



2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Preservação da fertilidade: maturação *in vitro* de oócitos pré ou pós vitrificação

Solange dos Santos Carril Machado

2014

Preservação da fertilidade: maturação *in vitro* de oócitos pré ou pós vitrificação

Solange Machado



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Preservação da fertilidade: maturação *in vitro* de oócitos pré ou pós vitrificação

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra), da Doutora Ana Paula Sousa e da Professora Doutora Ana Teresa Almeida Santos (Hospitais da Universidade de Coimbra).

Solange dos Santos Carril Machado

2014

AGRADECIMENTOS

É com bastante trabalho e dedicação que concluo mais uma etapa na minha formação académica, a qual não seria possível sem a colaboração, disponibilidade e boa vontade das pessoas que passo a nomear e às quais quero prestar os meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor João Ramalho-Santos, não só pela orientação e por me ter aceitado no grupo que lidera para desenvolver a minha tese, mas também pelo rigor, profissionalismo, espírito crítico e pelos conhecimentos científicos transmitidos.

À Ana Paula, muito mais que uma simples orientadora, uma amiga! Obrigada pela confiança em mim depositada, pela disponibilidade, mesmo quando cheia de trabalho, e pelos conhecimentos transmitidos. Muito obrigada!

Ao serviço de reprodução humana do CHUC, em especial à Professora Doutora Teresa Almeida Santos por permitir e apoiar a realização da minha tese no serviço que lidera, mas também por me permitir ter contato com todas as técnicas inerentes aos laboratórios de embriologia e andrologia.

À Origio, na pessoa do Doutor Benjamin Rushton e Senhor Filipe Santos, pela oferta das *cryopettes*.

Ao matadouro Mapicentro por permitir a recolha dos ovários de bovino.

À Doutora Rosa Lino Neto, à Doutora Carla Marques, ao Doutor José Maria e aos restantes intervenientes no processamento do soro de vaca em cio.

À Aviourém, na pessoa do Senhor António Augusto pela oferta da gonadotrofina coriónica equina.

A todos os funcionários do serviço de reprodução humana do CHUC pela paciência, simpatia, carinho e acima de tudo pelos momentos de boa disposição que me proporcionaram. Obrigada por me acolherem tão bem! Um agradecimento especial às

“meninas do laboratório” Raquel e Rita pelas conversas hilariantes, pelas inúmeras risadas, pela disponibilidade e pelo apoio. A vós um muito obrigada!

A todo o grupo de biologia da reprodução e células estaminais, obrigada pela ajuda e opinião crítica. Quero agradecer em especial à Mónica por ter sido a minha companheira de laboratório nesta etapa. Muito obrigada pelo apoio, pelo positivismo, pela boa disposição, pela companhia e pela disponibilidade. Muito muito obrigada! À Bárbara que me acompanhou e ajudou imenso no início desta etapa, muito obrigada por tudo!

À minha família pelo apoio incondicional a todos os níveis e por todo o carinho.

Aos meus amigos por estarem sempre presentes e me fazerem sorrir!

Ao Miguel pela paciência, pela compreensão, pelo apoio incondicional...enfim, por tudo!

Obrigada por estares sempre do meu lado e por me fazeres rir e sorrir!

Aos meus pais...por tudo!

Dedico-vos esta tese

RESUMO

As doenças oncológicas são, depois das doenças cardiovasculares, a segunda principal causa de morte em Portugal. Os avanços ao nível da prevenção, deteção precoce e tratamento permitem a doentes com este tipo de patologia viver por longos períodos de tempo, e assim, questões como a qualidade de vida e a preservação da fertilidade, tornaram-se cada vez mais importantes para as sobreviventes em idade reprodutiva. O número de mulheres em idade reprodutiva, com a sua fertilidade comprometida, tem aumentado consideravelmente e, conseqüentemente, a preservação da fertilidade feminina tem sido alvo de atenção de embriologistas e médicos, sobretudo os que se encontram ligados à medicina da reprodução.

A criopreservação de oócitos deixou de ser considerada uma técnica experimental apenas em Janeiro de 2013. Contudo, dentro das várias opções de preservação da fertilidade feminina é aquela que de forma mais eficaz permite assegurar a autonomia reprodutiva. A vitrificação de oócitos é a técnica de criopreservação que se tem mostrado mais eficaz na criopreservação dos gâmetas femininos e a maturação *in vitro* é uma técnica muito importante quando se trata da criopreservação de oócitos imaturos.

Com este trabalho pretende-se perceber se é mais ou menos benéfico, em termos de integridade estrutural (presença de um fuso meiótico normal e correto alinhamento dos cromossomas), realizar a maturação *in vitro* dos oócitos imaturos pré ou pós vitrificação.

Globalmente, os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que a maturação *in vitro* é mais eficaz quando os oócitos imaturos estão em metáfase I comparativamente com oócitos em prófase I (VG- vesícula germinal) e que a maturação *in vitro* de oócitos em metáfase I é mais eficaz quando realizada antes da vitrificação. Relativamente ao processo de vitrificação é de referir ainda que as taxas de

sobrevivência de oócitos vesícula germinal (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII; maturados *in vitro*) não foram estatisticamente distintas ($p=0,121$) entre os três grupos testados. Os resultados permitem ainda concluir que, independentemente do momento em que a maturação *in vitro* foi realizada (pré ou pós vitrificação), os oócitos maturados *in vitro*, nos quais foi realizada a análise da integridade do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomas, todos eles apresentavam danos a este nível.

A maturação *in vitro* e vitrificação de oócitos são já uma realidade em alguns laboratórios de embriologia e, é esperado que este número suba consideravelmente nos próximos anos dado o aumento notável de mulheres em idade reprodutiva com necessidade de preservar a sua fertilidade. Tendo em conta que o presente estudo, assim como outros, têm demonstrado que estas técnicas podem ter efeitos nefastos ao nível da integridade do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomas, a tendência será a utilização de tecnologias, como o PolScope, que permitem a visualização *in vivo* da integridade do fuso meiótico e que, portanto, permitem a seleção de oócitos com fusos intactos para as técnicas de reprodução medicamente assistida.

Palavras-chave: Preservação da fertilidade; Oócitos; Maturação *in vitro*; Vitrificação

ABSTRACT

Cancer is after cardiovascular diseases, the second leading cause of death in Portugal. Advances in the prevention, early detection and treatment allow patients with this type of pathology to survive for long periods of time, and issues such as quality of life and fertility preservation, became increasingly important to reproductive age survivors. The number of patients of reproductive age, with compromised fertility, has increased considerably and consequently the preservation of female fertility has been the subject of attention of embryologists and physicians, especially those practicing reproductive medicine.

Since January 2013, oocyte cryopreservation is no longer considered an experimental technique. However, among various options for female fertility, oocyte cryopreservation is the one that provides the most effective method to ensure reproductive autonomy. Oocyte vitrification is a cryopreservation technique which has shown to be the most effective in cryopreservation of female gametes, and *in vitro* maturation is very important when it is combined with cryopreservation of immature oocytes.

With this work we intend to see whether it was more or less beneficial, in terms of structural integrity (presence of a normal meiotic spindle and correct alignment of chromosomes), to perform oocyte *in vitro* maturation prior or post vitrification.

Overall, the results obtained in this study allow us to conclude that *in vitro* maturation is most effective when immature oocytes are in metaphase I oocytes compared with oocytes in prophase I (GV- germinal vesicle), and that *in vitro* maturation of oocytes in metaphase I is more effective when performed prior to vitrification. Regarding the vitrification process we concluded that survival rates of *in vitro* matured germinal vesicle, metaphase I (MI) and metaphase II (MII) oocytes were not statistically different ($p = 0.121$) between the three groups tested. It also allowed us to conclude that

regardless of the moment of *in vitro* maturation (prior or post vitrification) *in vitro* matured oocytes all showed damage in terms of the integrity of the meiotic spindle and chromosome alignment.

In vitro maturation and vitrification of oocytes are already a reality in some *in vitro* fertilization laboratories, and it is expected the considerable increase in the use of these techniques in the coming years, due to the remarkable increase of patients of reproductive age in need of preserving their fertility. Considering that this study and similar others have shown that these techniques can have harmful effects to the integrity of the meiotic spindle and chromosome alignment, a tendency will be the use of technologies such as PolScope, that enable *in vivo* imaging of meiotic spindle integrity and which therefore allow the selection of oocytes with intact spindles for assisted reproduction techniques.

