Apesar da biópsia do corpúsculo polar ser mais vantajosa pelo fato de as informações serem adquiridas ainda no processo de cultura, existem limitações que devem ser consideradas. Somente a contribuição genética materna pode ser estudada. A separação das cromátides durante a meiose II pode ocorrer, necessitando, então, da análise do segundo corpúsculo polar. Os cromossomos do corpúsculo polar são curtos, o que faz a técnica ser mais difícil. Problemas técnicos como perda de cromossomos e falha na hibridização devem ser levados em consideração na análise dos corpúsculos polares<sup>47</sup>.

### 1.2.5 Ooplasma

Para que o oócito tenha boa qualidade, maturação nuclear e citoplasmática deve ocorrer de maneira sincronizada. A maturação nuclear refere-se à continuação da meiose e à progressão até a fase de metáfase II, que está estacionada até a hora da ovulação. Mesmo que o oócito possua a competência nuclear, ele ainda pode estar deficiente em maturação citoplasmática, a qual se refere ao processo de preparar o oócito para ativação, fertilização e desenvolvimento embrionário. Com a introdução da ICSI, a remoção das células do *cumulus* permitiu a observação direta das características morfológicas dos oócitos por meio do microscópio. Algumas características são observadas, como a presença ou ausência de granulósidas, coloração, existência de vacúolos, inclusões citoplasmáticas e organelas<sup>48-49-50</sup>.

Mais de 50% dos oócitos humanos possuem pelo menos uma dessas características morfológicas<sup>51</sup>.

Um oócito de boa qualidade possui um citoplasma claro com granulação moderada e sem inclusões citoplasmáticas. Um oócito com ooplasma escuro diminui 83% da probabilidade de obter um embrião de boa qualidade<sup>52</sup>.

Vacúolos e aglomerado de retículo endoplasmático parecem ser as características que mais prejudicam a capacidade de desenvolvimento. Poucos estudos falam do impacto negativo dos vacúolos nos oócitos, mas a maioria deles revela influência negativa na taxa de fertilização e no desenvolvimento até estágio de blastocisto<sup>53,55</sup>.

A primeira gravidez após criopreservação de oócito foi realizada por Chen, em 1986. Esse pesquisador usou protocolo de congelamento lento acrescido do crioprotetor DMSO. Obteve elevada taxa de sobrevivência e fertilização de 80 e 83%, respectivamente, em amostra de 40 oócitos. Durante 10 anos após os estudos de Chen, pesquisadores tentaram repetir as taxas de Chen, mas poucos nascimentos foram reportados<sup>56,58</sup>.

Estudo foi realizado para investigar se a ICSI melhorava a taxa de fertilização em oócitos humanos após sobreviverem à criopreservação. Foram criopreservados 220 oócitos obtidos de voluntárias que tinham se submetido à estimulação ovariana. Para isso, usou-se congelamento lento e descongelamento rápido, utilizando propanodiol como crioprotetor; 34,4% dos oócitos sobreviveram e foram divididos em grupo 1 (FIV) e grupo 2 (ICSI). A taxa de fertilização no grupo 1 foi de 13,5% e no grupo 2 foi de 45,9%. O autor concluiu que a ICSI mostrou melhor taxa de fertilização em oócitos congelados quando comparada à FIV, sugerindo que, de acordo com outros autores, a criopreservação causa danos na zona pelúcida, impedindo a penetração de espermatozoide ou permitindo a ocorrência da poliespermia. A técnica da ICSI pode efetivamente ultrapassar esse bloqueio da fertilização normal<sup>59</sup>.

Relevante experiência com oócitos humanos criopreservados foi publicada na Itália<sup>60,61</sup>. Seus métodos usaram protocolo de congelamento lento e descongelamento rápido usando 1,5 M *propanodiol* PROH e 0,2 M sacarose como crioprotetores penetrantes e não penetrantes, respectivamente. No trabalho inicial, 338 oócitos de 23 mulheres com infertilidade por fator tubário foram criopreservados. A taxa de sobrevivência dos oócitos foi de 59,5%, independentemente do tempo em que os oócitos ficaram criopreservados (24 horas X 2 a 4 meses) ou da presença ou ausência de *cumulus* (62 X 52%, respectivamente). A taxa de fertilização usando ICSI foi de 64,4% e a de clivagem, de 90,8%. O resultado encontrado nesse estudo foi de três gravidezes e um nascido vivo. Trabalho subsequente consistiu em 1.769 oócitos

criopreservados de 96 pacientes. Desses oócitos, 1.502 foram descongelados, com taxa de sobrevivência de 54,1%, taxa de fertilização de 57,7% utilizando ICSI e taxa de clivagem de 91,2%. Ocorreram 16 gravidezes, com nove partos de 11 crianças saudáveis (sete únicas e duas gemelares). Altas taxas de sobrevivência de oócitos criopreservados foram obtidas quando esses oócitos foram criopreservados em 0,3 mol/L X 0,2 mol/L sacarose (60 X 82%) e quando o tempo de exposição ao crioprotetor foi mais longo (10,5 para 15 minutos)<sup>60,61</sup>.

Estudo teve como objetivo verificar o efeito da presença de *cumulus oophorus*, a concentração de sacarose na solução de congelamento e o tempo de exposição da solução crioprotetora na sobrevivência de oócitos após o descongelamento. Teve a finalidade, também, de avaliar a eficiência do protocolo de congelamento lento/descongelamento rápido usado. Alguns danos foram responsáveis pela lacuna do sucesso em preservar oócitos humanos, como, por exemplo, danos no fuso meiótico, instabilidade dos cromossomos, microfilamentos essenciais para a extrusão do corpúsculo polar, migração pronuclear e citocinese, quebra e endurecimento da zona pelúcida e reação cortical prematura. O principal problema envolvendo a criopreservação de oócitos foi a taxa de sobrevivência após o descongelamento. A taxa de sobrevivência pode ser afetada por fatores morfológicos e biofísicos. Fatores morfológicos: presença ou ausência de *cumulus oophorus*. Fatores biofísicos: formação intracelular de cristais de gelo causando lise da célula. O oócito humano é uma célula grande que contém representativa quantidade de água e requer mais tempo para alcançar a desidratação (balanceada osmoticamente pela solução do crioprotetor) antes da temperatura ser diminuída. Com isso, é difícil evitar a formação de cristais de gelo.

Neste trabalho não houve diferença estatisticamente significativa entre oócitos criopreservados com remoção parcial do *cumulus* ou *cumulus* totalmente removido. Oócitos expostos à alta concentração de sacarose tiveram alta taxa de sobrevivência.

O primeiro nascimento proveniente de oócito vitrificado foi relatado por Kuleshova *et al.*, em 1999. Foram vitrificados 17 oócitos utilizando etilenoglicol (40%) e 0,6 M/L em *pallets* abertas<sup>62</sup>.

O primeiro alto número de oócitos vitrificados foi publicado por Yoon *et al.*, em 2003. Foram criopreservados 477 complexos *cumulus oophorus* (oócitos

imaturos e maduros) utilizando vitrificação com 5,5 M etilenoglicol e 1,0 M sacarose como crioprotetor. A taxa de sobrevivência foi de 68%, de fertilização foi de 71,7%, de implantação foi de 6,4% e de gravidez clínica e nascidos vivos por transferência foi de 6/21 (21,4%)<sup>63</sup>.

Usou-se combinação de etilenoglicol, PROH e sacarose para vitrificar 189 oócitos em Cryoleaf. Os investigadores conseguiram taxa de sobrevivência desses oócitos de 93,9%, taxa de fertilização de 74,6%, taxa de implantação de 20,4% e taxa de gravidez clínica por paciente de 7/15 (46,7%). O número médio de embriões transferidos ( $3,6 \pm 1,3$ ) foi relativamente alto, visto que o grupo das pacientes era de jovens, possuindo  $31,7 \pm 3,7$  de idade<sup>64</sup>.

Oócitos foram vitrificados pelo método Cryotop combinando etilenoglicol e sacarose como crioprotetores. Cryotop consiste em um filme fino transparente de polipropileno acoplado em *plastic handle* e equipado com uma *pallet* a qual pode ser preenchida com oócitos contendo pequeno volume (aproximadamente 0,1  $\mu$ L) de meio de vitrificação. De 64 oócitos vitrificados, 90,8% sobreviveram e 89,6% fertilizaram-se. A taxa de gravidez por transferência foi de 41,4% e a taxa de nascidos vivos e gravidez em andamento foi de 10/29 (34,5%)<sup>65</sup>.

Outra pesquisa que também utilizou o método Cryotop de vitrificação relatou taxa de 13/23 (56,5%). A maioria das transferências foi feita com oócitos de doadoras e o número de oócitos transferidos foi alto (quatro a cinco). Desde o final de 1990, o número de nascimentos provenientes de oócitos criopreservados tem aumentado rapidamente<sup>66</sup>.

Metanálise de 58 trabalhos entre 1986 e 2008 indicou o total de 936 nascimentos de oócitos criopreservados. Comparando com anomalias congênitas que ocorrem em crianças concebidas naturalmente, nenhuma diferença foi registrada em oócitos criopreservados<sup>67-68</sup>.

Revisão de 2003 tentou responder questões pendentes relacionadas ao congelamento de oócitos em tecnologias de reprodução assistida. Os autores concluíram que os oócitos humanos possuíam arquitetura delicada, mas poderiam ser criopreservados. Embora existissem poucos dados clínicos, crianças saudáveis poderiam nascer de oócitos criopreservados, indicando embriões com cromossomos normais. Conhecimentos empíricos e teóricos seriam necessários para melhoria dos protocolos de congelamento. Concluíram que o congelamento de oócitos não substitui o congelamento de embrião, mas poderia ser indicado em

programas de óvulo-doação, em tratamentos em que ocorria perda do ovário, em casos de objeções ao congelamento de embrião. Apesar do congelamento de oócitos em 2003 não ter sido utilizado rotineiramente em técnicas de reprodução assistida, existem pacientes que podem se adequar a essa técnica<sup>69</sup>.

Em 2007, artigo de revisão avaliou informações nos resultados clínicos e biológicos de oócitos criopreservados e também enfatizou a necessidade de rigoroso controle nas técnicas de criopreservação. Constatou-se que aplicações clínicas de criopreservação de oócitos podem estar no contexto da preservação da fertilidade em mulheres que se submetem a terapias citotóxicas ou pode ser uma alternativa para substituir a criopreservação de embriões. A eficiência clínica da criopreservação de oócitos é uma consequência do impacto acumulativo da qualidade do oócito antes de ser congelado, da sobrevivência do descongelamento e dos efeitos dos protocolos de criopreservação, os quais influenciam na qualidade do embrião e na viabilidade desse embrião após a transferência. Apesar das evidências sugerirem que o potencial de desenvolvimento pode estar comprometido devido aos protocolos de criopreservação de oócitos não serem aplicados, existe escassez de estudos rigorosamente controlados na literatura<sup>70</sup>.

Ainda em 2007, foi realizada revisão com o objetivo de: ressaltar o papel da criopreservação de oócitos na evolução clínica aplicada nas tecnologias usadas para estocar o potencial reprodutivo; rever os dados biológicos acessíveis; conhecer os efeitos da criopreservação nos oócitos que sobreviveram e suas funções; pesquisar os resultados clínicos reportados sobre o uso de oócitos criopreservados; e rever as evidências dos recentes benefícios associados a modificados enfoques. Essa pesquisa foi realizada entre 1980 e 2007 e as buscas foram no pubmed. Concluíram que, enquanto a vitrificação tinha futuro promissor, a experiência limitada dos dados reportados requeria mais confirmação. Devido ao reduzido número de nascidos com essa tecnologia, existem evidências que implicam o acompanhamento do nascimento dessas crianças, particularmente em casos envolvendo a vitrificação, em que existe carência de informações básicas nas implicações biológicas<sup>71</sup>.

Em 2008 foi realizado estudo com o objetivo de avaliar os fatores que poderiam influenciar a eficiência clínica do armazenamento de oócitos e embriões, especialmente do ponto de vista de estudos da época, que mostravam

como criopreservar oócitos. Apesar desses estudos estarem no início, alcançaram taxas de sucesso que encorajaram a sua aplicação como possível tratamento alternativo. Avanços na eficiência dos métodos de congelamento sugerem que a criopreservação de oócitos pode, logo, garantir taxas de sucesso cumulativas comparáveis às taxas obtidas das estratégias de criopreservação correntes<sup>72</sup>.

O QUADRO 1 mostra a média e a variação dos resultados de criopreservação de óvulos dos trabalhos publicados entre 1996 e 2007, totalizando 52 pesquisas<sup>73</sup>.

QUADRO 1 - Resultados de criopreservação de óocitos dos trabalhos publicados entre 1996 e 2007, totalizando 52

<b>Crioprotetor</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,1 M</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,2 M</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,3 M</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,1 M Depleção Na</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,2 M Depleção Na</b>	<b>PROH 1,5 M + sacarose 0,3 M Depleção Na</b>	<b>Vitrificação 2,7 M EG + 2,1 M DMSO + sacarose 0,5 M</b>
Número de óocitos descongelados	3537	926	4902	127	329	190	628
Sobrevivência %	50	72	74	52	62	59	91
Fertilização (ICSI)%	54	80	73	56	58	68	91
Clivagem %	85	93	90	100	86	83	92
Embrões por 100 óocitos descongelados	23	53	49	29	31	33	76
Taxa de implantação %	10	17	5	21	11	16	14
Implantação por 100 óocitos descongelados	2,3	9,1	2,4	6,1	3,4	5,3	11

DMSO: dimetilsulfóxido; EG: etilenoglicol; ICSI: injeção intracitoplasmática; M:Molar ; EG: etilenoglicol; Na: não avaliada; PROH: Propanodiol

Fonte: traduzido e adaptado de Gook e Edgar (2007)<sup>73</sup>.

Esforços para melhorar os resultados da vitrificação são focados no decréscimo dos efeitos tóxicos e osmóticos dos crioprotetores. O aumento da velocidade de congelamento e descongelamento tem sido o maior objetivo. Trocas dos parâmetros de equilíbrio têm melhorado a proteção da amostra e permitido eficiente criopreservação, incluindo oócitos maduros e imaturos, embriões de animais domésticos em estágio inicial e blastocistos humanos. Apesar da superioridade dos enfoques da criopreservação, a vitrificação ainda possui problemas técnicos, limitações financeiras e restrições legais comprometendo o conhecimento desejado. A aplicação da vitrificação em oócitos e embriões de animais domésticos e embriões humanos abriu novas perspectivas e resultados nos avanços das atuais descobertas, melhorando a eficiência e aplicações no campo da vitrificação<sup>74</sup>.

Foi realizado estudo com o objetivo de comparar dados de oócitos criopreservados de ciclos realizados em pacientes com câncer *versus* ciclos eletivos de adiamento da reprodução ou óvulo-doação. Todas as pacientes tinham 40 anos ou menos e se submeteram ao protocolo padrão de estimulação ovariana e coleta ovular. Antes da criopreservação de oócitos, o fuso meiótico e a zona pelúcida foram avaliados por meio de microscópio digital polarizado. Visibilização e avaliação do fuso meiótico e zona pelúcida podem ajudar na seleção de oócitos viáveis e na eficácia da criopreservação. O uso do microscópio polarizado permite a quantificação e avaliação da orientação dos microtúbulos dentro do fuso meiótico, como também das glicoproteínas dentro da zona pelúcida. Microscópio digital polarizado sugere que não há diferença entre oócitos criopreservados para indicações médicas em comparação com pacientes que não possuem câncer. Mulheres diagnosticadas com câncer podem produzir oócitos de boa qualidade, apesar dos estresses ocorridos durante a criopreservação<sup>75</sup>.

Pesquisa teve como objetivo reportar o sucesso de gravidez e nascimento de embriões provenientes de oócitos vitrificados descongelados e injetados com espermatozoides criopreservados de biópsia testicular. Foram vitrificados 51 oócitos em metáfase II de 11 pacientes. Após o descongelamento dos oócitos vitrificados, observou-se alta taxa de sobrevivência dos oócitos - 48 (94%) - e taxa de fertilização de 32 (66%). A taxa de gravidez clínica foi de quatro (36,4%), resultando dois nascidos vivos. Esses resultados revelam que a combinação de espermatozoides de biópsia testicular criopreservados e oócitos vitrificados pode

produzir embriões viáveis, resultando em gravidez e nascimento de crianças saudáveis.

Foram realizados estudos comparando oócitos criopreservados pelo método de vitrificação e congelamento lento, tendo em vista sobrevivência, fertilização, desenvolvimento embrionário configuração do fuso meiótico e integridade do DNA. Apurou-se que, após congelamento ultrarrápido, os oócitos recuperaram o volume celular mais rápido e a estrutura do fuso foi mais bem preservada do que os oócitos que foram criopreservados em congelamento lento. Não houve diferença em termos de fragmentação de DNA quando os dois métodos foram comparados. O método da vitrificação foi mais efetivo que o de congelamento lento, com alta taxa de sobrevivência dos oócitos<sup>76,77</sup>.

Embriões derivados de oócitos criopreservados pelo método de congelamento lento possuem desenvolvimento e implantação comprometidos quando comparados com oócitos frescos. Tentativas de criar o protocolo adequado mudando as concentrações dos crioprotetores foram feitas sem muito sucesso, tendo como expectativa que 20 a 30% dos oócitos criopreservados pelo método do congelamento lento não sobreviverão. Já o método de vitrificação reporta taxa em torno de 90% de sobrevivência de oócitos em metáfase II<sup>78</sup>.