Key words: Fertility preservation; Oocytes; *In vitro* maturation; Vitrification

ÍNDICE

Capítulo I: Introdução	12
1. Sistema Reprodutor Feminino	13
2. Oogénese e Foliculogénese	14
3. Infertilidade humana e técnicas de reprodução medicamente assistida	18
4. Maturação de oócitos.....	20
4.1. <i>Maturação in vitro</i> de oócitos	25
5. Criopreservação	29
5.1. Os crio-danos e o papel dos agentes crioprotetores	30
5.2. Técnicas de criopreservação	32
5.3. Congelação lenta vs. vitrificação.....	35
5.4. Criopreservação de embriões.....	36
5.5. Criopreservação de tecido ovárico.....	37
5.6. Criopreservação de oócitos	37
6. Preservação da Fertilidade	43
7. Objetivo	47
Capítulo II: Material e Métodos	48
1. Desenho Experimental.....	49
2. Material Biológico.....	50
3. Obtenção dos gametas.....	50
4. Técnicas laboratoriais	50
4.1. Maturação <i>in vitro</i>	50
4.2. Vitrificação.....	51
4.3. Desvitrificação	52
4.4. Imunocitoquímica e microscopia de epifluorescência	52
5. Análise estatística	53
Capítulo III: Resultados	55
1. População de estudo	56
2. Maturação <i>in vitro</i> “a fresco”	59
3. Maturação <i>in vitro</i> pós vitrificação.....	69
4. Maturação <i>in vitro</i> “a fresco” e pós vitrificação	76
Capítulo IV: Discussão	81
1. Fonte de oócitos	82
2. Características da população em estudo e taxas de maturação <i>in vitro</i> pré e pós vitrificação.....	83

3. Maturação <i>in vitro</i> “a fresco”: fonte de oócitos, células do <i>cumulus oophorus</i> e meio de maturação <i>in vitro</i>	84
4. Fecundação após maturação <i>in vitro</i>	86
5. Taxas de sobrevivência à vitrificação.....	87
6. Maturação <i>in vitro</i> pré e pós vitrificação.....	88
7. Maturação <i>in vitro</i> , vitrificação e danos no fuso meiótico e microtúbulos	89
8. Considerações finais	92
Capítulo V: Conclusões	94
Capítulo VI: Bibliografia	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
ARN (RNA)	Ácido ribonucleico
CPAs	Agentes crioprotetores (Cryoprotector agents)
CPG	Células primordiais germinais
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormona folículo-estimulante
G	Glicerol
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
GP	Globo polar
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hMG	Gonadotrofina menopáusica humana
ICSI	Injeção intracitoplasmática de um espermatozoide
IU	Inseminação intra utrina
IMSI	Injeção intracitoplasmática de um espermatozoide selecionado por morfologia de alta resolução
IVM	Maturação <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> maturation)
LH	Hormona luteinizante
mARN (mRNA)	Ácido ribonucleico mensageiro
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
PROH	Propilenoglicol
VG	Vesícula germinal

I

I INTRODUÇÃO

II MATERIAL E MÉTODOS

III RESULTADOS

IV DISCUSSÃO

V CONCLUSÕES

VI BIBLIOGRAFIA

1. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO

O sistema reprodutor feminino é constituído por duas gónadas, os ovários, duas trompas de falópio, útero, vagina (figura 1). A sua função é produzir os gâmetas femininos, os óocitos, e assegurar todo o desenvolvimento embrionário e fetal até ao nascimento, caso estes mesmos óocitos sejam fecundados. O aparelho reprodutor feminino produz também hormonas que têm um papel fundamental no controlo de todos os processos inerentes a este sistema, e que têm também importância noutros órgãos. Nas gónadas femininas ocorrem dois processos simultâneos integrados, a oogénese e a foliculogénese (Junqueira & Carneiro, 2004).

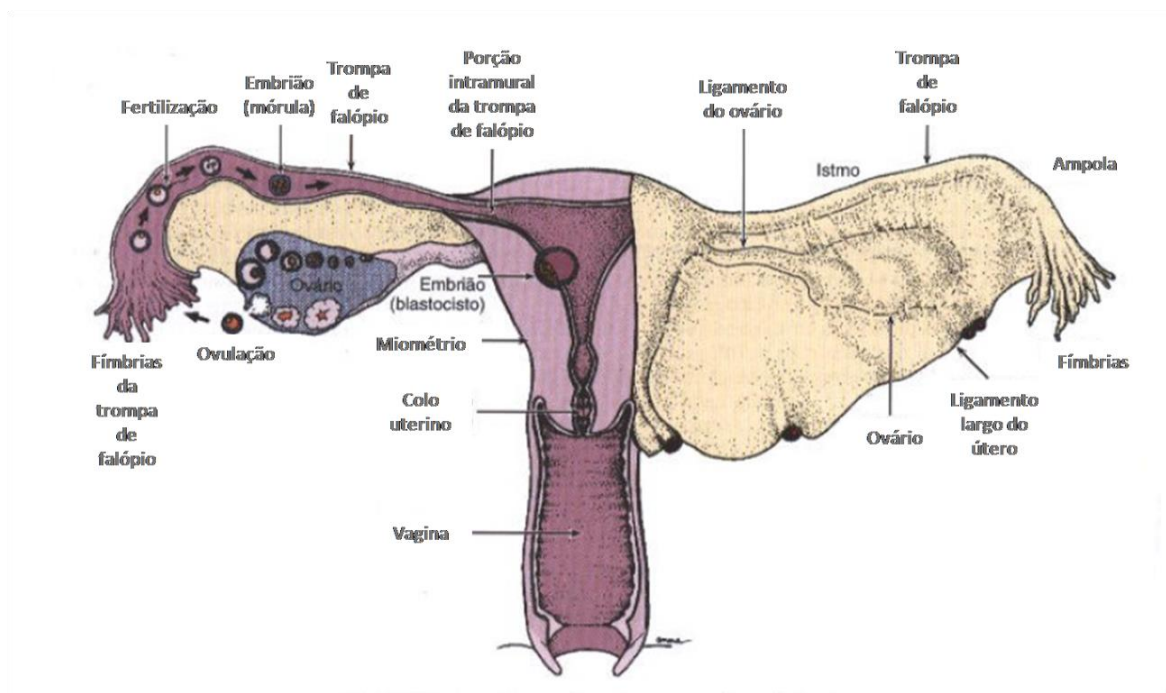


Figura 1: Sistema reprodutor feminino (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004).

2. OOGÉNESE E FOLICULOGÉNESE

A oogénese é um processo que tem início por volta do primeiro mês de vida embrionária quando um pequeno aglomerado de células primordiais germinais (CPG) migra de próximo do saco vitelino até ao esboço gonadal, onde as gónadas se começam a desenvolver. Nas gónadas, essas células dividem-se por mitose e transformam-se em oogónias. No segundo mês de vida intrauterina formam-se cerca de 600.000 oogónias e ao fim do quinto mês, estas já perfazem um total de 7 milhões (Junqueira & Carneiro, 2004). É a partir do terceiro mês que as oogónias entram na prófase da primeira divisão meiótica, e ficam bloqueadas na fase de diplóteno, por ação de fatores inibitórios produzidos pelas células do *cumulus oophorus*, que chegam ao oócito através das junções tipo *gap* (Voronina & Wessel, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004; Fox, 2011). Essas células são designadas oócitos primários. Antes do sétimo mês de gravidez a maioria das oogónias já se transformou em oócitos primários, estes oócitos permanecem na fase de diplóteno até à adolescência, contudo muitos oócitos são perdidos por atresia (Junqueira & Carneiro, 2004; Fox, 2011).

A foliculogénese está intimamente ligada à oogénese, e diz respeito ao processo pelo qual o folículo ovárico se forma. O folículo ovárico consiste num oócito envolvido por uma ou mais camadas de células foliculares. O desenvolvimento folicular tem início às 15 semanas da gestação e termina por volta das 28 semanas, quando todos os oócitos se encontrarem bloqueados na prófase da primeira divisão meiótica (prófase I). Das 15 semanas de gestação e até ao 6º mês de vida intrauterina é possível identificar cinco tipos de folículos (primordial, primário, pré-antral ou secundário, antral ou maduro e atrésico; Fox, 2011). Os folículos primordiais, que se formaram durante a vida fetal, consistem num oócito primário envolvido por uma única camada de células foliculares achatadas. De entre a população total de folículos primordiais, apenas alguns abandonam o seu estado quiescente e entram na fase de crescimento. A partir da puberdade, a cada mês um pequeno grupo de folículos primordiais inicia o processo