Revisão sistemática e metanálise de estudos controlados randomizados foram realizadas para verificar a eficácia da vitrificação de oócitos em termos de sobrevivência, fertilização, desenvolvimento embrionário e taxa de gravidez. Foram incluídos cinco estudos envolvendo 4.282 oócitos vitrificados, 3.524 oócitos frescos e 361 oócitos congelados lentos entre 2005 e 2009. A taxa de gravidez em andamento, embriões de alta qualidade, clivagem embrionária e fertilização não se alterou entre os grupos de oócitos vitrificados e frescos. A taxa de sobrevivência de oócitos, taxa de fertilização, taxa de qualidade embrionária e clivagem embrionária foram mais altas nos oócitos vitrificados comparadas com as de oócitos que foram congelados lentos. Os autores apuraram que a vitrificação é um método eficiente para preservar oócitos, apesar de que mais estudos controlados são necessários para manter essa conclusão<sup>79</sup>.

Em relação aos aspectos morfológicos dos oócitos vitrificados, detectou-se que após o descongelamento a taxa de sobrevivência não foi afetada por citoplasma granuloso, vacúolos no ooplasma, espaço perivitelino alargado, granulosidades no espaço perivitelino, fragmentação do corpúsculo polar e

anormalidades na zona pelúcida. Enfatizou-se que a morfologia do oócito observada antes da vitrificação não prediz sobrevivência após descongelamento. Esse estudo avaliou 54 pacientes com total de 415 oócitos em metáfase II, vitrificados pelo método Cryotop<sup>80</sup>.

Dos 22 artigos publicados sobre nascimentos por meio de técnicas de reprodução assistida após congelamento de óvulos, que citavam informações sobre a saúde neonatal dessas crianças, foram identificadas 148 crianças geradas após o congelamento lento de óvulos e 221 crianças após a vitrificação: 25% das crianças nascidas após congelamento lento foram submetidas a exame do cariótipo e todas foram normais e também saudáveis. Em um dos estudos que usou vitrificação, com 200 crianças nascidas, o baixo peso ao nascer em gravidezes simples foi de 18%, a taxa de parto prematuro em gravidez única foi de 26% e a taxa de malformação congênita foi de 2,5%<sup>81</sup>. Saliou-se que a vitrificação apresenta melhores resultados do que o congelamento lento: sobrevivência 57,9 *versus* 78,9% ( $p < 0,0001$ ), fertilização 64,9 *versus* 72,8% ( $P = 0,027$ ), gravidez 7,6% *versus* 18,2% ( $P = 0,021$ ) e taxa de implantação 4,3 *versus* 9,3% ( $P = 0,043$ )<sup>82</sup>.

No final dos anos 90, o uso de congelamento lento resultava em uma gravidez para cada 60 a 100 óvulos congelados; no início dos anos 2000, o congelamento lento melhorou e obtinha-se uma gravidez para 13 a 18 óvulos congelados. Os relatos iniciais sobre a vitrificação, em 2005, mostravam uma gravidez para cada cinco a 13 óvulos congelados<sup>83</sup>.

Em 2009 foi feita revisão dos recentes progressos na criopreservação de oócitos, usando-se o protocolo de congelamento lento e vitrificação. Foi verificada significativa melhoria nos resultados clínicos, com altas taxas de gravidez em congelamento de oócitos em metáfase II. A taxa de gravidez clínica, de modo geral, de oócitos vitrificados continuava menos eficiente do que a estabelecida pela prática de criopreservação de embrião. A criopreservação de oócito pode ser uma alternativa viável para a preservação da fertilidade em mulheres com risco de falha prematura ovariana, devido a fatores diversos como quimioterapia gonadotóxica ou radioterapia. Existem duas técnicas para criopreservação de oócitos: congelamento lento e vitrificação. A vitrificação de oócitos ganhou popularidade como uma técnica de escolha; contudo, estudos randomizados,

controlados são necessários para estabelecer quais métodos são mais eficientes e seguros para a criopreservação de oócitos (QUADRO 2)<sup>84</sup>.

QUADRO 2 - Resumo dos recentes estudos clínicos que investigaram congelamento lento ou vitrificação de oócitos

Estudo ano	Técnica	Congelamento Oócitos (n)	Pacientes (n)	Descongelamento Oócito (n)	Ciclos Descongelados (n)	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de fertilização (%)	Taxa de clivagem (%)	Embriões Transferidos (n)	Taxa de gravidez clínica/transf. embrião(%)	Taxa de implantação (%)	Taxa de aborto (%)	Nascidos vivos (n)
Borini <i>et al.</i> (2006)	Congelamento lento	918	67	705	101	43,4	51,6	86	73	19,2	12,3	28,6	12
Levi Setti <i>et al.</i> (2006)	Congelamento lento	2900	286	1087	159	69,9	67,5	53,5	145	12,4	5,7	33,3	13
Bianchi <i>et al.</i> (2007)	Congelamento lento	1083	141	403	90	75,9	76,2	93,8	80	21,3	13,5	11,8	4
Borini <i>et al.</i> (2007)	Congelamento lento	5448	510	3238	660	68,1	76,1	91,8	590	14,9	8,1	21,6	60
Antironi <i>et al.</i> (2007)	Vitrificação	463	120	330	120	99,4	92,9	96,7	120	32,5	13,2	20,5	3
Yoon <i>et al.</i> (2007)	Vitrificação	426	28	364	NA	85,1	77,4	94,3	30	43,3	14,2	15,4	5
Antironi <i>et al.</i> (2008)	Vitrificação	NA	NA	770	NA	99	91,5	NA	NA	27,8	12,8	NA	50
Cobo <i>et al.</i> (2008)	Vitrificação	693	47	693	NA	96,1	73,1	NA	57	63,2*	38,5**	16,6	28
Sher <i>et al.</i> (2008)	Vitrificação	111	16	78	NA	96	NA	76	16	75	61	6,3	12

\*Número de sacos gestacionais/transfêrencia de embrião--- \*\*Número de sacos gestacionais/ número de embriões transferidos----- NA: não avaliado.

Fonte: traduzido de Faten *et al.* (2009)<sup>84</sup>.

A vitrificação mostrou resultados semelhantes aos dos óvulos frescos em dois estudos: o primeiro ressaltou taxas de fertilização para o grupo de oócitos criopreservados e frescos de 76,3 e 82,2%; clivagem de segundo dia de 94,2 e 97,8%; clivagem do terceiro dia de 80,8 e 80,5%; formação do blastocisto em 48,7 e 47,5%; qualidade embrionária do dia três de 80,8 e 80,5%; dos dias cinco e seis de 81,1 e 70%, respectivamente. As taxas de gravidez foram de 65,2%; de implantação, de 40,8%; de aborto, de 20%; e de gravidez em evolução, de 47,8% para o grupo de oócitos congelados<sup>85</sup>. O segundo estudo avaliou os trabalhos publicados até 2005 e enfatizou que as taxas de nascidos vivos por óvulos descongelados foram de 1,9% para congelamento lento (CL) e de 2% para vitrificação. A taxa de nascidos vivos por óvulos inseminados foi de 3,4% para CL e de 21,6% para óvulos frescos (OF). A taxa de gravidez foi de 6,6% para CL e de 60,4% para OF<sup>86</sup>.

Estudo de revisão teve o intuito de verificar os progressos alcançados na criopreservação de oócitos, utilizando vários protocolos de congelamento lento e vitrificação. Ressaltou-se significativa melhora nos resultados clínicos com taxa de gravidez alta, usando a criopreservação de oócito em metáfase II. A criopreservação de oócitos é uma alternativa viável para a preservação da fertilidade em mulheres com risco de falha ovariana prematura devido a diversos fatores como quimioterapia e radioterapia. A vitrificação de oócitos ganhou popularidade como técnica de escolha no lugar de congelamento lento. Apesar disso, estudos randomizados, controlados ainda são necessários para se estabelecer o método melhor, mais eficiente e seguro para criopreservar oócitos<sup>73-87,88</sup>.

A criopreservação de oócitos tem conseguido expressivo progresso na última década, principalmente nos últimos cinco anos. Em pacientes com câncer, a opção para preservação da fertilidade tem sido a criopreservação de oócitos. Essa técnica já não deve ser considerada experimental. Quatro ensaios controlados randomizados de oócitos frescos *versus* vitrificados/descongelados indicaram que as taxas de implantação e de gravidez clínica foram similares (QUADRO 3).

QUADRO 3 - Resumo do estudo controlado randomizado comparando oócito fresco *versus* vitrificado

	<b>Cobo 2008</b>	<b>Cobo 2010</b>	<b>Rienzi 2010</b>	<b>Parmegiani 2011</b>
População paciente	Oócitos doados	Oócitos doados	Infertilidade pacientes<43 anos (ICSI)>6 oócitos MII	Infertilidade pacientes<42 anos (ICSI)>5 oócitos MII
Nº pacientes	30 vitrificados 30 frescos	295 vitrificados 289 frescos	40 vitrificados 40 frescos	31 vitrificados 31 frescos
Idade na coleta	26	26	35	35
Nº oócitos	231 vitrificados 219 frescos	3286 vitrificados 3185 frescos	124 vitrificados 120 frescos	168 vitrificados Não frescos
Nº oócitos por coleta	18,2	11	13	Não
Sobrevivência	96,9%	92,5%	96,8%	89,9%
Taxa de fertilização	76,3 vitrificados 82,2 frescos	74% vitrificados 73% frescos	79,2% vitrificados 83,3% frescos	71% vitrificados 72,6% frescos
Nº vitrificação transferidos x frescos	3.8 vitrificados 3.9 frescos	1.7 vitrificados 1.7 frescos	2.3 vitrificados 2.5 frescos	2.5 vitrificados 2.6 frescos
Dia transferência	3	3	2	2-3
Taxa de implantação	40,8% vitrificados 100% frescos	39,9% vitrificados 40,9 % frescos	20,4% vitrificados 21,7% frescos	17,1% vitrificados Não fresco
Taxa de gravidez clínica, transferência vitrificado x frescos	60,8% (23 vitrificados transf) 100% (1transf. fresco)	55,4% vitrificados 55,6% frescos	38,5% vitrificados 43,5% frescos	35,5% vitrificados 13,3% frescos
Taxa de implantação descongelamento	6,1%	4,5%	12%	6,5%

Todos usaram o *kit* para vitrificação Cryotop, 15% EG + 15% DMSO +0,5 M sucrose.

Fonte: traduzido e adaptado de *American Society for Reproductive Medicine*<sup>89</sup>.

Apesar de uma variedade de aplicações clínicas serem sugeridas para o uso de criopreservação de oócitos, os dados para o sucesso da criopreservação de oócitos estão limitados para população de doadoras e casais inférteis com oócitos supranumerários. Enquanto as taxas de gravidez e de nascidos vivos parecem ser similares utilizando oócito vitrificado e oócito fresco de doadora em selecionadas clínicas, mais dados da eficiência e segurança em criopreservar oócitos nessa população são necessários antes de se estabelecer um banco de oócitos universal de doadoras. Para pacientes inférteis devido à quimioterapia ou a outras terapias gonadotóxicas, a criopreservação de oócitos pode ser uma das opções disponíveis e recomendadas com aconselhamento apropriado. Não há dados suficientes para recomendação de criopreservação de oócitos com o propósito de adiar a maternidade em pacientes jovens, porque não há dados suficientes que apoiem segurança, eficácia, ética, riscos emocionais e custo efetivo para essa indicação. É muito cedo para concluir que a incidência de anomalias e desenvolvimento anormal em crianças nascidas de oócitos criopreservados é similar à daquelas nascidas de embriões criopreservados.

Enquanto a criopreservação de oócitos mostra ser segura e eficiente em populações selecionadas, mais dados são necessários antes dessa tecnologia ser usada rotineiramente.

#### Recomendações:

- a) Em pacientes diante de infertilidade devido à quimioterapia ou outras terapias gonadotóxicas, a criopreservação de oócitos é recomendada com apropriado aconselhamento (nível B).
- b) Mais dados difundidos da segurança e eficácia da criopreservação de oócitos em populações de doadoras são necessários antes da recomendação de um banco universal de doadoras (nível B).
- c) Não há dados suficientes para recomendar criopreservação de oócitos com o propósito de adiar a maternidade em pacientes jovens (nível B).
- d) Mais dados são necessários antes dessa tecnologia ser usada rotineiramente para substituir a criopreservação de embriões (nível B)<sup>89</sup>.

Existem poucos trabalhos na literatura que citam morfometria de oócitos. Em 1987 foi realizado estudo em um gênero de primatas (*Saimiri sciureus*), conhecido popularmente por macaco-de-cheiro, que vivem em florestas tropicais

na América do Sul e na América Central. Esse estudo teve como objetivo observar e documentar diferenças nas dimensões da zona pelúcida de oócitos maduros e imaturos desses primatas na hora da coleta ovular. Os oócitos foram incubados e examinados três, seis, 24 e 48 horas após a coleta ovular e anotadas as mudanças morfométricas, principalmente aquelas características associadas à maturação *in vitro*. Os oócitos foram coletados por meio de laparoscopia 16 horas após a injeção de gonadotrofina coriônica humana (hCG). O microscópio utilizado para avaliação foi adaptado com uma grade calibrada que permitia ao investigador fazer medidas na zona pelúcida e no ooplasma. Foram realizadas duas medidas perpendiculares para cada oócito em cada leitura. Os resultados indicaram que os oócitos que foram classificados como maduros possuíam uma zona pelúcida espessa comparada com os oócitos imaturos. A zona pelúcida dos oócitos maduros expandiu-se no máximo até seis horas de incubação, enquanto a zona pelúcida dos oócitos imaturos reduziu-se. O diâmetro dos oócitos maduros diminuiu com o tempo, enquanto que o diâmetro do oócito imaturo permaneceu sem mudanças. A correlação entre o estado maturacional do oócito e a espessura da zona pelúcida sugere uma possível aplicação da avaliação morfológica como indicador da maturação oocitária<sup>90</sup>.

Estudo realizado em 2011 teve como objetivo determinar a capacidade de maturação, parâmetros morfométricos e morfologia de oócitos humanos em oócitos frescos maturados e oócitos vitrificados e maturados. Foram incluídas nesse estudo 93 mulheres submetidas à estimulação ovariana para procedimentos de reprodução assistida. Os oócitos imaturos (n=203) foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo (n=101) foi diretamente maturado *in vitro*; o segundo grupo (n=102) foi primeiro vitrificado e a seguir maturado. Após 48 horas de incubação os oócitos foram avaliados verificando-se taxa de maturação, como também características morfológicas e morfométricas foram acessadas e comparadas utilizando-se imagem Cronus. A taxa de maturação dos oócitos que foram vitrificados (40,4%) foi reduzida em comparação com oócitos maturados a fresco (59,4%,  $p < 0,001$ ). Em relação à morfometria, não houve diferença entre os diâmetros dos oócitos maturados a fresco e maturados após a vitrificação. Anormalidades, como vacúolos e ooplasma escuro, foram registradas em oócitos que foram maturados após a vitrificação. Os autores concluíram que oócitos maturados a fresco têm mais sucesso que oócitos maturados após

vitrificação. Nenhuma diferença estatística foi notada em relação à morfometria nos dois grupos, sugerindo que os parâmetros morfométricos não podem ser aplicados como fator prognóstico em resultados de maturação de oócitos em programas de maturação *in vitro*<sup>91</sup>.

Outra pesquisa teve como objetivo avaliar os parâmetros morfométricos de oócitos em metáfase II, incluindo diâmetro do citoplasma, espessura da zona pelúcida e espaço perivitelino, em relação à birrefringência da zona pelúcida, fuso meiótico e idade da paciente. Os oócitos foram classificados em grupos de acordo com a zona de birrefringência (baixa ou alta zona de birrefringência, respectivamente) e presença ou ausência de fuso. As medidas foram realizadas utilizando-se OCTAX *Eyeware* TM *software*. Alta zona de birrefringência mostrou uma zona pelúcida mais espessa do que baixa taxa de birrefringência. O espaço perivitelino foi mais estreito em alta taxa de birrefringência em oócitos com fuso do que em baixa taxa de birrefringência em oócitos com ausência de fuso. O diâmetro do citoplasma e a espessura da zona pelúcida decrescem linearmente com a idade da mulher. A conclusão foi de que existe associação entre zona pelúcida e birrefringência do fuso e que os parâmetros morfométricos e tamanho do oócito e espessura da zona pelúcida decrescem com a idade da mulher<sup>92</sup>.

## 2 OBJETIVOS

- Correlacionar os parâmetros morfológicos e morfométricos de oócitos pré e pós a vitrificação.
- Verificar se as características morfométricas dos oócitos pré-vitrificação estão relacionadas à sobrevivência dessas células à criopreservação.
- Avaliar se as características morfométricas pós-descongelamento dos oócitos estão relacionadas à ocorrência de fertilização após ICSI.

## **3 PACIENTES E MÉTODOS**

### **3.1 Pacientes**

As pacientes envolvidas neste estudo foram admitidas no Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) e foram submetidas à indução de ovulação conforme protocolo do serviço, descrito a seguir.

Os oócitos vitrificados estavam em estágio de metáfase II e a quantidade vitrificada foi avaliada de acordo com o número de oócitos coletados. Cada paciente deveria ter pelo menos seis oócitos para serem fertilizados e a quantidade restante avaliada para vitrificar ou não.

Todos os oócitos vitrificados foram ou serão usados em ciclos posteriores para a própria paciente que doou para a pesquisa.

#### **3.1.1 Critérios de inclusão**

- Pacientes admitidas para tratamento de infertilidade no Laboratório de Reprodução Humana, com idade entre 18 e 35 anos.
- Mais de seis oócitos na coleta após a indução da ovulação.
- Pacientes que concordaram em participar da pesquisa após serem informadas de sua natureza experimental.
- Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

#### **3.1.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes portadoras de câncer de ovário.

- Casal com o diagnóstico de fator masculino grave, necessitando de biópsia de testículo ou punção de epidídimo.
- Pacientes que, após informadas, não aceitaram as condições do projeto.

### **3.2 Métodos**

Este estudo foi aprovado pela Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (ANEXO A).

Os casais participantes do Programa de Fertilização Assistida do Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG foram incluídos no estudo somente após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O estudo foi prospectivo, descritivo e seguiu as técnicas de vitrificação, descongelamento e fertilização por ICSI.

#### **3.2.1 Características da amostra**

Participaram do estudo 28 pacientes, que totalizaram 71 oócitos vitrificados. As características clínicas dos participantes são resumidas na TAB. 1. Os diagnósticos que justificaram a necessidade de concepção assistida são relacionados na TAB. 2. Os desfechos obtidos a partir dos 71 oócitos vitrificados são listados na TAB. 3.

TABELA 1 - Características clínicas dos participantes do estudo

	<b>Média</b>	<b>Desvio-Padrão</b>	<b>Mínimo-Máximo</b>
Idade da mulher (anos)	32,5	2,1	28-36
Idade do homem (anos)	35,0	4,8	26-47
Número de folículos	15,0	7,7	7-49
Dias de estimulação ovariana	10,3	1,9	7-13
Dose total de FSH (UI)	1853	190	1500-2250

FSH: hormônio folículo-estimulante.

TABELA 2 - Número de casos de acordo com o tipo de diagnóstico

<b>Tipo de diagnóstico</b>	<b>Nº de casos</b>
Oligoastenozoospermia	11
Azoospermia obstrutiva	02
Endometriose	01
Salpingotripsia bilateral (STB)	03
Obstrução tubária	04
Esterilidade sem causa aparente (ESCA)	02
Distúrbios ovulatórios	01
SOP + fator masculino	03
Sorodiscordante	01
<b>Total</b>	<b>28</b>

TABELA 3 - Características da amostra

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
Número de oócitos vitrificados	71
Número de oócitos descongelados	49
Número de oócitos degenerados	22
Número de oócitos inseminados (ICSI)	27
Número de oócitos fertilizados (2PN)	13
Número de embriões clivados	10
Número de embriões transferidos	12
Número de gestações obtidas	01

### 3.2.2 Hiperestimulação ovariana controlada

O bloqueio hipotalâmico ovariano (BHO) realizado com análogo do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) - nafarelina - via nasal na dose de 400 mcg/dia foi iniciado no 21º dia do ciclo menstrual. Após o término do fluxo menstrual, em ciclo sob ação do LHRH, realizou-se ecografia endovaginal para diagnóstico do BHO indicado pela espessura menor que 4 mm do endométrio e ausência do crescimento folicular. Reconhecido o BHO, foi iniciada a indução do hiperestímulo com FSH recombinante (Gonal F®) na dose de 1.875 UI por paciente ou 20-30 ampolas de menotropina (FSH urinário+ LH urinário).

Uma paciente utilizou o protocolo com antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (cetorelix)+ menotropina (FSH+LH urinário) 1.800 UI.

O crescimento folicular foi acompanhado por ecografia endovaginal diária iniciada no quinto dia de uso do FSH. Quando pelo menos um folículo dominante atingiu o diâmetro de 18 mm, foi interrompido o emprego do FSH e do análogo LHRH e foi administrado o alfa-coriogonadotrofina recombinante (R-hCG) na dose de 250 mg (Ovidrel®), para maturação oocitária antes da coleta ovular.

### 3.2.3 Aspiração folicular

A paciente foi anestesiada em posição de litotomia utilizando-se propofol venoso sem intubação endotraqueal.

A punção dos folículos foi realizada aproximadamente 36 horas após a injeção de hCG, utilizando agulha de punção folicular de 17 gauges conectada a uma sonda transvaginal e a uma bomba de *Craft (Craft Suction Unit)* com pressão de 100 mmHg.

O líquido folicular foi coletado em tubos de ensaio de 15 mL (Falcon®), aquecidos e mantidos em banho-maria a seco à temperatura de 37°C.

Os oócitos foram identificados em disco de cultura usando-se lupa estereomicroscópica. Após a identificação, os oócitos foram colocados em placa de quatro poços (Nunc® Nuclon) em meio de cultivo (GIVF® Vitrolife) ou em microgotas numeradas cobertas com óleo mineral (Ovoil® Vitrolife). Esses oócitos foram deixados por duas horas em estufa de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 6% e à

temperatura de 37°C. Após esse período, as células do *cumulus* e da corona radiata dos oócitos foram retiradas com pipetas de Pauster de diferentes calibres e hialuronidase (Hyase® Vitrolife).

Os oócitos em metáfase II foram separados e quando a paciente possuía mais de seis oócitos foi realizada avaliação de quantos oócitos ela doaria para o estudo. Pelo menos seis oócitos foram utilizados para a paciente e microinjetados, conforme descrito por Steirteghem *et al.* (1993). Esses oócitos foram deixados em cultivo para desenvolvimento embrionário e futura transferência para a paciente em estudo.

Os oócitos separados para o estudo foram deixados em estufa de CO<sub>2</sub> em placas de Nunc® ou em discos de cultura em microgotas numeradas, por pelo menos 1 hora. Esses oócitos foram filmados e fotografados para futura avaliação morfológica e morfométrica.

Após esse período de 1 hora os oócitos foram vitrificados um a um seguindo-se o protocolo da *Irvine Scientific*, descrito a seguir.

### **3.2.4 Protocolo de vitrificação**

Materiais necessários utilizados:

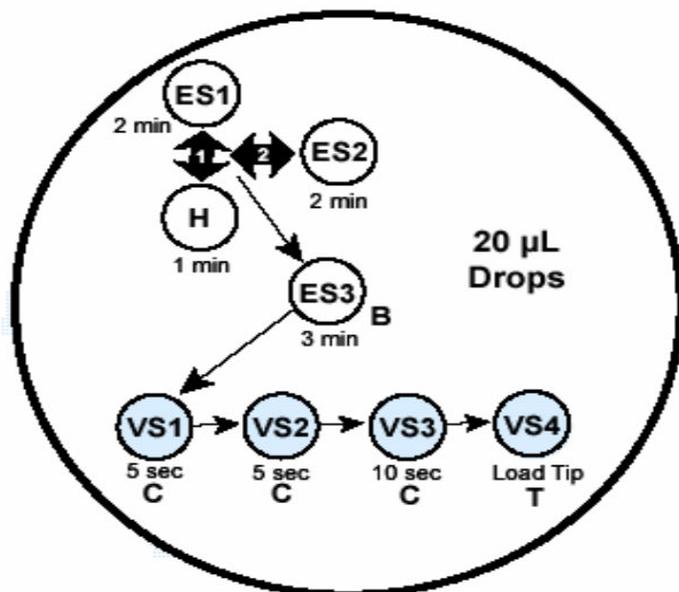
- Cryo Tip® ou *pallet* para colocar os oócitos.
- Conector.
- Seringa de 1 mL.
- Placa de Petri estéril (100 mm).
- Criocânuas para colocar as Cryo tips.
- *Kit* de Vitrificação (Vit Kit®-Freeze).
- Meio de cultivo tamponado (G Mops® Vitrolife).
- Pipetas de Pasteur.
- Pipeta de precisão.
- Ponteiras estéreis.
- Seladora.
- Nitrogênio líquido.

Componentes do Vit Kit®-Freeze:

- a) **Solução de equilíbrio (ES):** é uma solução tamponada com hepes de meio-199 e sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 7,5% (v/v) de DMSO e etilenoglicol cada e 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto do soro).
- b) **Solução de vitrificação (VS):** é uma solução tamponada com hepes de meio-199 e com sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 15% (v/v) de DMSO e etilenoglicol cada, 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento substituto do soro) e 0,5 M de sucrose.
- c) **Protocolo:** em uma placa de Petri estéril foi aplicada uma gota de 20 µL GMOPS mais HSA (proteína) e três gotas de 20 µL de ES numeradas em pontos próximos umas das outras (FIG. 1).

Essas duas soluções foram utilizadas sequencialmente de acordo com o protocolo de vitrificação por microgotas passo a passo. E assim como o GMOPS® estavam em temperatura ambiente quando foram utilizadas.

FIGURA 1 - Protocolo para vitrificação de oócito em metáfase II (Cryo Tip)



Exposição gradativa à solução equilíbrio.

H =meio tamponado de hepes + proteína (HTF-hepes com 20% SSS);

ES: solução de equilíbrio; VS: solução de vitrificação;  $\blacklozenge$ : unir as gotas;  $\longrightarrow$ : transferir oócito para a próxima gota; B: fundo da gota; C: centro da gota; T: topo da gota.

Fonte: *Irvine Scientific*

A placa de cultura com o oócito em metáfase II foi retirada da incubadora e o oócito a ser vitrificado foi transferido para a gota de 20 µL de GMOPS e deixado por 1 minuto.

A gota de GMOPS foi unida à gota de ES1 (FIG. 1) usando-se a ponta da pipeta de transferência, deixando as duas soluções se misturarem espontaneamente por dois minutos.

Depois desse tempo a gota de ES2 foi unida às duas gotas previamente fundidas e deixadas por dois minutos.

O oócito foi, então, transferido com volume mínimo de solução para a gota de ES3 por três minutos.

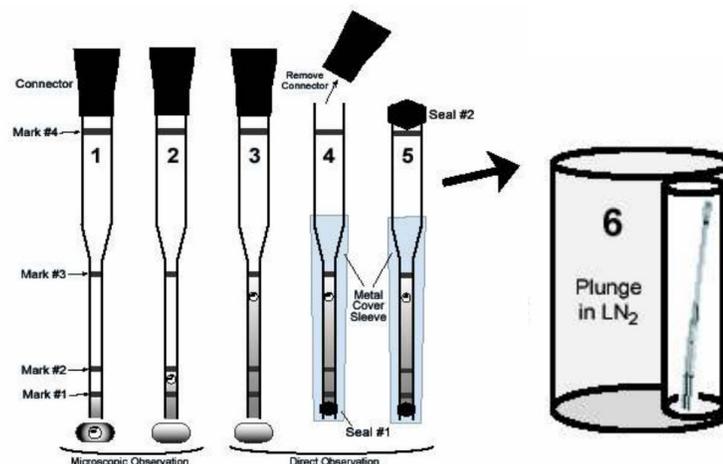
Ressalta-se que o equilíbrio do oócito em ES3 está completo quando a espessura dos espaços da zona pelúcida e espaço perivitelino é igual. O oócito vai para o fundo da gota no tempo de três minutos.

Durante o tempo de equilíbrio em ES3 foram preparadas quatro gotas (20  $\mu$ L cada) da solução VS, como mostra a FIG. 1.

Preparo da Cryo Tip para preenchimento:

- A extremidade larga da Cryo Tip foi inserida na extremidade estreita do conector, até a terminação da extremidade estreita do conector estar alinhada com a marca 4 da Cryo Tip.
- A seringa foi ligada à extremidade larga do conector para a captura do oócito a ser vitrificado.
- Após a fase de equilíbrio em ES ter sido completada, o oócito foi transferido para o centro da primeira gota de VS (VS1) durante cinco segundos.
- Depois o oócito foi para o centro da segunda gota de ES (ES2) por cinco segundos.
- O oócito foi, então, transferido para o centro da terceira gota (VS3), durante 10 segundos.
- Finalmente, o oócito foi transferido para o fundo da quarta gota de VS (VS4).
- Preenchimento da Cryo Tip (FIG. 2).

FIGURA 2 - Protocolo para preenchimento da palheta Cryo Tip



Fonte: *Irvine Scientific*

A proteção metálica foi deslizada para cima para expor a extremidade mais fina da palheta.

A manga da cobertura metálica ao longo da Cryo Tip foi deslizada para expor a extremidade frágil da ponta.

Segurando a Cryo Tip e a seringa enquanto se observava ao microscópio, foi aspirado cuidadosamente reduzido volume de VS até a marca 1 da Cryo Tip.

A Cryo Tip foi selada no nível da marca 1 e a proteção metálica foi deslizada para baixo para cobrir e proteger a extremidade fina da palheta.

O conector e a seringa foram removidos e foi realizada a selagem na extremidade espessa da Cryo Tip acima da marca 4.

A Cryo Tip foi mergulhada diretamente no nitrogênio líquido e depois colocada dentro da criocâmara, onde foi armazenada em *racks* dentro do bujão de nitrogênio líquido à temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  até ser descongelado para ser utilizado para a paciente que doou para a pesquisa.

Os oócitos vitrificados só foram descongelados nas seguintes situações:

- a) A paciente transferiu o número de embriões permitido pelo Conselho Federal de Medicina de acordo com sua idade, não possuía algum embrião congelado e não engravidou.
- b) A paciente transferiu os embriões a fresco e os embriões restantes que ficaram em cultivo chegaram em estágio de blastocisto, foram congelados, descongelados, transferidos e não ocorreu gravidez.

#### 3.2.4.1 Descongelamento de oócito vitrificado

Materiais necessários utilizados

- Vit Kit® Thaw.
- Meio de cultivo G1®Vitrolife.
- Conector.
- Seringa de 1 mL.
- Placa de Petri de 100 mm.
- Pipetas de Pauster.
- Pipeta de precisão.
- Ponteiras estéreis.
- Tesoura.

- Nitrogênio líquido.
- Reservatório para nitrogênio.
- Recipiente com água a 37°C.

Componentes do Vit Kit®Thaw

- a) **Solução de descongelamento (TS):** é uma solução tamponada com hepes de meio-199 com sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 1.0 M sucrose e 20% (v/v) *Dextran Serum Supplement* (suplemento soro Dextran).
- b) **Solução de diluição (DS):** é uma solução tamponada com hepes de meio-199, com sulfato de gentamicina (35 µg/mL), 0,5 M sucrose e 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento soro do Dextran).
- c) **Solução para lavar (WS):** é uma solução tamponada com hepes de meio-199, com sulfato de gentamicina (35 µg/mL) e 20% (v/v) de *Dextran Serum Supplement* (suplemento soro do Dextran).

Essas três soluções foram utilizadas sequencialmente de acordo com o protocolo de descongelamento com microgotas passo a passo, em temperatura ambiente (22-27°C).

#### 3.2.4.2 Protocolo de descongelamento

A amostra a ser descongelada foi identificada e retirada do bujão de nitrogênio líquido onde estava armazenada e colocada em um recipiente contendo nitrogênio líquido.

Em uma placa de Petri foram preparadas as seguintes gotas de meios de descongelamento (FIG. 3):

- a) Duas gotas de 20 µL de TS.
- b) Duas gotas de 20 µL de DS (DS1 e DS2).
- c) Três gotas de WS (WS1, WS2 e WS3) preparadas mais tarde depois do tempo da etapa do oócito em DS.

Com o auxílio de uma pinça, a Cryo Tip selecionada para descongelamento foi retirada do nitrogênio líquido e colocada no recipiente com água a 37°C por três segundos para descongelar.

A Cryo Tip foi seca com compressa estéril e a extremidade larga foi cortada na marca 4. A seringa de 1 mL foi, então, colocada nessa extremidade com a ajuda de um conector.

A proteção metálica foi deslizada para expor a extremidade frágil da ponta do Cryo Tip (FIG. 3).

Com a Cryo Tip posicionada sobre a placa de descongelamento previamente preparada foi cortado o selo na marca 2 da ponta fina e o conteúdo dispensado formou uma pequena gota em uma região seca da placa perto da gota TS. As duas gotas foram unidas e deixadas por 1 minuto para a ocorrência de uma mistura gradual.

Com pipeta de transferência o oócito foi colocado no fundo da segunda gota de TS e deixado por mais 1 minuto.

Destaca-se que nesta etapa o oócito reduz de tamanho e flutua até a superfície da gota.