chamado crescimento folicular, que compreende todas as modificações inerentes ao crescimento do oócito e das células foliculares (Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005). O processo de seleção dos folículos que continuam o seu desenvolvimento é ainda desconhecido. A hormona folículo-estimulante (FSH) secretada pela hipófise estimula não só este crescimento folicular, mas também induz o reinício da meiose dos oócitos em prófase I. Para completarem a primeira divisão da meiose, os oócitos têm de passar por um processo de maturação que inclui tanto a maturação nuclear (progressão da cromatina durante a meiose), como a maturação citoplasmática (acumulação de ácidos ribonucleicos, proteínas, reorganizações do citoesqueleto e organelos, e alterações no metabolismo celular; Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005). Os oócitos iniciam posteriormente a segunda divisão da meiose e ficam novamente bloqueados, mas desta vez na metáfase da segunda divisão meiótica (metáfase II), até ao momento da fecundação, sendo nesta fase designados oócitos secundários (Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005; Fox, 2011). As células foliculares primordiais dividem-se por mitose formando uma camada de células cuboides e dando origem ao folículo primário. À medida que vão proliferando, as células foliculares originam um epitélio estratificado também chamado de células da granulosa e o folículo primário dá lugar ao folículo pré-antral (Junqueira & Carneiro, 2004). Nesta fase forma-se também uma membrana composta por glicoproteínas que envolve todo o oócito designada zona pelúcida (Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005; Fox, 2011). À medida que os folículos crescem, quase exclusivamente devido ao aumento em tamanho e número das células da granulosa, começa a acumular-se líquido folicular entre as células foliculares (Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005). Posteriormente, os pequenos espaços que contêm esse fluido juntam-se e as células da granulosa reorganizam-se formando uma cavidade designada antro folicular (Junqueira & Carneiro, 2004; Fox, 2011). Os folículos nesta fase de desenvolvimento são designados folículos secundários ou antrais (Junqueira & Carneiro, 2004). A reorganização das células da granulosa para formar o antro leva a uma subdivisão de duas populações

diferentes deste tipo de células: as células murais, que constituem as camadas mais exteriores; e as células do *cumulus oophorus* que formam um anel à volta do oócito e originam um espessamento de células que serve de suporte ao oócito. A camada de células do *cumulus oophorus* mais próxima do oócito constitui a *corona radiata*. As células do *cumulus oophorus* acompanham o oócito após ovulação (Junqueira & Carneiro, 2004; Fox, 2011). Nesta fase ocorre também a diferenciação das células da teca em teca interna e teca externa. Quando totalmente diferenciadas as células da teca interna produzem hormonas esteróides. As células da teca externa são semelhantes às células do estroma do ovário, mas têm uma organização distinta (Figura 2; Junqueira & Carneiro, 2004; van den Hurk & Zhao, 2005).

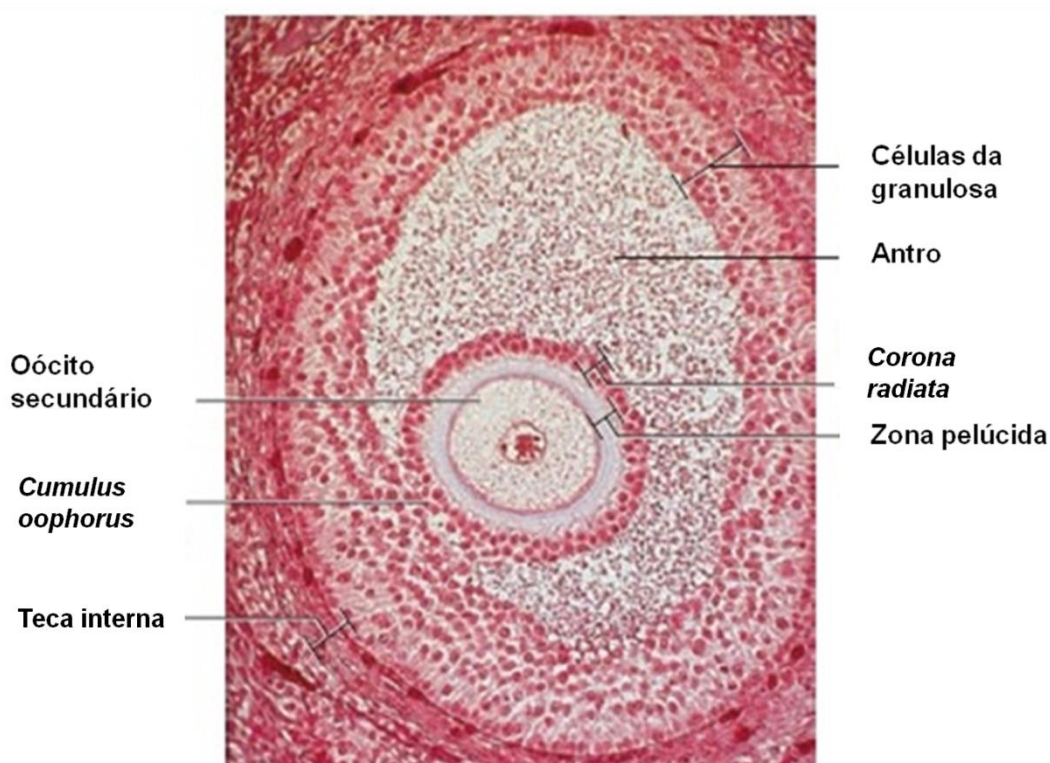


Figura 2: Folículo antral (Adaptado de Fox, 2011).

Normalmente durante cada ciclo menstrual, um folículo cresce muito mais que os outros e torna-se um folículo dominante, que pode alcançar o estadio mais desenvolvido do crescimento folicular, designando-se de folículo maduro ou De Graaf. Sob estimulação

hormonal apropriada, o folículo rompe e expulsa o oócito num processo chamado ovulação. Como referido anteriormente, a célula libertada é um oócito secundário rodeado pela zona pelúcida e pelas células do *cumulus oophorus*. Depois da ovulação, o folículo vazio transforma-se em *corpus luteum* ou corpo amarelo que, sob influência da hormona luteinizante (LH), vai segregar estrogénios e progesterona. Se o oócito não for fecundado há regressão do *corpus luteum* que se transforma num *corpus albicans* ou corpo branco, não funcional (Figura 3; Fox, 2011).

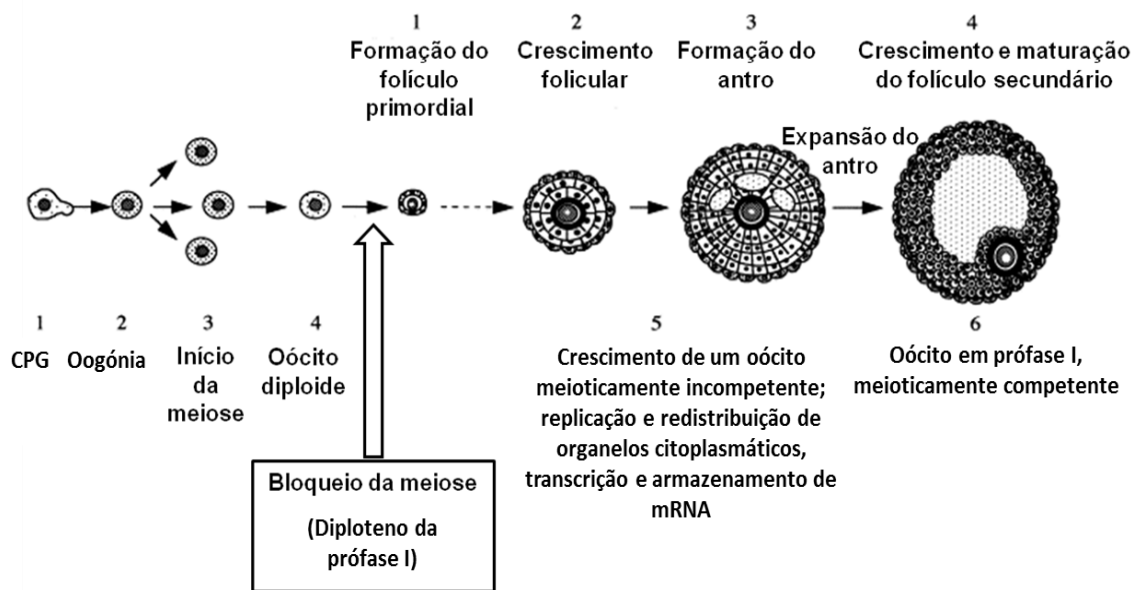


Figura 3: Oogénese e foliculogénese (Adaptado de Picton *et al.*, 1998).

Como referido anteriormente, o córtex de um ovário humano apresenta um número finito de células germinativas primordiais, número este que vai decrescendo ao longo da vida da mulher, como consequência das ovulações e atresia. O número total de folículos sofre uma diminuição considerável por volta dos 37,5 anos, existindo, nesse momento, cerca de 1000 folículos. Nesta altura, inicia-se um decréscimo da função endócrina, começando a mulher a entrar no climatério, habitualmente designado menopausa (transição fisiológica entre o período reprodutivo para o não reprodutivo; Faddy *et al.*, 1992). A data da menopausa é determinada quer pela quantidade inicial de

células germinativas, quer pela sua depleção ao longo da vida (Faddy *et al.*, 1992). A fertilidade feminina baseia-se então neste *pool* de células germinativas, o qual sofre uma diminuição com o aumento da idade, como mencionado anteriormente. Contudo, a fertilidade pode também ficar comprometida pela perda da natural dinâmica folicular, por ação de agentes de quimioterapia, radioterapia, e agentes gonadotóxicos utilizados no tratamento de certas patologias (Anderson & Wallace, 2011).