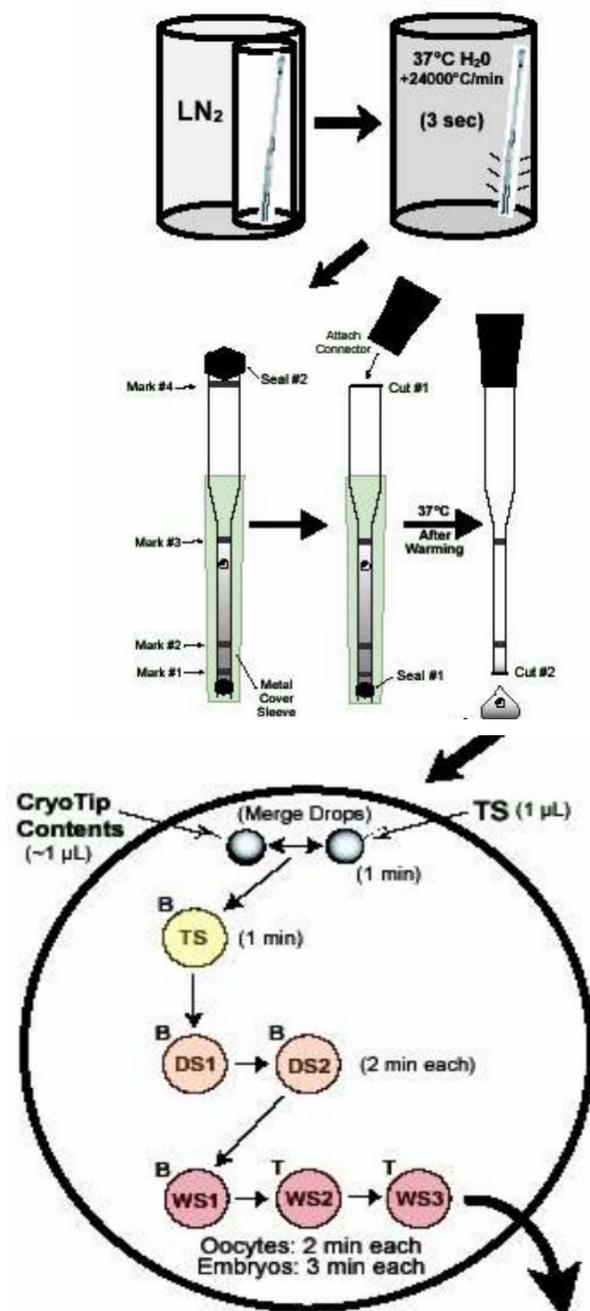
Após o tempo do oócito na gota de TS ele foi colocado no fundo das gotas de DS1 e DS2 por dois minutos cada. Realça-se que nessa etapa o oócito permanece com dimensões reduzidas.

Durante esse período foram preparadas as três gotas de 20 µL de WS (WS1, WS2 e WS3).

O oócito foi, então, colocado no fundo da primeira gota de WS (WS1) por dois minutos, depois transferido para a superfície da gota WS2 por dois minutos e, finalmente, para a superfície da gota WS3 por mais dois minutos.

Salienta-se que nesta etapa o oócito deverá reexpandir-se para seu tamanho original no espaço de 2-3 minutos.

FIGURA 3 - Protocolo para descongelamento Cryo Tip



Transferir para meio de cultivo para recuperação  
 TS: solução de descongelamento; DS: solução de diluição; WS: solução para lavar;  $LN_2$ : nitrogênio líquido;  $\blacktriangle$ : unir as gotas;  $\longrightarrow$ : transferir oócito para a próxima gota; **B**: fundo da gota; **C**: centro da gota; **T**: topo da gota.

Fonte: Irvine Scientific.

O oócito foi transferido, então, para uma placa de quatro poços Nunc® contendo meio de cultivo G1® Vitrolife ou microgotas em disco de cultivo de 60 mm numeradas sob óleo mineral. O meio utilizado era apropriado para a fase de recuperação do oócito que antecede a ICSI.

O oócito foi deixado em incubadora de CO<sub>2</sub> por pelo menos 1 hora para, a seguir, ser filmado e fotografado para avaliação morfológica e morfométrica.

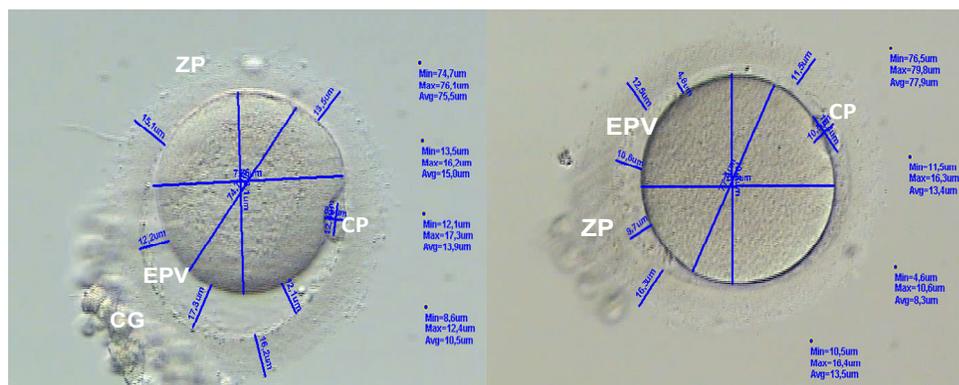
### 3.2.5 Avaliação morfométrica dos oócitos

As medidas e classificações dos oócitos, zigoto e de embrião do segundo e terceiro dias de cultivo foram realizadas utilizando-se *software* Cronus TM.

#### 3.2.5.1 Diâmetro do oócito

Foram realizadas três medidas do diâmetro do oócito pré e pós-vitrificação em planos diferentes (FIG. 4). A média das medidas foi usada nos cálculos estatísticos.

FIGURA 4 – Medidas pré e pós-vitrificação do diâmetro do oócito



Objetiva 20 X CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelino; ZP: zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.5.2 Zona pelúcida

Três medidas foram obtidas em planos aleatórios da zona pelúcida e sua média foi considerada para cálculos estatísticos (FIG. 5).

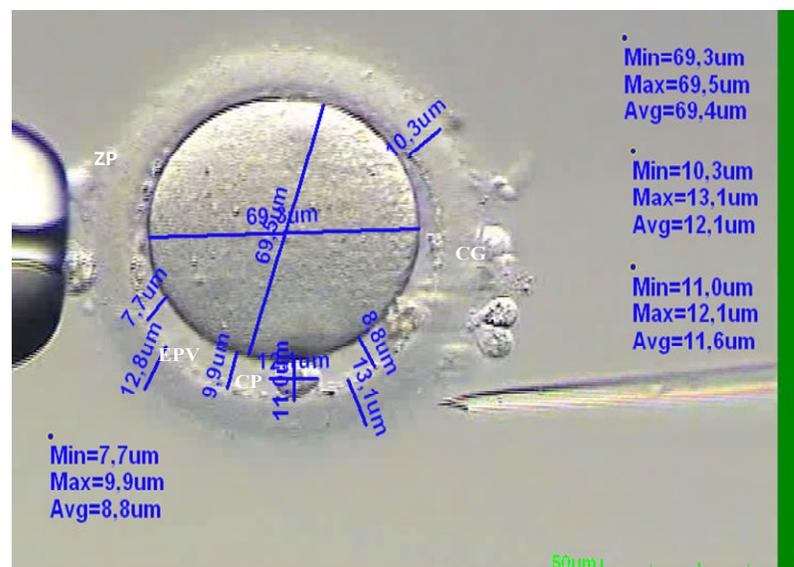
### 3.2.5.3 Espaço perivitelino

O espaço perivitelino, quando visibilizado, foi submetido a três medidas aleatórias na região mais espessa. A média dessas medidas foi usada para cálculo estatístico (FIG. 5).

### 3.2.5.4 Corpúsculo polar

Duas medidas aleatórias do diâmetro do corpúsculo polar foram realizadas e a média dessas medidas foi usada para cálculo estatístico (Fig. 5).

FIGURA 5 – Corpúsculo polar (CP)



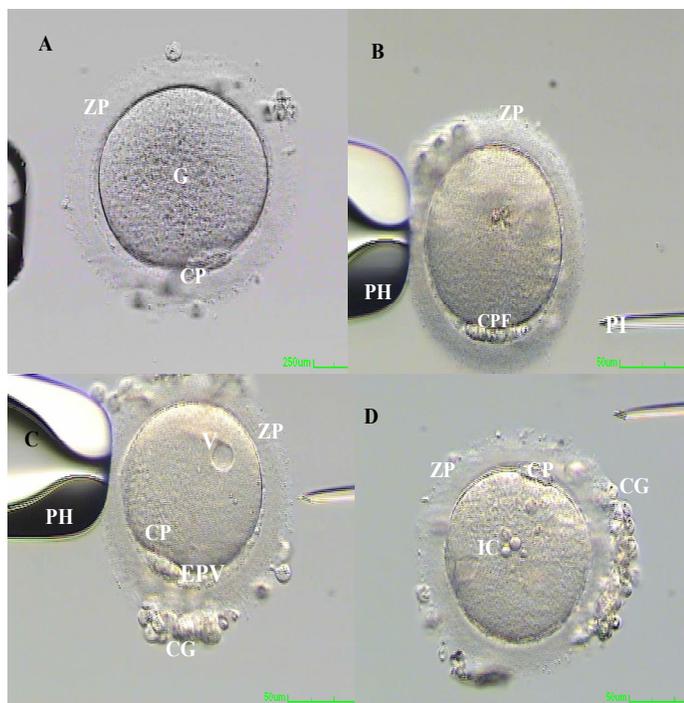
Objetiva 20 X. CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; E: espermatozoide; EPV: espaço perivitelino; PH: pipeta de Holding; PI: pipeta de injeção; ZP: zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.2.6 Avaliação morfológica dos oócitos

As características morfológicas dos oócitos (presente ou ausente) foram avaliadas de acordo com: granulações citoplasmáticas, fragmentação do corpúsculo polar, inclusões citoplasmáticas e vacúolos (FIG. 6). Para efeito de comparação e correlação com a morfometria, os oócitos foram classificados em morfologia “ótima” (no máximo uma das características mencionadas, exceto vacúolos) ou “alterada” (duas ou mais alterações e/ou vacúolos). A presença de vacúolos isoladamente foi suficiente para classificação como morfologia “alterada”, por ser a característica que mais se relaciona a desfechos desfavoráveis<sup>93-94</sup>.

FIGURA 6 - Características morfológicas dos oócitos



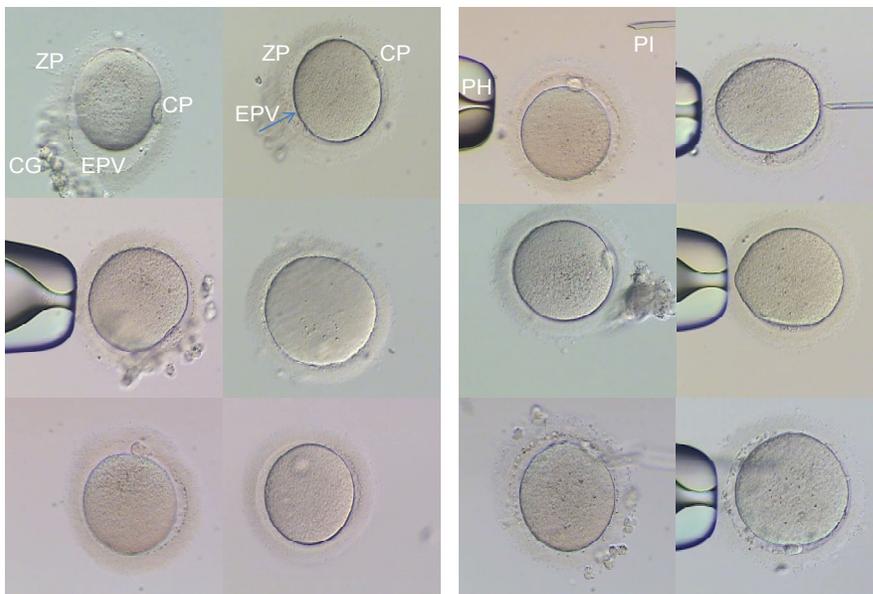
**A) Oócito em metáfase II com citoplasma granuloso; B) fragmentação do corpúsculo polar; C) vacúolo no ooplasma; D) inclusões citoplasmáticas.**

Objetiva 20 X. CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelino; PH: pipeta de Holding; PI: pipeta de injeção; ZP: zona pelúcida; G: granulações; CPF: corpúsculo polar fragmentado; V: vacúolo; IC: inclusões citoplasmáticas.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

Nos oócitos que obtiveram boa recuperação e não degeneraram após serem descongelados (FIG. 7) foi realizada a ICSI. Os oócitos que estavam degenerados na análise morfológica pós-descongelamento (FIG. 8) foram descartados.

FIGURA 7 - Oócitos que sobreviveram após o descongelamento

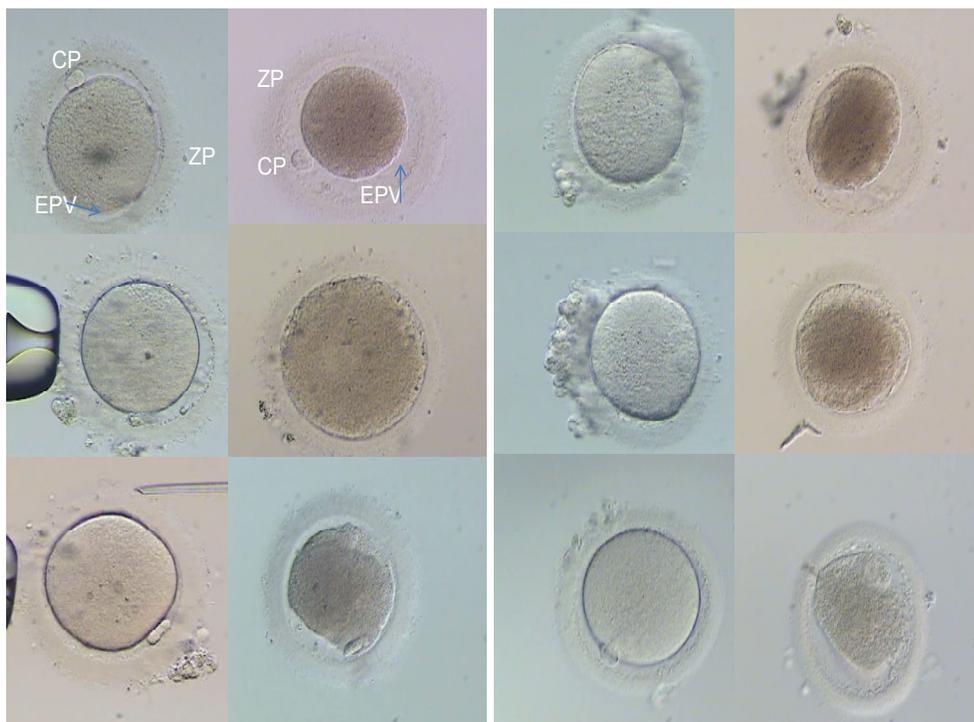


Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

Objetiva 20 X. CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelino; PH: pipeta de Holding; PI: pipeta de injeção; ZP: zona pelúcida;

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

FIGURA 8 - Oócitos que degeneraram após o descongelamento



**Oócito fresco   Oócito descongelado   Oócito fresco   Oócito descongelado**

Objetiva 20 X. CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelino; PH: pipeta de Holding; PI: pipeta de injeção; ZP: zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

Para a realização da ICSI é necessário o preparo do sêmen para a retirada do líquido seminal, deixando o espermatozoide capacitado para injeção.

### 3.2.6.1 Preparo do sêmen

O preparo de sêmen foi feito pela técnica de *Swim-up*. O material coletado foi colocado em tubo de ensaio de 15 mL (Falcon®), acrescido de meio de cultivo tamponado (GMOPS® Vitrolife) aquecido a 37°C, o qual foi homogeneizado e centrifugado a 1.500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos.

Após essa centrifugação, o sobrenadante foi retirado e novamente acrescentados 2 mL de GMOPS® Vitrolife a 37°C. Foi realizada mais uma centrifugação por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* (sedimento resultante da centrifugação) foi suspenso em 1 mL de meio de cultivo contendo

proteína (GIVF® mais HSA®Vitrolife), que foi centrifugado por três minutos e deixado em incubadora de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 45 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, avaliado e mantido em incubadora de CO<sub>2</sub> até o momento da ICSI.

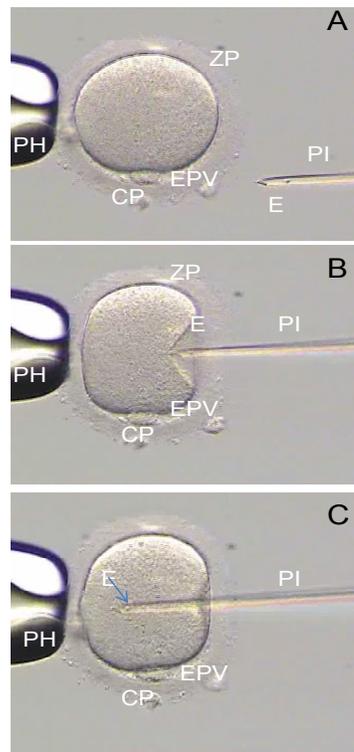
### **3.2.7 Técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)**

Numa placa de cultura de 60 mm (Falcon®) foram aplicadas microgotas numeradas de 20 µL de meio de cultivo tamponado (GMOPS® Vitrolife) cobertas com óleo mineral (Ovoil® Vitrolife) e deixadas em placa pré-aquecida 37°C por pelo menos 1 hora.

Depois disso, os oócitos que sobreviveram ao descongelamento foram colocados individualmente nas microgotas numeradas para serem filmados e microinjetados.

Os espermatozoides foram depositados na gota central em solução viscosa de polivinil pirrolidona (PVP) - ICSI® Vitrolife para diminuir a motilidade e facilitar a imobilização dos mesmos. O oócito foi fixado por uma micropipeta de sucção (*holding*) e o espermatozoide imobilizado e aspirado dentro da pipeta de injeção por meio de micromanipulador Narishige e microscópio Nikon com sistema de lentes de Hoffmann. A microinjeção foi realizada em oócitos em estágio de metáfase II com o seu primeiro corpúsculo polar posicionado em seis ou 12 horas (FIG. 9).

FIGURA 9 - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide,  
oócito em metáfase II



Objetiva 20x. **A-** Captura do espermatozoide, **B-**Início da injeção de espermatozoide, **C-**ICSI. CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelino; PH: pipeta de Holding; PI: pipeta de injeção; E: espermatozoide; ZP: zona pelúcida.