3. INFERTILIDADE HUMANA E TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA

De acordo com a organização mundial de saúde, a infertilidade humana é uma doença do sistema reprodutivo definida pela incapacidade de conseguir uma gravidez clínica após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares desprotegidas. Este problema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e afeta entre 13-15% dos casais em todo o Mundo (World Health Organization, 2014). A infertilidade é sempre conjugal e pode ser resultado de várias causas de esterilidade que englobam: fator(es) masculino(s), fator(es) feminino (s) (tubar, anovulatório, endometriose, entre outros), fator(es) misto(s) ou fator idiopático (desconhecido; World Health Organization, 2014). A esterilidade, por sua vez, pode ser primária ou secundária. A esterilidade primária verifica-se em mulheres que nunca engravidaram. A esterilidade secundária verifica-se em mulheres que no momento não conseguem engravidar, mas que têm um registo anterior de gravidez (es) clínica (s) (World Health Organization, 2014).

As técnicas de reprodução medicamente assistida são metodologias que permitem a casais inférteis a possibilidade de terem filhos. A taxa de sucesso destas técnicas ronda os 30% nos mais diferentes laboratórios à escala mundial (Fathalla, 2002). Existem essencialmente três tipos de técnicas usadas: a inseminação intra uterina (IIU), a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de um espermatozoide (ICSI) (Malter & Cohen, 2002). Na IIU, após obtenção e processamento dos espermatozoides, estes são colocados na cavidade uterina, com auxílio de um cateter, no momento

adequado do ciclo ovulatório feminino. Na FIV, após obtenção dos gametas femininos e masculinos, são ambos colocados juntamente numa caixa de Petri com meio adequado. Relativamente à ICSI, esta técnica é feita a selecção e injeção de um espermatozoide no citoplasma do oócito por parte do embriologista. A escolha da técnica a usar em cada situação depende da (s) causa (s) de esterilidade (Malter & Cohen, 2002). A utilização das duas últimas técnicas de reprodução assistida implica a estimulação hormonal das utentes, com o intuito de permitir a obtenção de vários oócitos em metáfase II. Os oócitos nesta fase são designados oócitos maduros e estão prontos a serem fecundados. A recolha dos gametas femininos é feita através de punção ecoguiada. Existem essencialmente dois tipos de protocolos de estimulação: o protocolo curto e o protocolo longo. No protocolo curto procede-se numa primeira fase à estimulação folicular com FSH recombinante ou gonadotrofina menopáusica humana (hMG) e, numa segunda fase, quando o maior folículo atinge os 14 mm de diâmetro, associa-se o antagonista da GnRH. Quanto ao protocolo longo, numa primeira fase, procede-se à dessensibilização ovárica em fase luteínica com agonista da GnRH iniciado ao 21^o dia do ciclo. Ao fim de 12 a 14 dias, é confirmada a dessensibilização por ecografia (endométrio fino e ausência de quistos foliculares) e o doseamento de estradiol ($E_2 \leq 50 \text{pg/mL}$). Numa segunda fase, procede-se à estimulação folicular com FSH recombinante ou hMG. Para além destas duas situações, existem casos em que não se realiza qualquer tipo de estimulação e, por isso, o protocolo é designado ciclo natural (Sampaio *et al.*, 2012).

4. MATURAÇÃO DE OÓCITOS

A maturação de oócitos é um longo processo durante o qual os gâmetas femininos se tornam competentes (Hardy *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2012). Por definição, um oócito competente é aquele que tem capacidade para concluir a meiose, para se dividir após fertilização, se desenvolver até ao estadio de blastocisto e originar uma gravidez, e por fim um ser saudável (Torner *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009). De forma muito generalista, o processo de maturação tem sido descrito como um conjunto de alterações na morfologia cromossómica que ocorrem durante a meiose (Voronina & Wessel, 2003). Antes de iniciarem a maturação, os oócitos contêm no núcleo um grande nucléolo também designado vesícula germinal (VG). Os cromossomas na VG estão descondensados, dispersos e transcricionalmente ativos. Com o início do amadurecimento, a transcrição cessa, os cromossomas começam a condensar, há dissolução do invólucro nuclear, e o nucléolo dispersa. À medida que a maturação progride, os pares de cromossomas homólogos alinham-se durante a metáfase da primeira divisão meiótica. A separação dos pares de cromossomas homólogos é seguida pela formação do primeiro globo polar. Em seguida, os restantes cromossomas são novamente alinhados na metáfase da segunda divisão meiótica. Nesta segunda divisão, que só se completa após a fertilização, os cromatídeos irmãos são separados e forma-se o segundo globo polar. Finalmente, os cromatídeos descondensam e forma-se o pró-núcleo feminino (Hardy *et al.*, 2000; Voronina & Wessel, 2003). Contudo, a maturação dos gâmetas femininos não se resume ao conjunto de alterações cromossómicas acima referidas, globalmente designadas por maturação nuclear; ela envolve também a reorganização dos organelos e citoesqueleto, e armazenamento de ácidos ribonucleicos mensageiros (mARNs), proteínas e fatores de transcrição que são fundamentais, não só ao processo de maturação, mas também para a fertilização e desenvolvimento

embrionário inicial. De forma global estas alterações são designadas por maturação citoplasmática (Hardy *et al.*, 2000; Trounson *et al.*, 2001; Stojkovic *et al.*, 2001; Voronina & Wessel, 2003; Nishi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2014) Apesar de muitas vezes subestimada, a maturação citoplasmática é a principal responsável pela qualidade do oócito e conseqüentemente pela qualidade embrionária (Cha *et al.*, 1998). A obtenção de oócitos competentes só é possível se existir uma coordenação dos processos envolvidos na maturação nuclear e citoplasmática (Cha & Chian, 1998; Sanfins *et al.*, 2004; Escrich *et al.*, 2012). Os oócitos possuem uma variedade de organelos típicos da maioria das células (mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático), bem como outros que são exclusivos destes gâmetas (nomeadamente diversos tipos de grânulos; Voronina & Wessel, 2003).

As mitocôndrias têm um papel extremamente importante, uma vez que são responsáveis pelo fornecimento da energia necessária ao processo de maturação (Mao *et al.*, 2014). Para além disso, estes organelos estão também envolvidos nos processos de apoptose e manutenção da homeostase do cálcio (Mao *et al.*, 2014). O movimento das mitocôndrias para áreas de elevado consumo energético é determinante, e por isso, à medida que o oócito vai maturando as mitocôndrias vão adquirindo diferentes distribuições (Stojkovic *et al.*, 2001; Voronina & Wessel, 2003; Nishi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Katska *et al.*, 2011; Machatkova *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2014) e vão aumentando de número (Ferreira *et al.*, 2009; Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014). Em oócitos na fase de VG, as mitocôndrias encontram-se na zona cortical do citoplasma, enquanto que em oócitos em MI e MII, estas são muito mais numerosas e encontram-se distribuídas por todo o citoplasma (Stojkovic *et al.* 2001; Voronina & Wessel, 2003; Nishi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Katska *et al.*, 2011; Machatkova *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2014).

Na fase inicial da maturação até à dissolução do invólucro nuclear, os oócitos estão ativamente envolvidos no processo de transcrição (como referido anteriormente), acumulando por isso grandes quantidades de mARNs. Estes produtos da transcrição são essenciais não só à maturação em si, mas desempenham também um papel importantíssimo no desenvolvimento embrionário inicial, até ao momento da transição materno-fetal (Cha *et al.*, 1998; Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009). No entanto, a população de mARNs vai sendo distinta ao longo do processo de maturação. Tal como a transcrição, também a síntese proteica não só é indispensável à maturação, como também à formação do zigoto e desenvolvimento embrionário inicial como tal, tem de existir uma quantidade apropriada de ribossomas durante a maturação (Cha *et al.*, 1998; Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009). É sabido que durante a metáfase I a síntese proteica é aproximadamente três vezes superior à existente até à dissolução do invólucro nuclear, e quando é atingida a metáfase II é restabelecida uma taxa basal de síntese proteica. Tal como acontece relativamente às populações de mARNs, as populações de proteínas também são distintas durante a maturação, como resultado da repressão ou degradação de alguns mARNs e ativação de outros. As proteínas ativas durante o processo de maturação são sobretudo proteínas reguladoras do ciclo celular necessárias à conclusão da meiose no oócito (Cha *et al.*, 1998; Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009).

O reticulo endoplasmático é o organelo responsável pelo *fold*ing e degradação de proteínas, metabolismo lipídico, e é também a maior fonte interna de cálcio (Mao *et al.*, 2014) Este organelo é então o responsável pela libertação de cálcio que permite a ativação do oócito após fertilização, esta função é adquirida por este organelo durante a maturação do gâmeta feminino, devido a um conjunto de alterações estruturais e bioquímicas que permitem a regulação do cálcio intracelular (Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009). Durante a maturação, o reticulo endoplasmático sofre alterações estruturais e bioquímicas, como também de distribuição. Em oócitos

imaturos, o retículo endoplasmático possui uma rede tridimensional de túbulos com cisternas individuais e lamelas arredondadas e encontra-se distribuído uniformemente em todo o citoplasma. Em oócitos maduros este passa a ter estruturas arredondadas, encontra-se em regiões corticais e acumula-se em pequenos grupos ao longo do citoplasma (Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014).