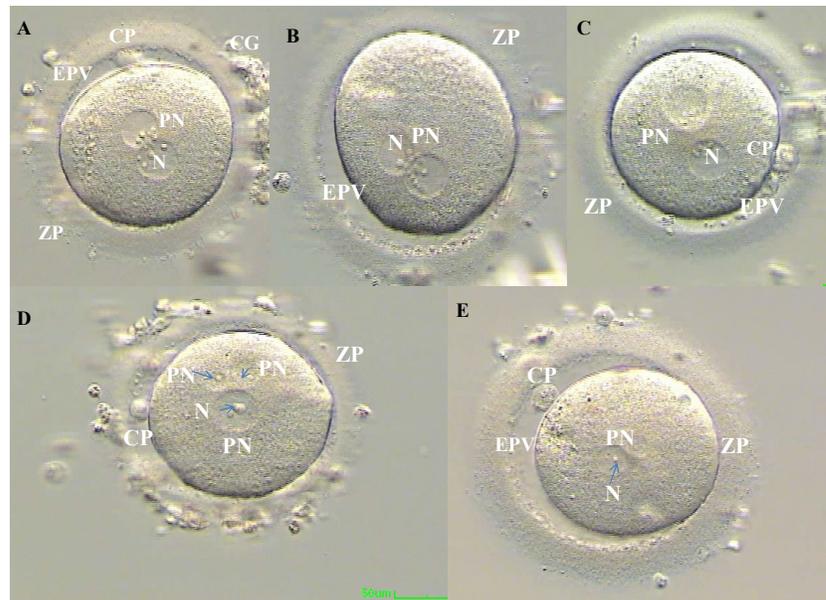
Fonte: Laboratório de Reprodução Humana, Professor Aroldo Fernando Camargos.

Após 18 a 20 horas de cultivo os oócitos foram avaliados para a visibilização da fertilização. Esses oócitos foram filmados e avaliados quanto à morfologia (número de pronúcleos, disposição dos pronúcleos e disposição dos nucléolos) e morfometria (tamanho dos pronúcleos) (FIG. 10).

### 3.2.8 Avaliação morfológica dos zigotos

As características morfológicas do zigoto foram avaliadas de acordo com: disposição dos pronúcleos, disposição dos nucléolos e disposição dos pronúcleos em relação ao corpúsculo polar (FIG. 10, 11, 12).

FIGURA 10 - Disposição dos pronúcleos

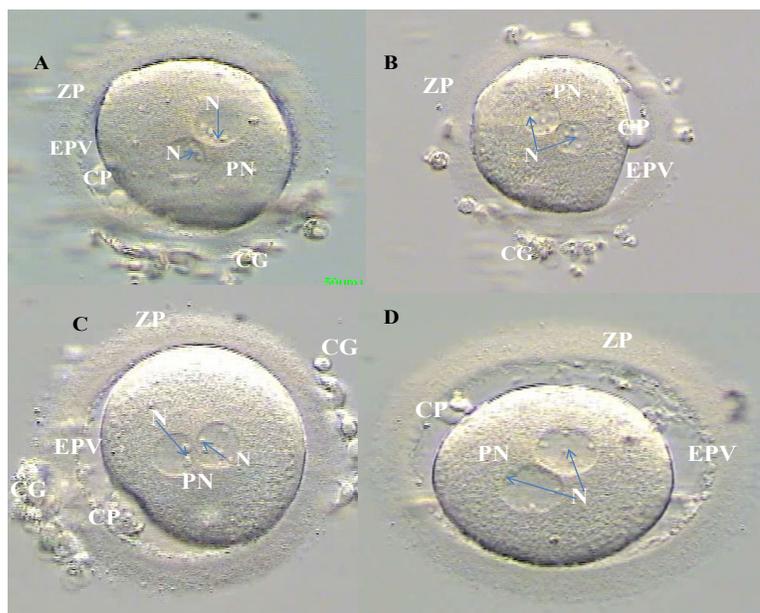


A- centralizado, B- não centralizado, C- separados, D- fragmentados, E- tamanhos diferentes.

Objetiva 20x. CP: corpúsculo póla; EPV: espaço perivitelino; N: nucléolo; PN: pronúcleo; ZP: zona pelúcida.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana, Professor Aroldo Fernando Camargos.

FIGURA 11 - Disposição dos nucléolos

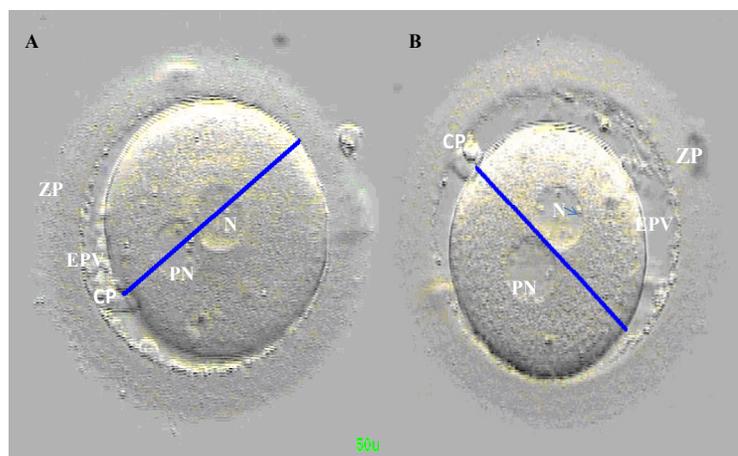


**A)** Grandes e alinhados **B)** Grandes e dispersos, **C)** Alinhados e outro disperso **D)** Pequenos e dispersos.

Objetiva 20 X. CG: células da granulosa; CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelo; ZP: zona pelúcida; PN: pronúcleo; N: nucléolo.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

FIGURA 12 - Disposição dos pronúcleos em relação ao corpúsculo polar



**A)** Alinhamento longitudinal **B)** Alinhamento perpendicular.

Objetiva 20 X. CP: corpúsculo polar; EPV: espaço perivitelo; ZP: zona pelúcida; PN: pronúcleo; N: nucléolo.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

A classificação do zigoto foi feita como mostra o QUADRO 1. Essa classificação está relacionada à posição dos pronúcleos, disposição dos nucléolos e posição dos pronúcleos em relação ao corpúsculo polar.

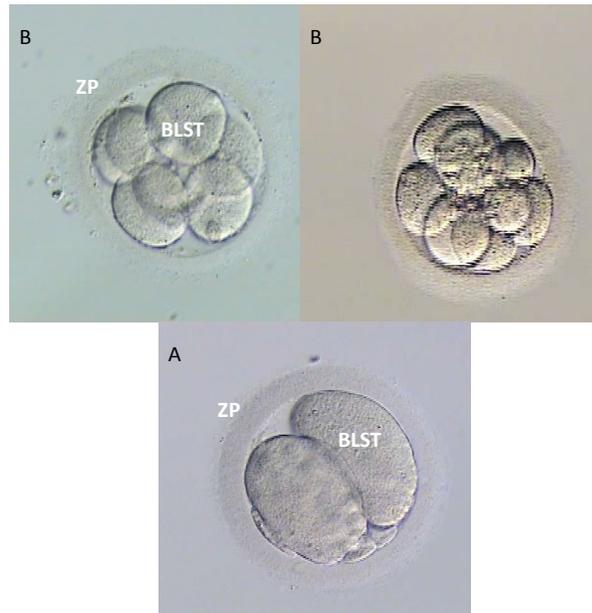
QUADRO 4 - Classificação do zigoto

<b>Classe</b>	<b>Classificação</b>	<b>Descrição morfológica</b>
		<b>Posição PN, Disposição nucléolos, Posição PN em relação CP</b>
01	A1a	Centralizado, grandes alinhados, alinhamento longitudinal.
02	A1b	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular.
03	A2a	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento longitudinal.
04	A2b	Centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular.
05	A3a	Centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento longitudinal.
06	A3b	Centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento perpendicular.
07	A4a	Centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento longitudinal.
08	A4b	Centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento perpendicular.
09	B1a	Não centralizado, grandes e alinhados, alinhamento longitudinal.
10	B1b	Não centralizado, grandes e alinhado, alinhamento perpendicular.
11	B2a	Não centralizado, grandes e dispersos, alinhamento longitudinal.
12	B2b	Não centralizado, grandes e dispersos, alinhamento perpendicular.
13	B3a	Não centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento longitudinal.
14	B3b	Não centralizado, grandes 01 PN alinhado, alinhamento perpendicular.
15	B4a	Não centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento longitudinal.
16	B4b	Não centralizado, pequenos e dispersos, alinhamento perpendicular.
17	-	<b>Não justapostos</b>
18	-	<b>Tamanhos diferentes</b>
19	-	<b>Fragmentado</b>

A avaliação morfológica dos embriões obedeceu o grau de fragmentação e simetria dos blastômeros, usando-se os seguintes critérios: blastômeros sem fragmento, com poucos fragmentos, blastômeros desiguais e blastômeros com fragmentação excessiva. Essa classificação foi realizada no *software* Cronus

TM3. No segundo e terceiro dia após a coleta ovular, os embriões foram filmados e avaliados morfológicamente. Esses embriões foram então separados e transferidos para as pacientes (FIG. 13).

FIGURA 13 - Embriões no segundo e terceiro dia de cultivo



**A)** Embrião no segundo dia com duas células; **B)** Embrião no terceiro dia com oito células. Objetiva 20 X.; ZP: zona pelúcida; BLST: blastômeros.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana do HC da UFMG.

### 3.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados inicialmente quanto ao padrão de distribuição, por meio do teste de D'Agostino-Pearson. Variáveis clínicas apresentaram distribuição normal e foram descritas como média e desvio-padrão. Variáveis morfométricas dos oócitos não apresentaram distribuição normal e foram descritas como medianas e intervalos interquartis.

Os resultados da morfometria foram comparados em função das seguintes variáveis: morfologia inicial (ótima *versus* alterada), resistência à vitrificação (oócitos preservados *versus* degenerados), morfologia pós-descongelamento

(ótima *versus* alterada) e fertilização pós-ICSI (sim *versus* não). Para essas comparações utilizou-se o teste U de Mann-Whitney. Diferenças com valor de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

O cálculo amostral indicou que uma amostra mínima de 13 oócitos por grupo permitiria detectar diferença  $\geq 3,4 \mu\text{m}$  no diâmetro oocitário entre dois grupos, com poder estatístico de 80% e nível de significância de 95%<sup>95</sup>

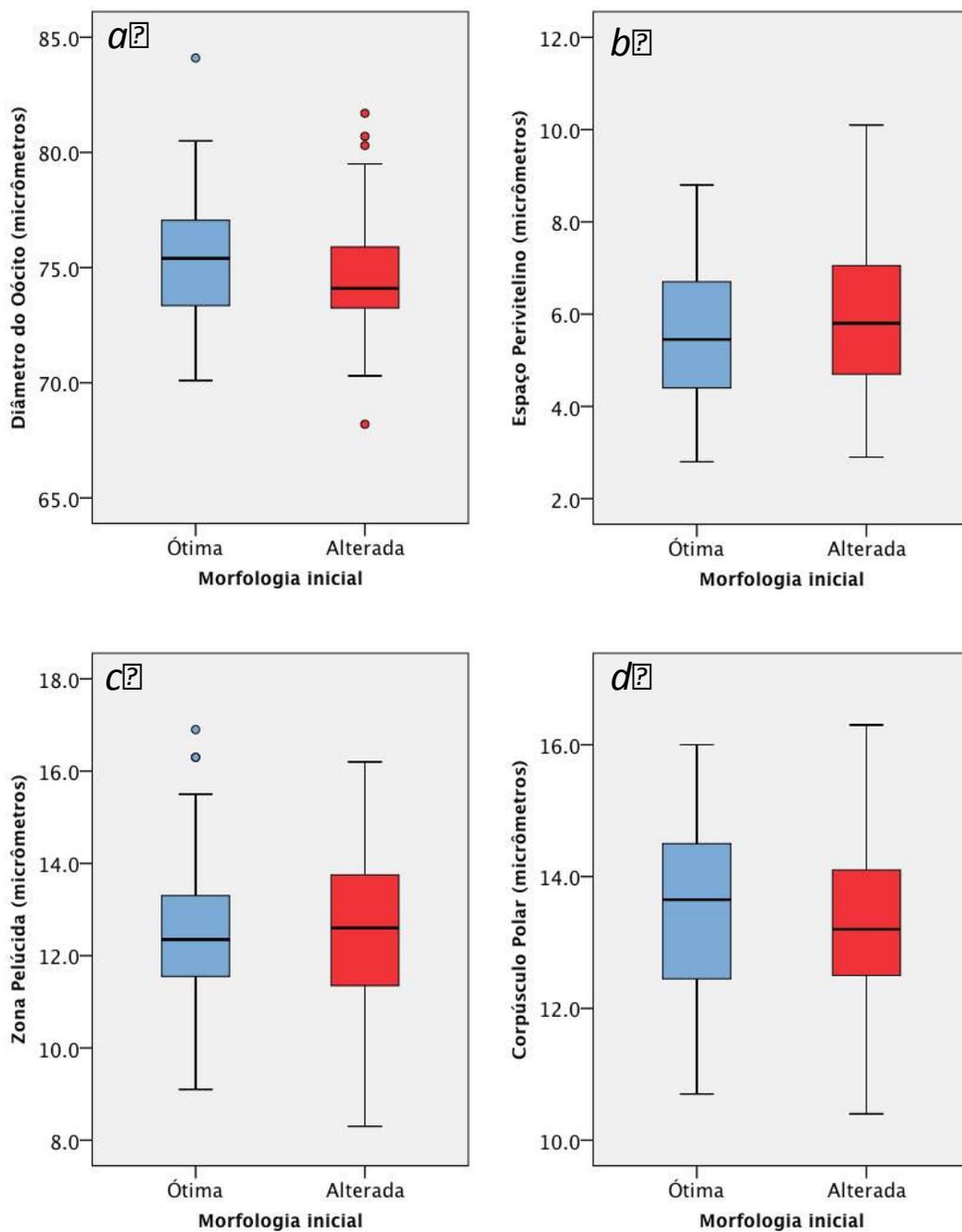
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Correlação entre morfologia e morfometria dos oócitos antes e após a vitrificação

Como ilustra o GRÁF. 1, não houve correlação entre características morfológicas e morfométricas dos 71 oócitos avaliados antes da vitrificação. O diâmetro oocitário e as medidas de EPV, ZP e CP foram semelhantes nos oócitos classificados como morfologia ótima (n=40) e naqueles com morfologia alterada (n=31).

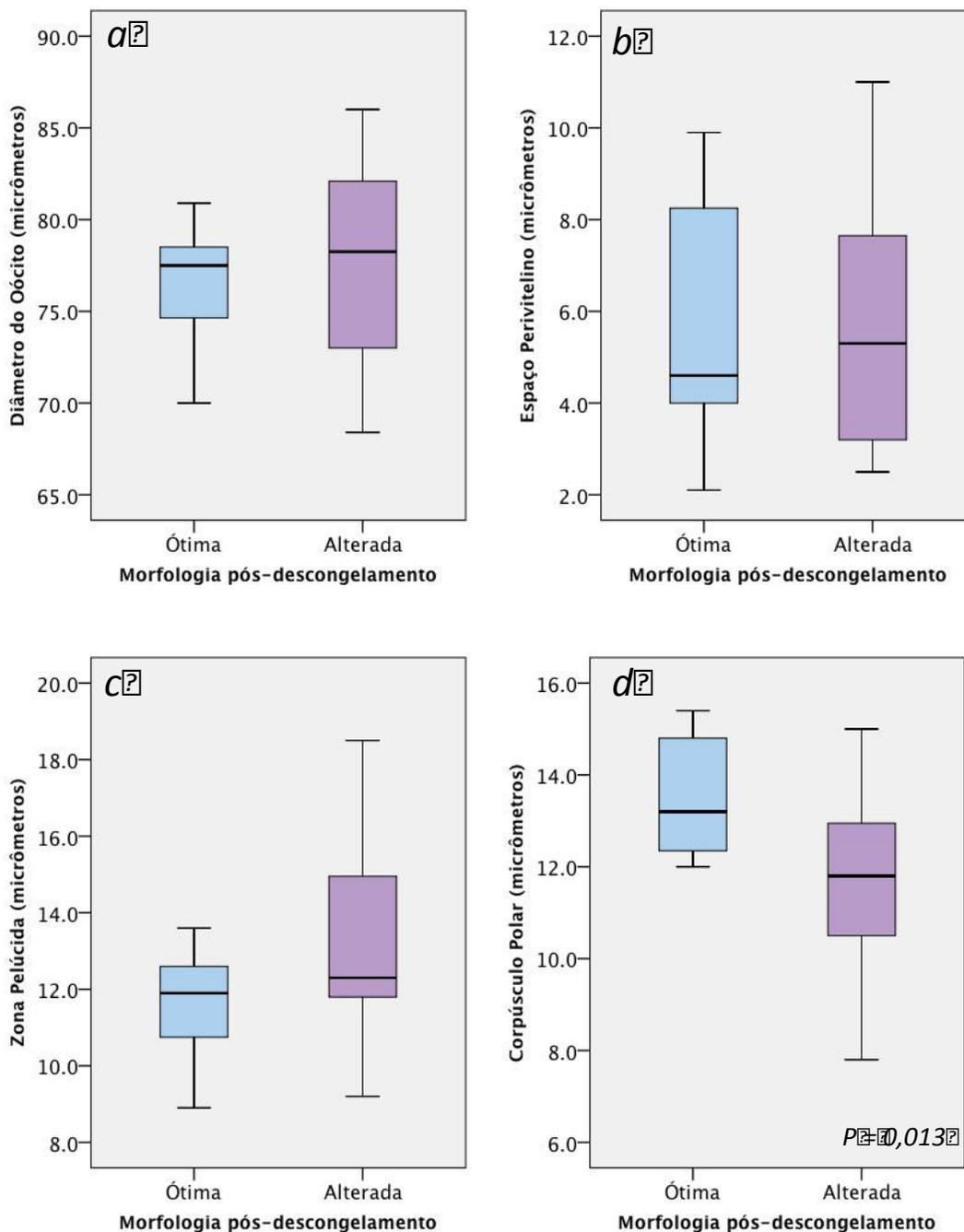
Após o descongelamento de 49 oócitos, os 27 que estavam preservados foram novamente submetidos à análise morfológica e morfométrica, cuja correlação é apresentada no GRÁF. 2. Enquanto o diâmetro oocitário, o EPV e a ZP tiveram medidas semelhantes em oócitos de morfologia pós-descongelamento ótima (n=7) e alterada (n=20), o último grupo apresentou significativa redução da medida do CP (11,8 [10,5-13,0]  $\mu\text{m}$  *versus* 13,2 [12,2-15,3]  $\mu\text{m}$ , P=0,013, GRÁF. 1-d).