O complexo de Golgi tem um papel fundamental em processos relacionados com a movimentação e distribuição intracelular de proteínas, bem como em processos relacionados com a modificação das mesmas. Em oócitos VG de murganho o complexo de Golgi encontra-se disperso pelo citoplasma com a forma de um sistema de membranas contínuas. Aquando da dissolução do invólucro nuclear da vesícula germinal o complexo fragmenta-se e os seus monómeros constituintes distribuem-se ao longo do citoplasma e assim permanecem até depois da extrusão do 1º globo polar (Mao *et al.*, 2014).

Do complexo de Golgi derivam os grânulos corticais cuja composição inclui uma população diversa de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos (Ferreira *et al.*, 2009). Em oócitos imaturos, os grânulos corticais estão distribuídos por pequenos grupos ao longo do citoplasma. Em oócitos maduros, estes organelos encontram-se estrategicamente posicionados na periferia do citoplasma, junto da superfície interna, uma vez que após a fecundação, há a imediata excitose destes grânulos evitando a ocorrência de polispermia (penetração de mais do que um espermatozoide no oócito; Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014).

Os filamentos do citoesqueleto são estruturas dinâmicas e adaptáveis que podem permanecer inalteradas ou podem sofrer modificações de acordo com as necessidades da célula. Além disso, este sistema é responsável pela segregação cromossómica durante a meiose e mitose, pela divisão celular durante a citocinese, e pelo movimento e distribuição de moléculas e organelos (Voronina & Wessel, 2003;

Ferreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014). Os três tipos de filamentos do citoesqueleto são formados por subunidades que são características de cada um. Os filamentos de actina são constituídos por subunidades globulares e compactadas de actina. Os filamentos intermediários são compostos por subunidades polipeptídicas alongadas e fibrosas e a sua função está relacionada principalmente com a resistência mecânica em resposta ao *stress*. Os microtúbulos consistem em subunidades globulares e compactadas de tubulina (Voronina & Wessel, 2003; Ferreira *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2014). Estes últimos estão envolvidos no movimento dos organelos e moléculas. As subunidades dos microtúbulos estão ligadas a proteínas motoras, tais como dineína, dinactina e cinesina, que se ligam às moléculas e às membranas dos organelos permitindo assim o seu movimento. Em fases iniciais do desenvolvimento oocitário os microtúbulos têm uma forma alongada e são instáveis. Durante a maturação, os microtúbulos permitem a formação dos fusos meióticos que, por sua vez, permitem a segregação de cromossomas nas duas divisões meióticas. Em oócitos na fase de VG, os microtúbulos encontram-se distribuídos ao longo do citoplasma. Após a dissolução do invólucro nuclear da vesícula germinal estes concentram-se em volta dos cromossomas. Nas metáfases, estes elementos do citoesqueleto organizam-se e formam os fusos meiótico (Figura 4; Mao *et al.*, 2014).

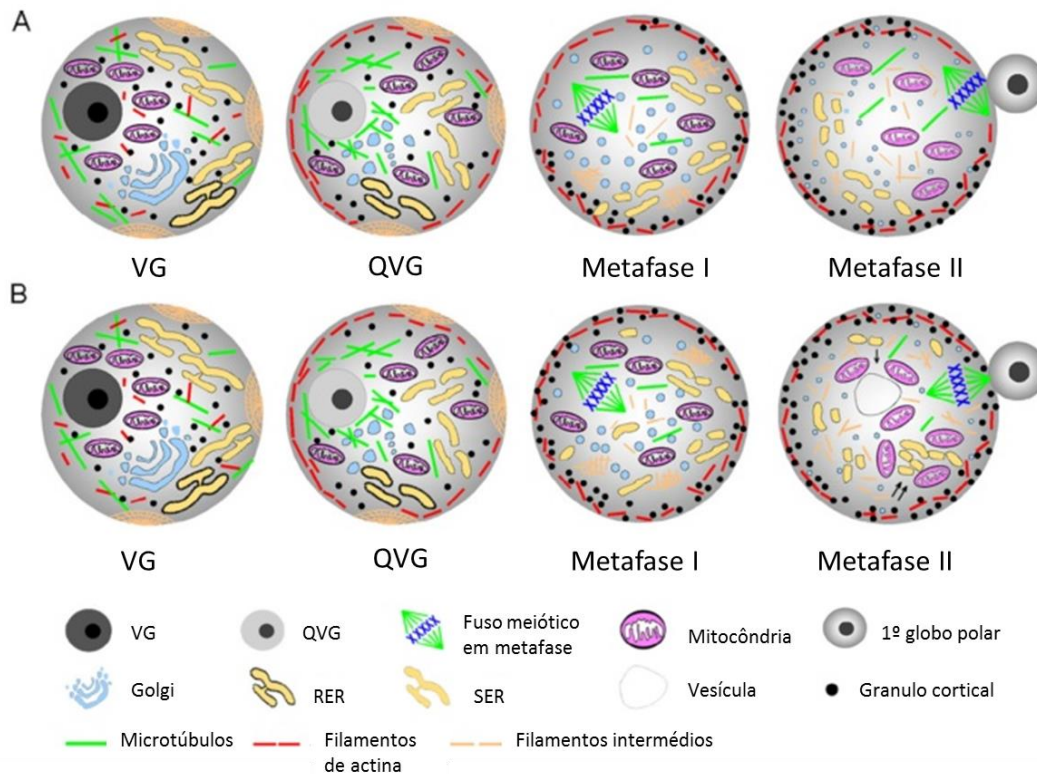


Figura 4: Resumo da distribuição de organelos citoplasmáticos e do citoesqueleto, durante a maturação de oócitos em (A) rato e (B) humano (Adaptado de Mao *et al.*, 2014).

4.1. Maturação *in vitro* de oócitos

A maturação *in vitro* (IVM) é um procedimento laboratorial cujo objetivo é a obtenção de oócitos maduros competentes. A base deste procedimento é o desenvolvimento do oócito do estadiu de vesícula germinal ou metáfase I (MI) até ao estadiu de metáfase II (MII) no qual são fertilizados (Tang-Pedersen *et al.*, 2012; Figura 5). A maturação *in vitro* de oócitos imaturos foi descoberta em 1935 numa experiência em coelhos levada a cabo por Pincus e Enzmann. Desde então tem tido uma elevada importância não só pelo facto de permitir estudar *in vitro* alguns dos aspetos da oogénese, como também na produção animal, mas sobretudo ao nível das técnicas de reprodução humana medicamente assistidas, uma vez que permite gerar oócitos maduros capazes de suportar o desenvolvimento embrionário e pré-

implantação do embrião (Coticchio *et al.*, 2013). Nesta área, a maturação *in vitro* tem sido proposta como alternativa à estimulação ovárica com gonadotrofinas, uma vez que este tipo de tratamento está associado a um elevado risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovárica; sobretudo quando se trata de mulheres com síndrome de ovários poliquísticos, uma vez que estas têm uma elevada predisposição para o desenvolvimento de uma hiperestimulação. Para além destes casos, a IVM é uma opção em utentes que são consideradas más respondedoras, utentes com síndrome dos ovários resistentes às gonadotrofinas, mulheres com endometriose, nos ciclos de doação de oócitos e, por último mas não menos importante, é uma técnica inerente aos processos de criopreservação de oócitos imaturos em situações de preservação da fertilidade em doentes oncológicas (Tounson *et al.*, 2001; Hashimoto, 2009; Bos-Mikich *et al.*, 2011; Walls *et al.*, 2012; Coticchio *et al.*, 2013; Grynberg *et al.*, 2013).

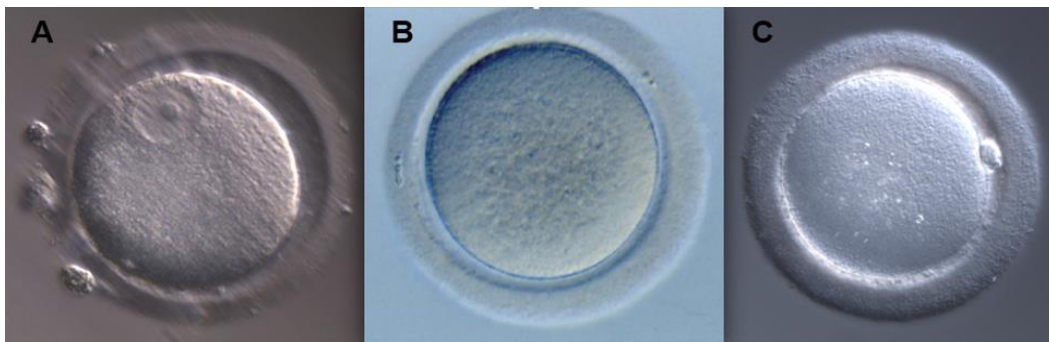


Figura 5: Oócitos Humanos observados por microscopia de contraste de fase após punção e desnudação. A) Oócito VG, B) Oócito MI, C) Oócito MII (Imagens cedidas pelo Serviço de Reprodução Humana do CHUC).