GRÁFICO 1 – Morfometria pré-vitrificação de oócitos classificados como morfologia ótima (n=40) e alterada (n=31)



Os dados são apresentados como mediana e quartis e as barras de erro representam os percentis 10 e 90. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

GRÁFICO 2 – Morfometria pós-descongelamento de oócitos preservados e classificados como morfologia ótima (n=7) e alterada (n=20)

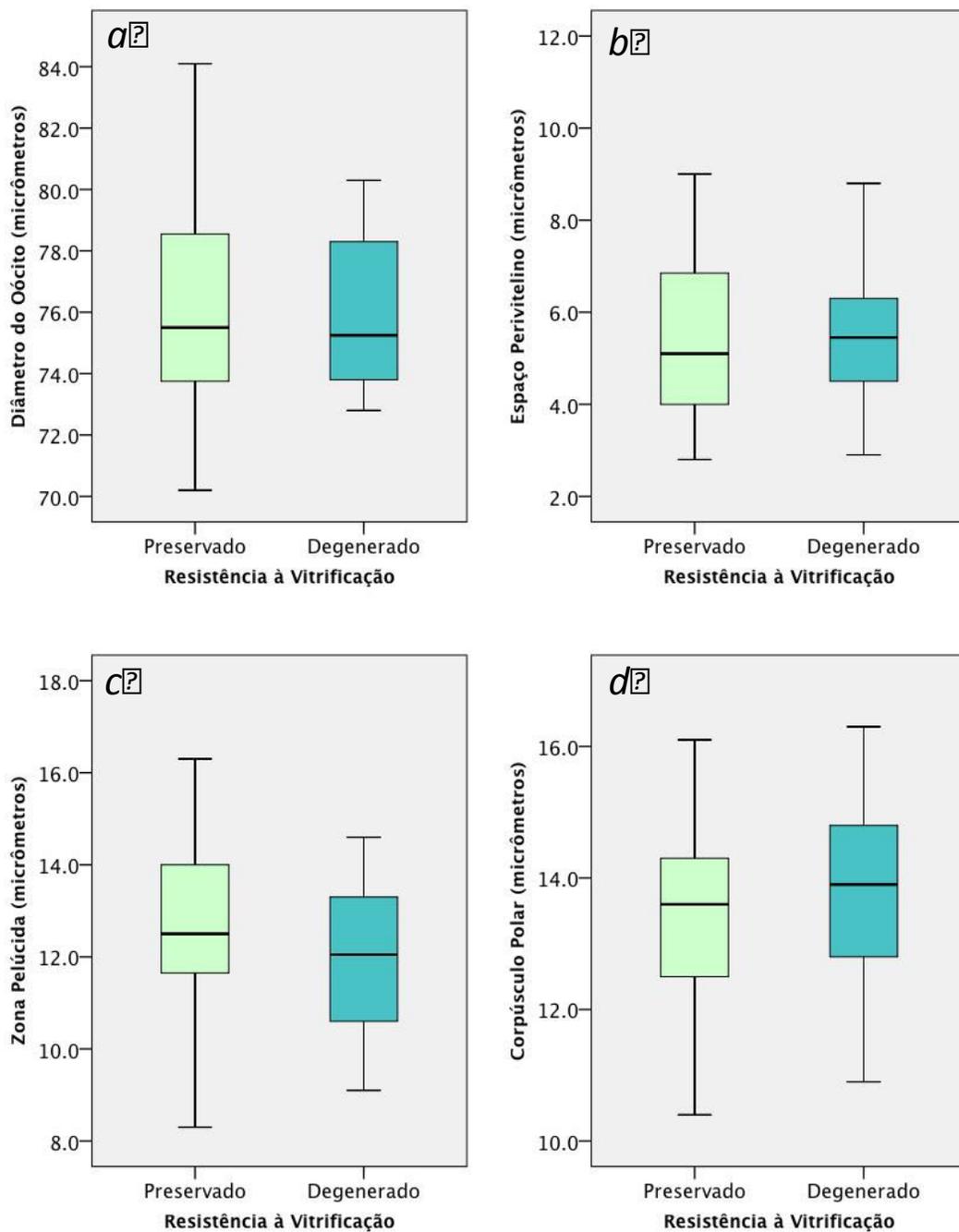


Os dados são apresentados como mediana e quartis e as barras de erro representam os percentis 10 e 90. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

#### **4.2 Morfometria dos oócitos pré-vitrificação e sua relação com a sobrevivência à criopreservação**

De acordo com o GRÁF. 3, a morfometria oocitária pré-vitrificação não foi capaz de prever a resistência do oócito à vitrificação e descongelamento. As medidas de diâmetro oocitário, EPV, ZP e CP foram similares nos oócitos que resultaram preservados (n=27) e naqueles que se encontravam degenerados (n=22) após o processo de criopreservação.

GRÁFICO 3 – Morfometria pré-vitrificação de oócitos que resultaram preservados (n=27) e degenerados (n=22) ao fim do processo de criopreservação



Os dados são apresentados como mediana e quartis e as barras de erro representam os percentis 10 e 90. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

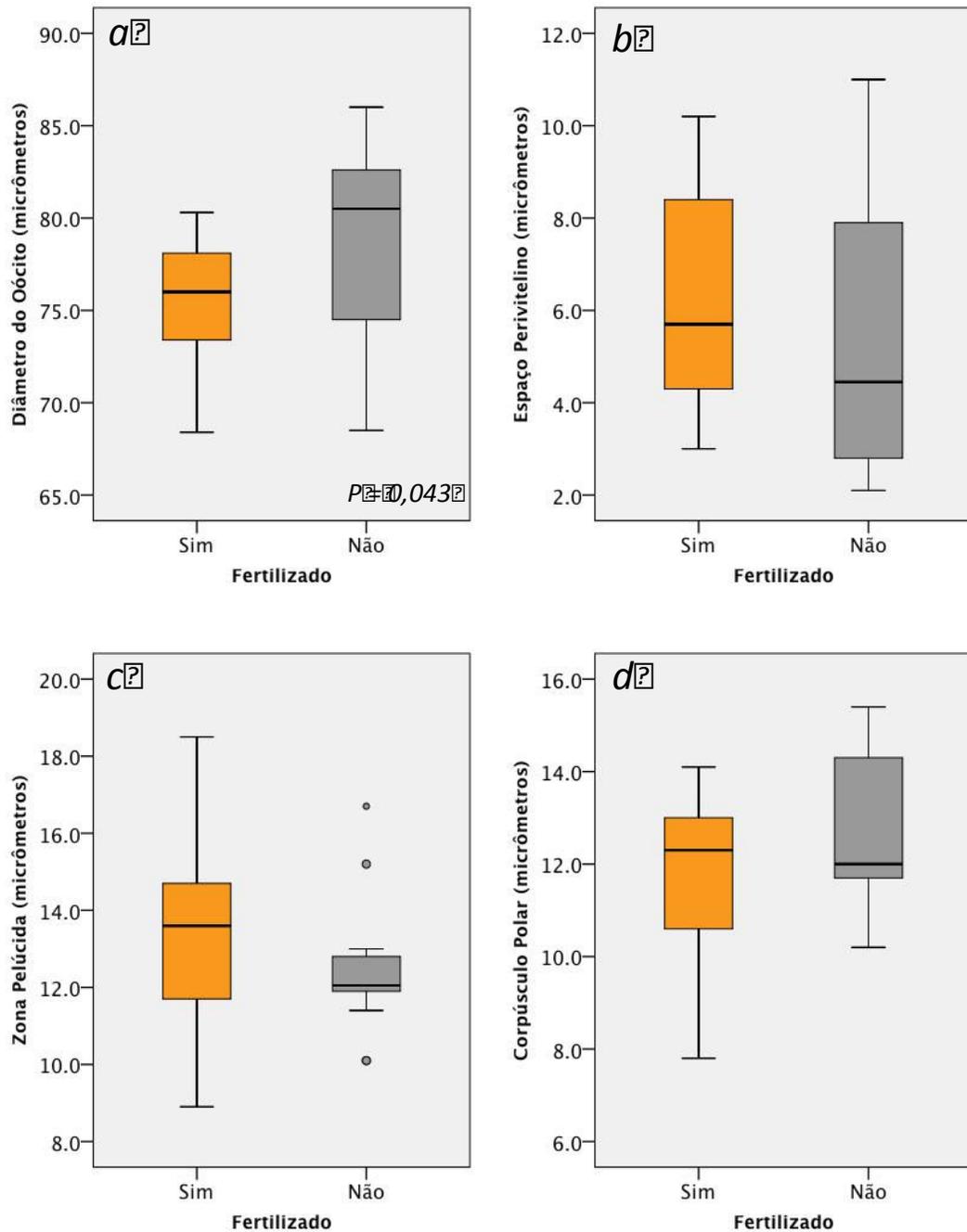
### 4.3 Morfometria dos oócitos pós-descongelamento e sua relação com a fertilização

Dos 27 oócitos que sobreviveram ao processo de criopreservação e foram submetidos à ICSI, 13 foram fertilizados. Os GRÁF. 4 e 5 apresentam a comparação de dados morfométricos entre os oócitos que resultaram fertilizados (n=13) e os que, mesmo resistindo à criopreservação e sendo submetidos à ICSI, não resultaram em fertilização (n=14).

Como ilustra o GRÁF. 4, o diâmetro oocitário pós-descongelamento foi menor nos oócitos que se fertilizaram comparados àqueles que não se fertilizaram (76,0 [73,0-78,3]  $\mu\text{m}$  *versus* 80,5 [73,9-82,6]  $\mu\text{m}$ , P=0,043, GRÁF. 4-a).

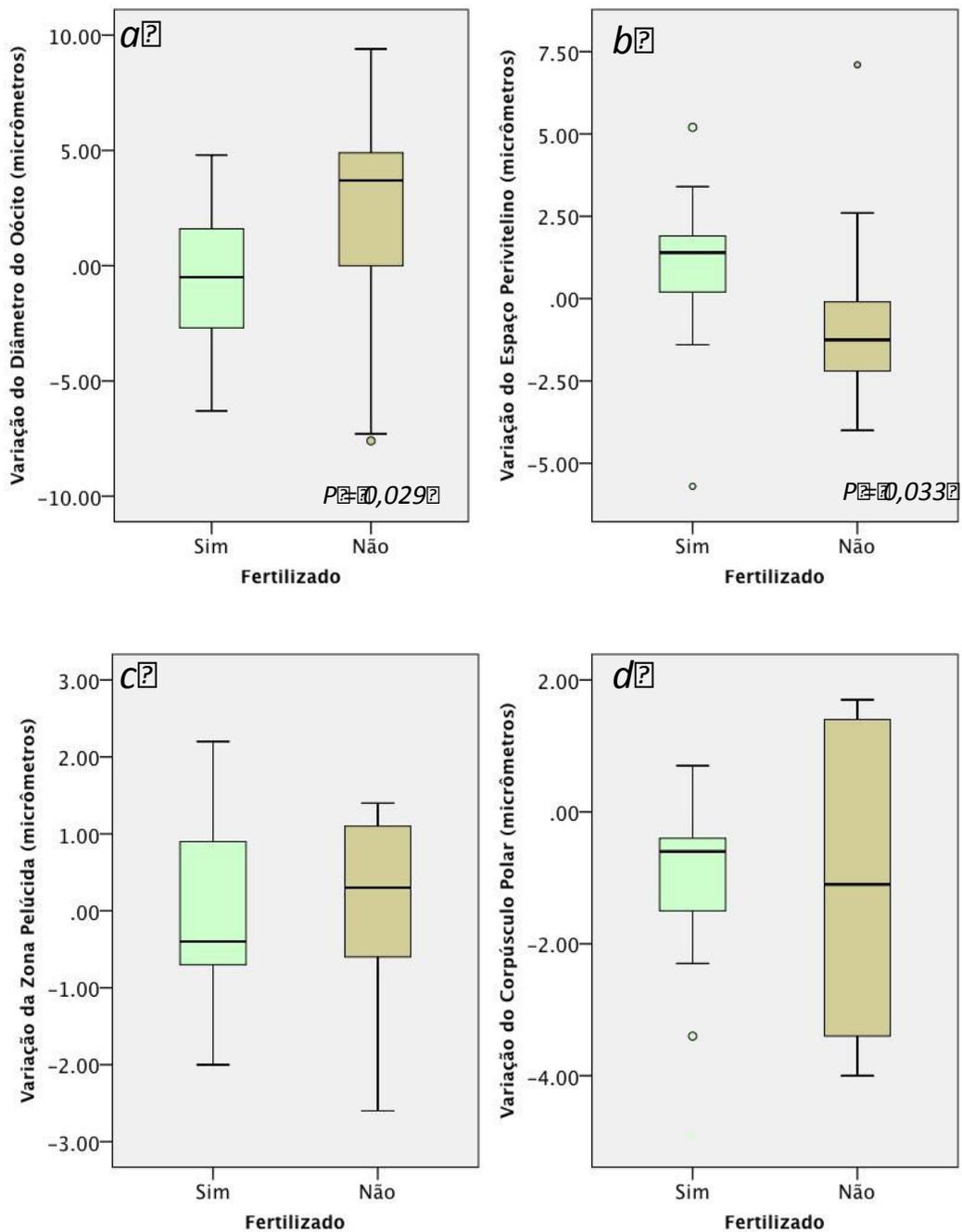
A variação das medidas obtidas antes e após a criopreservação ( $\Delta$  = medida pós-descongelamento – medida pré-vitrificação) foi correlacionada à fertilização (GRÁF. 5). Os oócitos que resultaram fertilizados haviam apresentado menos variação do seu diâmetro total (GRÁF. 5-a, P=0,029) e do EPV (GRÁF. 5-b, P=0,033) comparados àqueles oócitos que não se fertilizaram. Estes últimos tiveram, ao longo do processo de criopreservação, aumento do diâmetro total ( $\Delta$ = 3,7 [-0,1-5,5]  $\mu\text{m}$ ) e diminuição do EPV ( $\Delta$ =-1,3 [-2,3-0,2]  $\mu\text{m}$ ).

GRÁFICO 4 – Morfometria pós-descongelamento de oócitos que resultaram fertilizados (n=13) e não fertilizados (n=14) após criopreservação, descongelamento e ICSI



Os dados são apresentados como mediana e quartis e as barras de erro representam os percentis 10 e 90. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

GRÁFICO 5 - Variação de medidas obtidas pré-vitrificação e pós-descongelamento de oócitos que resultaram fertilizados (n=13) e não fertilizados (n=14)



Os dados são apresentados como mediana e quartis e as barras de erro representam os percentis 10 e 90. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

## 5 DISCUSSÃO

O número de mulheres em idade reprodutiva diagnosticadas com câncer tem crescido consideravelmente. Com a melhora dos protocolos de quimioterapia e radioterapia essas pacientes têm expectativas de sobreviver ao câncer. A criopreservação de oócitos pode oferecer a essas mulheres a chance de preservar a fertilidade. A criopreservação de oócitos tenta evitar problemas pessoais, éticos, religiosos e legais em torno da criopreservação de embriões.

Neste estudo escolheu-se a vitrificação como método de criopreservação de oócitos por possuir muitas vantagens e benefícios, como, por exemplo, ser superior a métodos de congelamento lento para oócitos, levando a melhores taxas de sobrevivência, fertilização e desenvolvimento embrionário<sup>76,77,79,82</sup>. Ocorre também menos danos na integridade do fuso e alinhamento dos cromossomos e a não formação de cristais de gelo a partir do aumento da velocidade da temperatura de condutividade.

Quando o protocolo de vitrificação é estabelecido, é fácil de ser realizada, de baixo custo e sem necessidade de aparelhos especiais.

Depois de estabelecido o protocolo de vitrificação (*Irvine Scientific*), este estudo avaliou a morfologia e morfometria desses oócitos antes de serem vitrificados e depois de serem descongelados.

### 5.1 Correlação entre morfologia e morfometria dos oócitos antes e após a vitrificação

Avaliando os oócitos antes da vitrificação pode-se observar que não houve correlação entre características morfológicas e morfométricas. Dos 71 oócitos analisados antes da vitrificação, 40 deles foram classificados como morfologia ótima e 31 como morfologia alterada. As medidas desses oócitos (diâmetro, EPV, ZP e CP) foram semelhantes nesses dois grupos.