Como mencionado anteriormente, o processo de maturação envolve alterações cromossómicas, redistribuição de organelos, alterações do citoesqueleto, síntese e armazenamento de mARNs e proteínas e ainda interação física e bioquímica entre o oócito e as células do *cumulus oophorus*. Como tal, a maturação *in vitro* tem de mimetizar um ambiente o mais semelhante possível ao ambiente a que os oócitos estão sujeitos *in vivo*, com o objetivo de permitir que este conjunto de fenómenos

ocorra de forma precisa, regulada e coordenada permitindo assim obter oócitos competentes (Hardy *et al.*, 2000; Coticchio *et al.*, 2013). Existem dois intervenientes essenciais para o sucesso da IVM, sendo as células do *cumulus oophorus* um desses elementos. O *cumulus oophorus* totalmente expandido e desenvolvido desempenha funções na maturação do oócito; no transporte do mesmo, ao longo da trompa de falópio; após ovulação, e no processo de fecundação. Estas células estabelecem uma comunicação bidirecional com o oócito mediada por junções tipo gap. Esta comunicação é considerada a chave para a maturação do gâmeta feminino, uma vez que é ela que mantém o bloqueio meiótico; que, na devida altura, induz o reinício da meiose e a conclusão da divisão meiótica e, é também esta comunicação que permite a maturação citoplasmática do oócito (Hardy *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013). Para além disso, permite ainda o transporte de pequenas moléculas, essenciais ao oócito, nomeadamente alguns aminoácidos, colesterol e moléculas sinalizadoras (Hardy *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013). Apesar de toda a importância das células do *cumulus oophorus* ao nível da maturação oocitária, existem vários investigadores que conseguem, e com taxas bastante satisfatórias, a obtenção, *in vitro*, de oócitos em metáfase II, partindo de oócitos VG ou MI desnudados, ou seja, oócitos cujas células *cumulus oophorus* foram removidas (tópico desenvolvido mais à frente; Baka *et al.*, 1995; Boiso *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2009; Versieren *et al.*, 2011; Fasano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Contudo, existem estudos realizados em ratos que demonstram que a manutenção do contacto oócito-células do *cumulus oophorus* permite não só uma melhor qualidade oocitária, como também, está envolvida na organização espacial e funcional do fuso meiótico (Barrett & Albertini, 2010). Como tal, apesar de poder ser conseguida a maturação de oócitos na ausência das células do *cumulus oophorus*, a ausência destas poderá ter repercussões a nível estrutural nos oócitos que poderão inviabilizar uma possível fecundação ou que terão consequências mais ou menos graves após a

ocorrência da mesma. Para além das células do *cumulus oophorus*, o outro interveniente fundamental neste processo é o próprio sistema de maturação *in vitro*, e por isso, o maior desafio deste procedimento tem sido encontrar um sistema ideal que permita atingir o objetivo final, a obtenção de oócitos competentes. Por norma, um sistema de maturação *in vitro* é composto por um meio de cultura de células, sendo que o mais comumente utilizado é o TCM199. Este meio contém um conjunto de aminoácidos considerados essenciais e é suplementado com hormonas gonadotróficas (FSH e LH). A FSH tem como função estimular o desenvolvimento folicular e induzir o reinício da meiose, enquanto que a LH é a hormona responsável pela indução da ovulação *in vivo* e, portanto é a hormona que induz a maturação (Hardy *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013). É importante referir que os oócitos não têm recetores de LH, pelo menos de acordo com o conhecimento atual (Tanghe *et al.*, 2002). O que vem atestar mais uma vez a importância das células do cumulus, pois são elas que expressam os recetores desta hormona e que facultam aos oócitos a sinalização necessária à indução da sua maturação (Tanghe *et al.*, 2002). Alguns protocolos substituem a LH pela hCG, sendo que a segunda mimetiza os efeitos da primeira. Para além das hormonas gonadotróficas, o meio é normalmente suplementado com um soro que fornece um conjunto de proteínas das quais o gâmeta feminino necessita mas não tem a capacidade de sintetizar (Hardy *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013), fatores de crescimento e sais inorgânicos que mantêm a osmolaridade e pH (Christopikou *et al.*, 2010). Por vezes os meios também são suplementados com substratos energéticos (piruvato, lactato, glucose). O piruvato pode induzir diretamente a maturação nuclear de oócitos sem células do *cumulus oophorus*, enquanto que a glucose tem de ser metabolizada pelas células do *cumulus oophorus* em resposta ao estímulo da LH para depois poder ser usada pelo oócito (Christopikou *et al.*, 2010).

A IVM de oócitos imaturos humanos tem sido cada vez mais aceite, desde o

primeiro relato de gravidez bem sucedida após este procedimento em 1994. Desde então vários aperfeiçoamentos foram feitos no protocolo de IVM e atualmente já nasceram mais de 1000 bebês a partir de oócitos maturados *in vitro* em todo o mundo (Hashimoto, 2009; Wiser *et al.*, 2011).

É frequente a ideia de que após maturação *in vitro* apenas a injeção intracitoplasmática de um espermatozóide garante a fertilização dos oócitos. Contudo, Walls e seus colaboradores realizaram um estudo cujos resultados mostraram não existirem diferenças significativas nas taxas de fertilização e na qualidade dos blastocistos após ICSI ou fertilização *in vitro*, mostrando que a FIV pode também ser uma técnica viável na fertilização de oócitos após IVM (Walls *et al.*, 2012).

5. CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação tem como objetivo prolongar a viabilidade das células através da interrupção das suas reações metabólicas, utilizando temperaturas extremamente baixas (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010). A temperatura geralmente usada é de -196°C , correspondente à temperatura do azoto líquido (Jain & Paulson, 2006). Embora esta técnica permita a conservação das células num estado viável por longos períodos de tempo, a diminuição e consequente subida de temperatura durante o arrefecimento e aquecimento, resultam frequentemente em crio-danos e morte celular (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010). Os principais danos ocorrem entre os $+15^{\circ}\text{C}$ e os -5°C devido aos danos provocados pelo frio, entre -5°C e os -80°C devido à formação de cristais de gelo e à solidificação do fluido intracelular que ocorre entre os -50°C e -150°C (Ata *et al.*, 2010).

É preciso considerar que a capacidade de sobrevivência do material biológico durante o processo de criopreservação depende do tamanho do material biológico a criopreservar, a sua razão superfície/volume e o teor de água. Estes fatores são determinantes na sobrevivência à criopreservação (Ata *et al.*, 2010).

5.1. Os crio-danos e o papel dos agentes crioprotetores

As técnicas de criopreservação podem provocar danos ao nível do ADN (Ácido desoxirribonucleico), mas também ao nível estrutural e funcional, por exemplo nos microtúbulos. Uma criopreservação de sucesso visa eliminar estes três problemas, e para isso as estratégias de criopreservação têm-se munido da utilização de produtos químicos chamados agentes crioprotetores (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010).

Os agentes crioprotetores (CPAs) têm a função de proteger a célula ou o tecido contra a desidratação, o arrefecimento e os danos causados pela redução extrema da temperatura. De um modo geral, esses agentes podem ser divididos em dois grupos principais: intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014).

Os crioprotetores intracelulares ou penetrantes são constituídos por pequenas moléculas que facilmente penetram as membranas celulares e formam ligações de hidrogénio com moléculas de água intracelulares, evitando a formação de gelo (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010; Figura 6). O propilenoglicol (PROH) é o mais utilizado dos crioprotetores penetrantes e, apesar de ter uma baixa toxicidade, não tem um efeito muito alargado na prevenção da formação de gelo. Outros crioprotetores pertencentes a este grupo têm sido utilizados, nomeadamente o dimetilsulfóxido (DMSO), do etilenoglicol (EG) e do glicerol (G; Santos *et al.*, 2010).

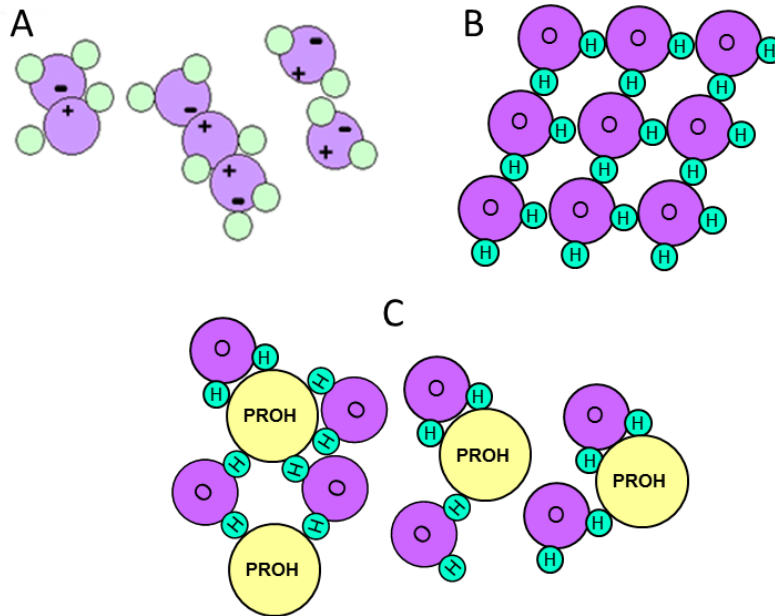


Figura 6: Modo de ação dos crioprotetores intracelulares. O- representação do átomo de oxigénio; H- representação do átomo de hidrogénio; PROH- representação da molécula de propilenoglicol. A) Moléculas de água; B) Estrutura molecular dos cristais de gelo; C) Ligação do crioprotetor intracelular (propilenoglicol) às moléculas de água (Adaptado de Chian: Fertility cryopreservation with oocyte vitrification).

Do grupo dos crioprotetores extracelulares, também conhecidos como não penetrantes, fazem parte moléculas como os hidratos de carbono (sacarose, galactose, trealose, ficoll) e as proteínas. Estas são moléculas de grandes dimensões que não penetram a membrana celular, protegendo as células por intermédio da sua ligação às cabeças polares dos grupos fosfolipídicos da membrana celular (Jain & Paulson, 2006; Santos *et al.*, 2010). Estes CPAs agem reduzindo o choque osmótico, controlando a saída de água da célula e causando desidratação intracelular antes da congelação (Figura 7; Jain & Paulson, 2006). Este grupo de crioprotetores é normalmente usado em combinação com os CPAs penetrantes, de forma a aumentar a eficácia na prevenção da formação de gelo (Jain & Paulson, 2006).

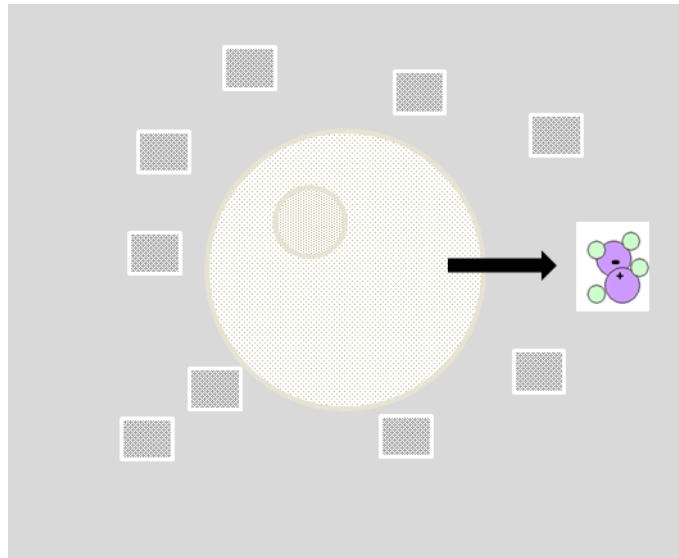


Figura 7: Modo de ação dos crioprotetores extracelulares.

Durante a descongelação a água gerada pela fusão do gelo diminui rapidamente a pressão osmótica extracelular. Nesta altura, o choque osmótico pode ocorrer devido a um fluxo excessivo de água que pode provocar a turgescência da célula ou até mesmo a sua rotura. Por este motivo, os protocolos de descongelação utilizam uma grande concentração de CPAs não permeáveis (Jain & Paulson, 2006).

Apesar de tudo o que foi referido anteriormente é necessário ter em conta que os agentes crioprotetores podem ser tóxicos (Ata *et al.*, 2010). A escolha do tipo e da concentração de um agente crioprotetor que resulte numa baixa toxicidade depende do tipo de célula e tecido a ser criopreservado, bem como da espécie utilizada e do método de criopreservação escolhido (Ata *et al.*, 2010).

5.2. Técnicas de criopreservação

Todo o material biológico sofre danos morfológicos e funcionais consideráveis durante a criopreservação. Contudo a extensão da lesão depende de fatores como o tamanho e a forma das células, a permeabilidade das membranas, e a qualidade e sensibilidade desse mesmo material biológico. Todos esses fatores podem ser altamente variáveis, dependendo da espécie, do estadio de desenvolvimento e da sua

própria origem (por exemplo, se são produzidos *in vivo* ou *in vitro*). Ainda assim, os oócitos e embriões têm uma capacidade surpreendente de reparar danos, total ou parcialmente e, em muitos casos, para continuar o desenvolvimento normal após criopreservação/descongelação. O objetivo das técnicas de criopreservação é minimizar esses danos e ajudar as células a regenerar (Vajta & Kuawayama, 2006).

Atualmente a criopreservação de gâmetas e embriões é realizada por dois métodos: a congelação lenta, também conhecida como convencional, e a vitrificação, ambas com vantagens e desvantagens (Santos *et al.*, 2010).

A comparação entre a congelação lenta e a vitrificação é basicamente a comparação entre um método e um processo físico. Muitas vezes a distinção entre os dois é feita de forma superficial, pelo facto de se afirmar que a diferença reside somente no facto da congelação lenta utilizar uma velocidade de arrefecimento lenta e baixa concentração de CPAs e a vitrificação utilizar uma elevada velocidade de arrefecimento e altas concentrações de CPAs, contudo isto é uma forma muito simplista de abordar a questão (Saragusty & Arav, 2011).

5.2.1. Congelação lenta

Durante a congelação, as células enfrentam inúmeros stresses físicos tais como mudanças na permeabilidade da membrana e volume celular, bem como formação de cristais de gelo (Santos *et al.*, 2010). A congelação lenta pode ser interpretada como uma tentativa de criar um equilíbrio delicado entre vários fatores causadores de danos celulares, incluindo a formação de cristais de gelo, rotura, toxicidade e danos osmóticos. Esta técnica de criopreservação, pelo facto de fazer diminuir gradualmente a temperatura (-0,3°C/min a -2 °C/min), permite a troca entre os fluidos extracelulares da solução e intracelulares, sem a ocorrência de efeitos osmóticos e deformação celular graves (Vajta & Kuawayama, 2006). A congelação lenta tem a vantagem de utilizar baixas concentrações de CPAs (1-1,5M), o que pode

reduzir a toxicidade química e o choque osmótico, contudo nem sempre é eficiente quanto à eliminação da formação de cristais de gelo (Dinnyes & Nedambale, 2009).

5.2.2. Vitrificação

A vitrificação pode ser definida como o processo de solidificação de uma solução a baixas temperaturas, sem a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Vajta, 2000; Santos *et al.*, 2010). Este processo foi investigado por um físico alemão, de nome Tammann em 1898 (Vajta, 2000). O fenómeno é alcançado pelo aumento da velocidade de congelação e/ou pela incorporação de elevadas concentrações de crioprotetores nas soluções. Outros fatores que facilitam este processo são o aumento da pressão hidrostática e a diminuição do volume da solução de vitrificação, a qual está relacionada com a velocidade de congelação (Vajta, 2000).

Diferente da congelação lenta, a vitrificação caracteriza-se por um rápido arrefecimento da solução e subsequente formação do estado vítreo amorfo, livre de qualquer estrutura cristalina (Santos *et al.*, 2010). O seu protocolo típico requer uma alta concentração de CPAs ($>5,5M$; Dinnyes & Nedambale, 2009).

A vitrificação apresenta portanto uma vantagem bastante considerável em relação à congelação lenta, que é a eliminação parcial, e por vezes total, de um dos crio-danos mais prejudiciais, a formação de cristais de gelo (Vajta, 2000; Vajta & Kuawayama, 2006; Santos *et al.*, 2010). Com o intuito de eliminar os efeitos nefastos provocados pelas elevadas concentrações de crioprotetores, tem sido usada como estratégia diminuir a concentração do CPA sem prejudicar a capacidade crioprotetora, através da combinação de diferentes CPAs em concentrações relativamente baixas. Este procedimento tem como finalidade obter concentrações de solutos totais vitrificáveis, diminuindo a toxicidade específica de cada crioprotetor (Santos *et al.*, 2010).

Para além da concentração do crioprotetor, o aumento da velocidade de

congelamento pode também ser conseguido com uma cuidadosa escolha do protocolo de vitrificação a aplicar (Santos *et al.*, 2010). Para alcançar velocidades de congelamento muito altas o volume da solução de vitrificação pode ser minimizado, utilizando sistemas especialmente concebidos para o efeito. Estes sistemas podem ser divididos em duas categorias, sistemas abertos ou sistemas fechados. Cada um destes grupos tem as suas vantagens. Nos sistemas abertos é mais fácil obter uma taxa de arrefecimento elevada comparativamente com os sistemas fechados. Contudo, em ambos os sistemas, a diminuição do volume a vitrificar permite o aumento da velocidade de arrefecimento, possibilitando a diminuição da concentração de CPAs, de modo a minimizar os seus efeitos tóxicos e osmóticos (Saragusty & Arav, 2011). A vantagem dos sistemas fechados é evitar qualquer tipo de contaminação que possa existir (Saragusty & Arav, 2011).