As características morfológicas dos oócitos (presentes ou ausentes) foram avaliadas de acordo com granulações citoplasmáticas, fragmentação do corpúsculo polar, inclusões citoplasmáticas e vacúolos.

Oócito de boa qualidade possui um citoplasma claro com granulação moderada e sem inclusões citoplasmáticas. Oócito com ooplasma escuro diminui em 83% a probabilidade de se obter um embrião de boa qualidade<sup>52</sup>.

Para que o oócito tenha boa qualidade, deve ocorrer maturação nuclear e citoplasmática de maneira sincronizada. A maturação nuclear refere-se à continuação da meiose e à progressão até a fase de metáfase II, que está estacionada até a hora da ovulação. Mesmo que o oócito possua a competência nuclear, ele ainda pode estar deficiente em maturação citoplasmática, a qual se refere ao processo de preparar o oócito para ativação, fertilização e desenvolvimento embrionário.

A seleção dos oócitos para congelamento é muito difícil, exceto em caso de manifestações grosseiras de dismorfismo e heterogeneidade da morfologia dos oócitos (zona pelúcida espessa, granulosidade do citoplasma, aumento do espaço perivitelino, presença de vacúolos ou fragmentação do primeiro corpúsculo polar). A incapacidade em prever qual é o oócito de boa qualidade leva à dificuldade em demonstrar a capacidade do mesmo em desenvolver um bom embrião<sup>18</sup>.

Com a introdução da ICSI, a remoção das células do *cumulus* permitiu a observação direta das características morfológicas dos oócitos a partir do uso de microscópio. Algumas características são observadas, como a presença ou ausência de granulosidades, coloração, vacúolos, inclusões citoplasmáticas e organelas<sup>48-50</sup>.

Mais de 50% dos oócitos humanos possuem pelo menos uma dessas características morfológicas<sup>51</sup>.

Neste estudo, para comparar e correlacionar a morfologia com a morfometria dos oócitos, esses oócitos foram classificados em morfologia ótima (no máximo uma das características citadas, exceto vacúolo) e alterada (duas ou mais alterações e/ou vacúolo). Vacúolos e aglomerado de retículo endoplasmático parecem ser as características que mais prejudicam a capacidade de desenvolvimento. Poucos estudos falam do impacto negativo dos vacúolos nos

oócitos, mas a maioria deles revela influência negativa na taxa de fertilização e no desenvolvimento até estágio de blastocisto<sup>53-55</sup>.

Os parâmetros morfométricos nos dois grupos foram semelhantes, mostrando que a morfologia ótima e a morfologia alterada não influenciou na medida dos oócitos e seus anexos. Portanto, parece não haver sobreposição das duas informações e é possível que a morfometria detecte características estruturais distintas daquelas incluídas na análise morfológica padrão.

No presente estudo, após o descongelamento os oócitos, que estavam preservados foram novamente submetidos à análise morfológica e morfométrica. O diâmetro oocitário, o EPV e ZP tiveram medidas semelhantes nos oócitos com morfologia ótima e alterada.

Entretanto os oócitos com morfologia alterada apresentaram uma significativa redução na medida do CP, sugerindo que apenas esta medida sobrepõe a morfologia e a morfometria dos oócitos descongelados.

O CP possui um núcleo com 23 cromossomos e 46 cromátides, similar ao encontrado no oócito. Um CP com a morfologia alterada (fragmentado) pode refletir na qualidade do oócito, devido à interdependência da formação óvulo-corpúsculo polar. Ao avaliar o CP, indiretamente se avalia a qualidade do oócito.

Variações no tamanho do corpúsculo polar (pequeno ou grande) podem representar uma condição anormal. O fator que determina o tamanho do corpúsculo polar é, provavelmente, a posição do fuso meiótico em relação à superfície do oócito.

A extrusão do primeiro corpúsculo polar pode variar entre os oócitos aspirados, presumivelmente devido à variação do tempo da maturação meiótica.

Oócitos com primeiro corpúsculo polar pequeno estão associados à redução na fertilização e aumento de triploide.

Oócitos com primeiro corpúsculo polar fragmentado ou achatado podem demonstrar reduzido potencial de desenvolvimento.

Corpúsculo polar fragmentado, juntamente com espaço perivitelino largo e inclusões citoplasmáticas, está associado à redução da fertilização e qualidade embrionária pobre<sup>96,97</sup>

Em oócitos pós-maduros o corpúsculo polar pode já estar degenerando. Corpúsculos polares degenerados ou grandes podem estar associados a pobre qualidade embrionária e baixa taxa de gravidez<sup>98,99</sup>

## **5.2 Morfometria dos oócitos pré-vitrificação e sua relação com a sobrevivência à criopreservação**

A morfometria dos oócitos frescos não foi capaz de prever a resistência desses oócitos à vitrificação e ao descongelamento, já que as medidas do diâmetro oocitário, EPV, ZP e CP nos oócitos que sobreviveram à vitrificação foram similares as aqueles que se encontravam degenerados após o processo de vitrificação.

Existem poucos estudos na literatura relacionados à morfometria dos oócitos, principalmente quando se trata de vitrificação.

Oócitos são células difíceis de criopreservar, por serem células grandes, com baixa permeabilidade à água. Isso significa que têm tendência a reter água quando congelados e, como consequência, ocorre a formação de gelo intracelular, causando danos à célula.

Durante o descongelamento, a água gerada pelo gelo derretido diminui rapidamente a pressão osmótica extracelular. Choque osmótico pode acontecer se o crioprotetor intracelular não pode difundir-se rapidamente o suficiente para evitar excessivo influxo de água livre e a ruptura ou inchaço da célula<sup>30</sup>.

Entretanto, nossos dados mostram que a resistência a esses potenciais danos celulares no processo da criopreservação não depende das medidas do oócito fresco, nem das suas estruturas acessórias.

A visualização e avaliação do fuso meiótico e zona pelúcida podem ajudar na seleção de oócitos viáveis e na eficácia da criopreservação. O uso do microscópio polarizado pode ser uma ferramenta útil na avaliação da morfometria de oócito, pois permite a quantificação e avaliação da orientação dos microtúbulos dentro do fuso meiótico, como também das glicoproteínas dentro da zona pelúcida<sup>75</sup>.

Os parâmetros morfométricos de oócitos em metáfase II, utilizando microscópio polarizado, mostrou ZP mais espessa quando existia alta zona de birrefringência. Em oócitos com fuso e alta zona de birrefringência, o EPV foi mais estreito. Existe associação entre ZP e birrefringência do fuso<sup>92</sup>.

### **5.3 Morfometria dos oócitos pós-descongelamento e sua relação com a fertilização**

Dos 27 oócitos que sobreviveram ao processo de vitrificação e foram submetidos à ICSI, 13 fertilizaram-se e 14 não resultaram em fertilização.

Comparando o diâmetro dos oócitos entre os que fertilizaram e os que não fertilizaram pós-descongelamento, verificou-se que o diâmetro foi menor nos oócitos que fertilizaram. Os oócitos que não fertilizaram obtiveram aumento do diâmetro total e diminuição do espaço perivitelino.

Para a fertilização acontecer naturalmente, o oócito deve preservar a integridade das suas características estruturais. Essas características incluem zona pelúcida, grânulos corticais e fuso microtubular<sup>27</sup>.

Quando a água é congelada abaixo do ponto de congelamento, ela se solidifica e forma cristais de gelo. Devido ao gelo ser menos denso do que a água, é necessário que os cristais de gelo ocupem um volume maior do que o volume da água, partindo do ponto em que foi formado. O volume da água dentro da célula se solidifica, expande-se em forma de gelo, causando pressão nas organelas intracelulares as quais podem sofrer danos consideráveis<sup>28</sup>.

O choque osmótico pode ocorrer durante o descongelamento rápido, quando a célula encolhe e aumenta de tamanho para acomodar alterações da pressão osmótica extracelular. Isso pode causar deformidades no oócito e danos no citoesqueleto. Durante o processo de reidratação, choques osmóticos podem causar excessivo aumento da célula, ruptura da membrana, lise e morte celular. Esses danos podem estar relacionados à despolimerização dos microtúbulos, alinhamento inadequado dos cromossomos e aumento do risco de aneuploidia<sup>28</sup>.

Os oócitos que não fertilizaram provavelmente podem ter sofrido choque osmótico, causando aumento no diâmetro e, conseqüentemente, a não fertilização.

## 6 CONCLUSÕES

- Não há correlação entre os parâmetros morfológicos e morfométricos de oócitos avaliados antes da vitrificação; porém a morfologia alterada pós descongelamento associa-se a menor medida do corpúsculo polar.
- As características morfométricas de oócitos frescos não permitem prever a resistência desses oócitos à vitrificação.
- A falha de fertilização está associada a maior expansão do diâmetro oocitário e encolhimento do espaço perivitelino durante o processo de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

1. Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod.* 2006; 21(10):2583-92.
2. Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H, et al. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130(2):148-55.
3. Speechley KN, Barrera M, Shaw AK, Morrison HI, Maunsell E. Health-related quality of life among child and adolescent survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(16):2536-43.
4. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following criopreservation, thawing, and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983; 305:707-709.
5. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryo, oocytes, or ovaries. *Oncologist.* 2007; 12(9):1044-54.
6. Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2008; 10(5):268-73.
7. Chian RC, Gilbert L, Huang JY, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril.* 2009; 91(2):372-6.
8. Kavoussi SK, Fisseha S, Smith YR, Smith GD, Christman GM, Gago LA. Oocyte cryopreservation in a woman with mosaic Turner syndrome: a case report. *J Reprod Med.* 2008; 53(3):223-6.
9. Essential elements of informed consent for elective oocyte cryopreservation: a Practice Committee opinion. *H Fertil Steril.* 2007; 88(6):1495-6.
10. Helmy S, Leonardo R, Arianna P, Attilia F, Imam El-D. Pregnancies and deliveries after injection of vitrified-warmed oocytes with cryopreserved testicular sperm. *Fertil Steril.* 94(7):2010
11. Gidoni. Fertility preservation in patients whit non-oncological conditions, *Reprod Biomed Online.* 2008; 16(6):792-800.
12. Agarwal A. Technical and ethical challenges of fertility preservation in young cancer patients, *Reprod Biomed. Online.* 2008; 16(6):784-791.

13. Stoop D, Van Landuyt L, Paquay R, Fatemi H, Blockeel C, De Vos M, *et al.* Offering excess oocyte aspiration and vitrification to patients undergoing stimulated artificial insemination cycles can reduce the multiple pregnancy risk and accumulate oocytes for later use. *Hum Reprod.* 2010; 25(5):1213-1218.
14. Vajta ZP, Nagy Cobo A, Conceição J, Yovich J. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *RBM Online.* 2009; 19(Suppl 3):1-7.
15. Kattera S, Chen C. Cryopreservation of embryos by vitrification: current development. *Int Surg.* 2006; 91(5 Suppl):S55-62.
16. Borini A, Cattoli M, Bulletti C, Coticchio G. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1127:49-58.
17. Porcu E. Freezing of oocytes. *Curr Opin Obstetric Gynecology.* 1999; 11: 297-300.
18. Ahuja KK, Simons EG. Advanced oocyte cryopreservation will not undermine the practice of ethical egg sharing. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12(3):282-3.
19. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, *et al.* Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 169(1-2):33-7.
20. Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, *et al.* Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17(2):265-7.
21. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing--a review article. *Mol Cell Endocrinol,* 2003; 202(1-2):101-7.
22. Porcu E, Bazzocchi A, Notarangelo L, Paradisi R, Landolfo C, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15(6):529-35.
23. De Melo-Martin I, Cholst IN. Researching human oocyte cryopreservation: ethical issues. *Fertil Steril.* 2008; 89(3):523-8.
24. Baris A, Ri-Cheng C, Seang LT, James E, Dodds P. Cryopreservation of oocytes and embryos for fertility preservation for female cancer patients. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010; 24(Issue 1):101-112.
25. AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed online.* 2010; 20(2): 209–22.

26. Igor I. (ed.). Current frontiers in cryobiology. Katkov Copyright 2012 in tech Vitrification of oocytes and embryos Part 3- Chapter 6 Pg 169-184 Juergen Liebermam Director of laboratory, Fertility Centers of Illinois, Chicago, IL USA
27. Igor I. (ed.). Current frontiers in cryobiology. Katkov Copyright 2012 in tech technologies for cryopreservation – overview and innovation Part 8- Chapter 19- pg 528-546 Edoardo Lopez, Katuscia Cipri and Vincenzo Naso. Sapienza University of Rome, Rome Italy.
28. Mazur P, Schneider U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophys.* 1986; 8:259.
29. GM F. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 23 (1986) 1-132.
30. John K, Jain MD, Richard J, Paulson MD. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril.* 2006; 86(Suppl):1037-1046.
31. Kuwayama M, Vajta G, Kato O. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005; 11:300-08.
32. Lucena E, Bernal DP, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril.* 2006; 85:108-11.
33. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenolog Y.* 2007; 67:73-80.
34. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reprod Update.* 2008; 14(2): 159-77.
35. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wilker SR, Wrigh G. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analyses of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril.* 1989; 51(5): 820-7.
36. Bertrand E, Van Den Bergh M, Englert Y. Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum Reprod.* 1995; 10(5): 189-9.
37. Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human cumulus cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage, and cleavage os the corresponding oocyte after intracytoplasmatic sperm injection. *Fertil Steril.* 2002; 77(3):511-5.
38. Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K, Lindenberg S. Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet.* 2000; 17(6): 323-8.

39. Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril*. 2004; 81(Suppl 1):850-6.
40. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycle. *Hum Reprod*. 2005; 20(6):1596-606.
41. Talbot P, Dandekar P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc Res Tech*. 2003; 61(4):349-57.
42. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997; 12(8):1750-5.
43. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1996; 11(3):595-7.
44. Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J. Consequences of oocyte dysmorphism on the fertilization rate and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. A prospective multicenter study. *Gynecol Obstet Fertil*. 2002; 30(10):772-9.
45. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(1):40-8.
46. Gitlin SA, Gibbons WE, Gosden RG. Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6(4):403-9.
47. Harper JC, SenGupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011 *Hum Genet*. 2012; 131:175-186.
48. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod*. 1997; 12(8):1750-5.
49. Van Blerkom J, Henry G . Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 1992; 7(3):379-90.
50. Kahraman S, Yakin K, Donmez E. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection . *Hum Reprod*. 2000; 15(11):2390-3.
51. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review . *Hum Reprod Update*. 2003; 9(3):251-62 .

52. Ten J, Mendiola J, Vioque J de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(1):40-8.
53. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequence of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Tech.* 1990; 16(4):324-46.
54. Nayudu PL, Lopata A, Jones GM. An analysis of human oocytes and follicles from stimulated cycles: oocyte morphology and associated follicular fluid characteristics. *Hum Reprod.* 1989; 4(5):558-67.
55. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999; 72(2):240-4.
56. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet.* 1986; 1:884-6
57. Al Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Human Reprod.* 1987; 2:695-700.
58. Gook DA, Schiewe Mc, Osborn SM, Asch RH, Jansen RP, Johuston WI. Intracytoplasmic Sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2 propanodiol. *Hum Reprod.* 1995; 10:2637-41.
59. Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, et al. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995; 10:2650-54.
60. Porcu E, Fabri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, *et al.* Clinical experience and application of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinology.* 2000; 169:33-7.
61. Fabri R, Porcu E, Maesella T, Rochetta G, Venturoli S, Flamigui C. Human oocyte cryopreservation: new perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod.* 2001; 16:411-6.
62. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocyte. Case report. *Hum Reprod.* 1999; 14:3077-9.
63. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Koj J, Chung HM, *et al.* Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo transfer program. *Fertil Steril.* 2003; 79:1323-6.

64. Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Bucket WM, Tan SL. High survival rates and pregnancies of human oocyte following vitrification. *Fertil Steril*. 2005; 84(Suppl 1):S36.
65. Kuwayama M, Vajita G, Kato O, Leibo SP. High eficiente vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11:300-8.
66. Lucena E, Bernad DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. 2006; 85:108-11.
67. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online*. 2009; 18:769-777.
68. Chian R-C, Huang JYJ, Tan SL, *et al*. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrifi ed oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16:608-610.
69. Josiane Van der E. Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update*. 2003; 9(5):463-470.
70. David HE, Debra AG. How should the clinical efficiency of oocyte cryopreservation be measured? *Bio Medicine Online*. 2007; 13(4):430-435.
71. Debra AG, David HE. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update*. 2007; 13(6):591-605.
72. Borini A, Gattoli M, Bulletti C, Coticchio G. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann NY Acad Sci*. 2008; 1127:49-48. Doi: 1196/annals. 1434.012.
73. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update*. 2007; 13(6):591-605.
74. Gábor V. Vitrification in ART: getting closer? *Acta Sci Veterinariae*. 2010; 38(Supl 2):s565-s572.
75. Werner M, Reh A, Labella PA, Noyes N. Laboratory evaluetion in oocyte cryopreservation suggests retrieved oocytes are comparable whether frozen for medical indications, deferred reproduction or oocyte donation. *J Assisted Reprod Genetic*. 2010; 27:613-617.
76. Selman H, Rinaldi L, Pacchiarotti A, Floccari A, El-Danasouri I, Pregnancies and deliveries after injection of vitrified-warmed oocytes with cryopreserved testicular sperm. *Fertil Steril*. 2010; 94(7).
77. Martinez-Burgos M, Herrero L, Megias D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, *et al*. Vitrification versus slow feeezing of oocytes: effects on morphologic

- appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril*. 2011; 95(1).
78. Yun-Xia C, Qiong X, Li L, Lin C, Zhi-Guo Z, Zhao-Lian W, *et al*. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2009; 92(4).
  79. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2011; 96(2).
  80. Souza Setti A, Figueira RCS, Braga DPAF, Ferreira RC, Laconelli Jr. A, Borges E. Oocyte morphology does not affect post-warming survival rate in an egg-cryobanking donation program. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28:1177-1181.
  81. Wennerholm UB, Söderström-Anttila V, Bergh C, Aittomäki K, Hazekamp J, Nygren KG, *et al*. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum Reprod*. 2009; 24(9):2158-72.
  82. Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, Merola M, Comi R, De Ponti E, *et al*. Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19(2):171-80.
  83. Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Wright G, Kort HI, Nagy ZP. Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2008; 16(3):346-9.
  84. Faten A, Desai N, Mansour YA, Ezzat HS, Ahmed MA, Mohamed A B Oocyte Cryopreservation: a technical and clinical update. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2009; 4(4):443-454.
  85. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008; 89(6):1657-64.
  86. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006; 86(1):70-80.
  87. Porcu E, Bazzocchi A, Notarangelo L, Paradisi R, Landolfo C, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008; 15(6):529-35.
  88. De Melo-Martin I, Cholst IN. Researching human oocyte cryopreservation: ethical issues. *Fertil Steril*. 2008; 89(3):523-8.
  89. American Society for Reproductive Medicine. Mature oocyte cryopreservation: a guideline The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive

Technology. Birmingham, Alabama, Fertil Steril. 2013; 99(1):0015-0282. Copyright ©2013 Published by Elsevier Inc.

90. Chan PJ. Morphometric analysis of the zona pellucida and ooplasm of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) Eggs. Primates. 1987; 28(3):411-415.
91. Saeedeh N, Khalili MA, Esmailzadeh F, Mohsenzadeh M. Maturation capacity, morphology and morphometric assessment of human immature oocytes after vitrification and in-vitro maturation. Iran J Reprod Med Summ. 2011; 9(3):209-216.
92. Valeri C, Pappalardo S, De Felici M, Manna C. Correlation of oocyte morphometry parameters with woman's age. J Assist Reprod Genet. 2011; 28:545-552.
93. Camargos MGRS, Lobach VNM, Pereira FAN, Lemos CNCD, Reis FM, Camargos AF. Computer-assisted oocyte morphometry before ICSI: correlation of oocyte measurements with fertilization and embryo development. Reprod Sci. 2012; 19(3):306-311.
94. Coticchio G, Borini A, Distratis V, Maione M, Scaravelli G, Bianchi V, *et al.* Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. J Assist Reprod Genet. 2010; 27:131-140.
95. Machin D, Campbell M, Fayers P, Pinol A. Sample size tables for clinical studies. Blackwell Science, 1997; pp. 24-25.
96. Veeck LL. Na atlas of human gametes and conceptuses: na illustrated reference for assisted reproductive technology. Carnforth, UK: Parthenon Publishing Group, 1999.
97. Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, *et al.* Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicator of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. Hum Reprod. 1995; 10:2343-9.
98. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte graded based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod. 1997; 12:1750-5.
99. Edner T, Yaman C, Moser M, *et al.* Prognostic value of the first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 2000; 15:427-30.

## APÊNDICE E ANEXO

### APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

#### Projeto de Congelamento de Oócitos

Declaro estar participando voluntariamente do Projeto de Congelamento de Oócitos do Hospital das Clínicas da UFMG. Estou ciente de poder me desligar deste projeto a qualquer momento, sem que haja prejuízo para o tratamento de infertilidade (fertilização *in vitro* - FIV e /ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI) que me foi indicado. Já tive oportunidade de esclarecer dúvidas relativas ao programa de infertilidade, aos tratamentos alternativos, aos possíveis desconfortos, efeitos colaterais e riscos inerentes ao tratamento.

Fui informada de que o congelamento de oócitos é uma alternativa para aquelas pacientes que desejam adiar a maternidade por motivos pessoais, para aquelas que devem adiar a maternidade devido a tratamentos rádio e quimioterápicos e, ainda, é uma opção ética para os atuais problemas legais e morais relacionados ao congelamento de embriões.

Se forem coletados sete, um oócito será congelado;  
se forem coletados oito, dois serão congelados;  
se forem coletados nove, três serão congelados, e assim por diante.

Estou ciente de que os oócitos congelados ficarão sob a guarda do Laboratório de Reprodução Humana. Fui informada de que os oócitos congelados poderão ter duas finalidades: serão utilizados por mim mesma numa nova tentativa de gravidez ou, se eu desejar, poderão ser doados. Para fins de doação, assinarei um novo Termo de Consentimento para Doação de Óvulos. Comprometo-me a comunicar, periodicamente, ao serviço, o meu desejo de manter os óvulos estocados e concordo que os mesmos sejam descartados, se eu me ausentar pelo período de dois anos.

Estou ciente de que não serei punida se me recusar a participar do referido projeto e que serei informada em detalhes e com antecedência sobre possíveis mudanças referentes ao projeto que venham influenciar minha decisão de prosseguir com o programa ou não.

Estou ciente de que o projeto poderá ser suspenso, a critério médico, quando houver algum fato significativo que possa aumentar o desconforto, efeitos colaterais e/ ou riscos ou, ainda, no caso de não haver boas chances de sucesso (gravidez) com a progressão do projeto.

Estou, ainda, ciente de que quaisquer informações obtidas durante a realização deste projeto que se refiram diretamente a mim são verdadeiras e permanecerão confidenciais, como previsto em lei. Concordo que os dados obtidos durante o projeto sejam publicados em literatura médica, sob a condição de que minha identidade seja preservada.

Declaro e confirmo mais uma vez que entendi todas as explicações que me foram dadas de forma clara e simples, inclusive permitindo que eu realizasse todas as perguntas e fizesse todas as observações que achei pertinente para entender o que acontecerá durante a realização deste experimento.

Por este consentimento, confirmo que estou satisfeita com as informações recebidas e que compreendo todos os riscos e benefícios decorrentes desse tratamento e participação neste projeto de pesquisa e, por tais condições, consinto em participar do “Projeto de Congelamento de Oócitos”.

Não havendo dúvidas, dato e assino abaixo:

Casal:

CI \_\_\_\_\_

CI \_\_\_\_\_

Testemunhas:

CI \_\_\_\_\_

CI \_\_\_\_\_

Pesquisadores responsáveis:

Dr. Aroldo Fernando Camargos- 86097293

Dr<sup>a</sup>. Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos -99815929

Maria das Graças Rocha de Santana Camargos- 86097293

Verônica Nere de Magalhães Lobach- 88673099/34717561

Laboratório de Reprodução Humana HC-UFMG Tel.: 3409-9485

COEP (Comissão de Ética em Pesquisa) Tel.: 3499-4295



Universidade Federal de Minas Gerais

Hospital das Clínicas

Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos



### Consentimento para técnicas de reprodução assistida

Nós, \_\_\_\_\_ (paciente)  
e \_\_\_\_\_ (parceiro),  
vimos, por meio deste termo, declarar que:

Consentimos livremente em participar do programa de fertilização assistida do Hospital das Clínicas da UFMG.

Estamos cientes de nosso diagnóstico de infertilidade e reconhecemos que as Técnicas de Reprodução Assistida têm o papel de auxiliar na resolução desse problema, facilitando nosso processo de procriação, visto que as outras terapêuticas foram ineficazes ou ineficientes para a solução da situação atual de infertilidade.

Realizamos todos os exames que nos foram propostos (anti-HIV 1 e 2, HTLV 1 e 2, VDRL, HBsAg, anti-HCV) e cujos resultados se encontram em nosso poder. Eu, \_\_\_\_\_ reafirmo também estar com o esquema vacinal e avaliação ginecológica em dia, estar em uso de ácido fólico e não apresentar alguma doença que contraindique uma gravidez.

Fomos informados sobre todas as etapas do tratamento, que consistem em:

- Bloqueio hipofisário a partir do uso de medicação nasal ou injeções subcutâneas. Em situações especiais, o bloqueio não é obtido de maneira satisfatória e a paciente será solicitada a modificar a dose e o tipo de medicação. Isso pode significar cancelamento daquele ciclo e reinício no próximo no ciclo.
- Indução da ovulação a partir de injeções subcutâneas ou intramusculares, com rastreamento (acompanhamento) da ovulação por ultrassonografia (US) endovaginal. Embora raramente, poderá ocorrer o não

desenvolvimento dos folículos que contêm os óvulos. Caso isso ocorra, o ciclo do tratamento será cancelado.

- Coleta ovular por via transvaginal guiada por US, sob sedação endovenosa, em ambiente cirúrgico. Durante a coleta ovular é esperado que se obtenham óvulos, mas excepcionalmente esse procedimento pode terminar sem sucesso. Durante a coleta podem ocorrer complicações referentes ao procedimento: sangramento vaginal, dor local, lesão de estruturas pélvicas (bexiga, intestino, vasos sanguíneos), complicações anestésicas.
- Coleta do sêmen realizada por masturbação. Em casos individualizados a coleta de espermatozoides deverá ser realizada por punção de epidídimo, biópsia de testículo ou eletroejaculação. Esses procedimentos serão realizados pela equipe de andrologia do Hospital das Clínicas. Em raros casos, pode-se não obter espermatozoides mesmo através de punção de epidídimo ou biópsia testicular. Neste caso:

\_\_\_\_\_ (autorizamos/ não autorizamos utilizar sêmen de doador / não se aplica).

- Transferência de embriões guiada por ultrassonografia. Em raros casos, os óvulos coletados poderão não fertilizar. Caso isso ocorra, não haverá embriões para serem transferidos.
- Suporte da fase lútea com o uso de comprimidos de progesterona natural por via vaginal.

Os embriões excedentes serão cultivados e, caso atinjam o estágio de blastocisto, serão congelados. Se houver maior número de oócitos coletados, esses também poderão ser criopreservados.

\_\_\_\_\_ (autorizamos/não autorizamos) o congelamento de embriões excedentes.

Entendemos também que, em relação à reprodução assistida *post mortem*, não constitui ilícito ético a sua realização, desde que haja autorização prévia específica do(a) falecido(a) para o uso do material biológico criopreservado, de acordo com a legislação vigente.

No caso de congelamento de óvulos ou embriões, será assinado um Termo de Consentimento Livre Esclarecido específico para aquele procedimento, quando manifestarmos nossa vontade, por escrito, quanto ao destino que será dado aos pré-embriões, óvulos ou sêmen criopreservados em caso de divórcio, doenças graves ou falecimento de um de nós ou de ambos.

Autorizamos que sejam descartados os óvulos, espermatozoides ou pré-embriões que não atendam aos critérios para armazenamento ou uso posterior.

Estamos cientes de que o programa poderá ser suspenso ou cancelado, a critério médico, quando houver algum fato significativo que possa aumentar o desconforto, efeitos colaterais e/ou riscos ou ainda no caso de não haver boas chances de sucesso (gestação) com a progressão do programa, em qualquer fase do tratamento.

Fomos informados de que a ocorrência de gestação múltipla (mais de um bebê) pode acontecer em quase 25% dos casos, sendo nesses casos, na maioria das vezes, gemelar (90%). Para que se previna a ocorrência de gestação múltipla, estamos cientes de que o número de embriões a serem transferidos seguirá a Resolução 1957/2010 do Conselho Federal de Medicina: mulheres até 35 anos: até dois embriões; mulheres entre 36 e 39 anos: até três embriões; mulheres com 40 anos ou mais: até quatro embriões.

Sabemos também que a indução da ovulação pode resultar em uma síndrome de hiperestimulação ovariana (SHEO), que se caracteriza por uma resposta ovariana exagerada com aumento no volume ovariano, desconforto pélvico, náuseas e, em casos graves (1%), requer internação e acompanhamento clínico rigoroso.

Sabemos que o risco do recém-nascido gerado por técnicas de reprodução assistida apresentar alguma malformação e/ou outras doenças é um pouco mais alto que na população geral, sendo de aproximadamente 5%. Casais cujo homem seja portador de azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen) ou oligoastenozoospermia grave (redução acentuada do número de espermatozoides no sêmen) possuem risco aumentado de terem filhos com alguma alteração, como, por exemplo: microdeleções (alterações) no cromossoma Y, síndrome de Klinefelter (pessoas do sexo masculino com um cromossomo X adicional, 47XXY, estatura elevada, algum desenvolvimento do tecido mamário, testículos pequenos e infertilidade). Em caso de agenesia do

ducto deferente (ausência do ducto que transporta espermatozoides), existe alto risco de o filho ser portador de fibrose cística (doença grave caracterizada por infecções respiratórias, alterações no pâncreas e no suor) e de alterações da fertilidade como o pai.

Entendemos também que a taxa média de sucesso está em torno de 35%, podendo sofrer grandes variações, de acordo principalmente com a idade da paciente e a causa da infertilidade.

Confirmamos que durante o tratamento fomos amplamente esclarecidos, tivemos a oportunidade de esclarecer todas as nossas dúvidas relativas ao referido programa, aos tratamentos alternativos, aos possíveis desconfortos, efeitos colaterais e riscos inerentes ao programa.

Estamos cientes das possibilidades de ocorrerem outras complicações além daquelas descritas neste documento. Reconhecemos que, embora sejam empenhados todos os esforços a fim de evitar ou minimizar os efeitos colaterais e complicações, estes podem ser imprevisíveis tanto em natureza como em gravidade.

Estamos cientes de que não seremos punidos se nos recusarmos a participar do referido programa e que seremos informados em detalhes e com antecedência sobre a ovulação e mudanças referentes ao programa que venham influenciar a nossa decisão de prosseguir ou não com o programa.

Entendemos, ainda, que qualquer informação obtida durante o tratamento que se refira a nós é verdadeira, permanecerá confidencial, como previsto em lei. Concordamos que estes dados sejam utilizados em projetos de pesquisa previamente aprovados por Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e sejam objeto de publicação em literatura médica, sob condição de que nossa identidade seja resguardada.

Fomos informados de que o custo do procedimento será todo coberto pelo Sistema único de Saúde (SUS), porém, o custo das medicações será de nossa inteira responsabilidade e poderemos adquirir a medicação no estabelecimento de nossa confiança e que melhor nos convier.

Tendo lido com atenção e compreendido todas as informações contidas neste documento, recebido todos os esclarecimentos desejados, concordamos em participar do Programa de Fertilização Assistida. Reconhecemos que fomos

informados em detalhes sobre nossos direitos e responsabilidades e, não havendo dúvidas, datamos e assinamos como se segue:

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Paciente: \_\_\_\_\_

DN: \_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_ SAME: \_\_\_\_\_

Parceiro: \_\_\_\_\_

DN: \_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_ SAME: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Médico

CRM MG

Testemunha: \_\_\_\_\_

**ANEXO A**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Parecer nº. ETIC 351/05**

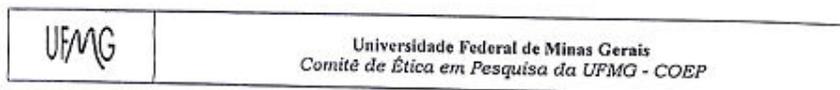
**Interessado: Prof. Aroldo Fernando Camargos  
Departamento de Ginecologia e Obstetícia  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de agosto de 2008, a inclusão dos pesquisadores: Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos, Maria das Graças Rocha Santana Camargos e Verônica Nere Magalhães Lobach, no projeto de pesquisa intitulado “Criopreservação de Oócitos”.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP/UFMG**



**Parecer nº. ETIC 351/05**

**Interessado: Prof. Aroldo Fernando Camargos  
Departamento de Ginecologia e Obstetícia  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de março de 2006, o projeto de pesquisa intitulado **"Criopreservação de Oócitos"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
Presidente do COEP/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA

**MARIA DAS GRAÇAS ROCHA DE SANTANA CAMARGOS -  
2009658641**

Realizou-se, no dia 29 de julho de 2013, às 14.00 horas, Sala de video conferência do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "Aspectos morfológicos e morfométricos de oócitos humanos pré e pós-vitrificação", apresentada por MARIA DAS GRAÇAS ROCHA DE SANTANA CAMARGOS, graduada no curso de Ciências, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador (UFMG), Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni (UFMG), Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares (UFMG), Prof(a). Fernanda Polisseni (UFJF), Prof(a). Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos (PBH).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada  
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2013.

  
 Prof(a). Fernando Marcos dos Reis  
 Doutor - UFRGS

  
 Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni  
 Doutora - UFMG

  
 Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares  
 Doutor - UNIFESP

  
 Prof(a). Fernanda Polisseni  
 Doutora - UFMG

  
 Prof(a). Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos  
 Doutora - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

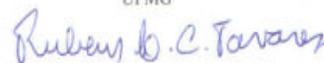
"Aspectos morfológicos e morfométricos de oócitos humanos pré e pós-vitrificação"

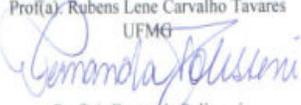
### MARIA DAS GRAÇAS ROCHA DE SANTANA CAMARGOS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 29 de julho de 2013, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares  
UFMG

  
Prof(a). Fernanda Polisseni  
UFJF

  
Prof(a). Cláudia Navarro Carvalho Duarte Lemos  
PBH

  
Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni  
UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2013.