5.3. Congelamento lento vs. vitrificação

A congelamento lento tem tido um papel significativo na história da criopreservação e o seu impacto presente não deve ser subestimado. No entanto, é possível que num futuro próximo esta técnica venha a ser totalmente substituída pela vitrificação (Vajta & Kuawayama, 2006), uma vez que esta última tem vindo a ser bem sucedida na criopreservação de embriões e oócitos (Dinnyes & Nedambale, 2009).

É preciso ainda sublinhar que vários estudos têm demonstrado que os processos ótimos de criopreservação tendem a ser específicos para cada espécie, em grande parte devido a variações na permeabilidade da membrana plasmática e sensibilidade do material biológico aos crioprotetores e à velocidade de congelamento/aquecimento (Dinnyes & Nedambale, 2009). A tabela abaixo apresentada mostra de forma clara e sucinta as diferenças entre estas duas técnicas (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação entre congelamento lento e vitrificação.

Congelamento Lento	Vitrificação
Velocidade de arrefecimento lenta	Elevada velocidade de arrefecimento
Baixa concentração de CPAs (1-1,5M)	Elevada concentração de CPAs (>5,5M)
Requer equipamento sofisticado	Não requer equipamento sofisticado
Processo moroso (~ 3h)	Processo rápido (~15 min.)
Elevada probabilidade de formação de cristais de gelo	Baixa probabilidade de formação de cristais de gelo
Fácil execução	Tecnicamente mais complexa

5.4. Criopreservação de embriões

No ano de 1984 nasceu a primeira criança proveniente de embriões criopreservados. Desde então, esta técnica tem desempenhado um papel importante nos tratamentos de reprodução assistida, permitindo aos casais mais de uma tentativa de transferência de embriões após um único ciclo de estimulação ovárica. Deste modo, tem sido possível não só melhorar as taxas de gravidez, como também diminuir a exposição a gonadotrofinas, reduzindo assim os custos do tratamento (Saragusty & Arav, 2011).

A congelamento lento tem sido amplamente utilizada na criopreservação de embriões, contudo a vitrificação tem sido a técnica utilizada com mais frequência recentemente. Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de se

perceber qual a técnica que permite obter melhores resultados. Num artigo de revisão recente os autores concluíram que não existem diferenças significativas entre os dois métodos no que se refere às taxas de gravidez, contudo a vitrificação está associada a taxas mais elevadas de sobrevivência após descongelação tanto em embriões de fases mais iniciais, como no estadio de blastocisto (Ata *et al.*, 2010).

5.5. Criopreservação de tecido ovárico

A criopreservação de tecido ovárico humano é um dos procedimentos que permite a preservação da fertilidade em mulheres que necessitem de ser submetidas a tratamentos agressivos, suscetíveis de originar uma menopausa precoce (Huang *et al.*, 2007; Anderson & Wallace, 2011). As amostras de tecido do córtex ovárico podem ser colhidas da utente em qualquer fase do ciclo menstrual. Estas pequenas amostras possuem uma enorme quantidade de folículos primordiais que, por serem pequenos e pouco diferenciados, sem zona pelúcida e sem células da granulosa, apresentam uma maior tolerância à criopreservação e posterior descongelação (Huang *et al.*, 2007; Anderson & Wallace, 2011). É ainda prematuro avaliar os verdadeiros benefícios deste procedimento, uma vez que, até ao momento, se encontram documentados na literatura apenas 26 recém nascidos após transplante de tecido ovárico criopreservado (Donnez *et al.*, 2013).

5.6. Criopreservação de oócitos

O oócito é muito diferente do espermatozoide no que respeita à sua tolerância à criopreservação (Anderson & Wallace, 2011; Saragusty & Arav, 2011). Comparando as medidas de grandeza dos gâmetas humanos podemos verificar que o oócito tem, em média, um diâmetro de 120 μm , um volume de $9,05 \times 10^5 \mu\text{m}^3$, e uma área de superfície de $4,5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, ao passo que o espermatozoide tem 28 μm^3 de volume e uma área de superfície de $120 \mu\text{m}^2$. Assim, a razão superfície/volume no espermatozoide é de 4,3, enquanto que no oócito é apenas de 0,05 (Leibo *et al.*,

2002), o que o torna muito sensível ao frio e altamente suscetível à formação de cristais de gelo intracelulares (Lee *et al.*, 2014). Para além das dimensões, a membrana plasmática de oócitos em diferentes fases meióticas tem diferentes coeficientes de permeabilidade, e muitas vezes estas alterações de permeabilidade tornam o movimento de crioprotetores e água mais lento (Anderson & Wallace, 2011). Por outro lado, os oócitos estão rodeados pela zona pelúcida que atua como uma barreira adicional ao movimento da água e CPAs para dentro e fora da célula, possuem um alto teor de lípidos citoplasmáticos, o que aumenta a sua sensibilidade à criopreservação e, possuem também menos microfilamentos de actina submembranares, o que torna a sua membrana menos robusta (Saragusty & Arav, 2011). Como resultado do processo de congelação/descongelação, pode ocorrer a exocitose prematura de grânulos corticais, responsáveis pelo bloqueio à polispermia, conduzindo ao endurecimento da zona pelúcida tornando a penetração do espermatozoide e fertilização difíceis. Contudo, este entrave pode ser ultrapassado com o uso da técnica de ICSI (Saragusty & Arav, 2011).

A criopreservação pode causar desorganização ao nível do citoesqueleto e dos cromossomas, e pode originar anomalias ao nível do ADN, como referido anteriormente. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de comparar a incidência deste tipo de anomalias entre oócitos frescos e oócitos vitrificados ou criopreservados por congelação lenta. Por exemplo, um estudo de 2009 publicado por Cao e um grupo de investigadores, mostra não existir diferenças significativas ao nível da integridade do fuso acromático e alinhamento dos cromossomas, entre oócitos não criopreservados comparativamente a oócitos criopreservados por congelação lenta ou vitrificação (Cao *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços na área da criopreservação e especificamente na criopreservação de oócitos (maduros ou imaturos), só recentemente a sua criopreservação passou a ser considerada um procedimento estabelecido (Tomasi-

Cont *et al.*, 2014). Apesar das dificuldades da aplicação da criopreservação aos gametas femininos, até 2007 tinham sido relatados 200 nascimentos resultantes de oócitos criopreservados. Este número subiu para 500 em 2009 (Saragusty & Arav, 2011).

5.6.1. Criopreservação de oócitos: Congelação lenta vs. Vitrificação

Quando é feita a comparação entre a congelação lenta e a vitrificação de oócitos, as taxas de sobrevivência variam entre 91,8% e 95% para oócitos vitrificados e entre 61% e 75% para oócitos criopreservados por congelação lenta (Cao *et al.*, 2009 Ata *et al.*, 2010). Os resultados publicados por Cao e colaboradores em 2009 mostraram haver uma tendência para a existência de menores danos em oócitos vitrificados comparativamente a oócitos criopreservados por congelação lenta. Mostraram ainda não existir diferenças significativas nas taxas de fertilização, contudo as taxas de clivagem foram inferiores nos oócitos após congelação lenta. De acordo com Cobo & Diaz (2011) um total de 5 estudos com uma amostragem considerável de oócitos mostrou que as taxas de fertilização, clivagem e obtenção de embriões de dia 3 (de boa qualidade) foram superiores em oócitos vitrificados, comparativamente aos criopreservados por congelação lenta. Ainda nestes estudos, verificou-se não haver diferenças significativas nas taxas de fertilização, clivagem, obtenção de embriões de boa qualidade e gravidez entre oócitos vitrificados e oócitos não criopreservados (Cobo & Diaz, 2011).

5.6.2. Criopreservação de oócitos maduros vs. imaturos

Um oócito no estadio de vesícula germinal possui cromossomas que não estão totalmente condensados e que se encontram rodeados pela membrana nuclear (Cao *et al.*, 2009). Por outro lado os seus microtúbulos encontram-se dispersos pelo citoplasma e portanto não possui qualquer fuso meiótico (Combelle & Chateau, 2012; Mohsenzadeh *et al.*, 2012). Estas tornariam os oócitos nesta fase menos propensos a

danos causados pelo frio. Contudo, ao contrário do que se pensava inicialmente, os oócitos nesta fase possuem outras características que os tornam suscetíveis aos criodanos. A ausência de acetilação dos microtúbulos torna-os mais instáveis do que se pensava, visto que a acetilação dos microtúbulos está associada a uma maior estabilidade dos mesmos (Combelles *et al.*, 2002; Combelles & Chateau, 2012). Para além disso, nesta fase ainda não se iniciou a maturação citoplasmática, e portanto ainda não houve redistribuição nem alteração estrutural dos organelos (Lee *et al.*, 2014). Neste sentido, os danos provocados pela criopreservação nesta fase podem pôr em causa esta mesma maturação, uma vez que os fatores que controlam estes processos são sensíveis à criopreservação (Combelles & Chateau, 2012; Wang *et al.*, 2012). Relativamente à criopreservação de oócito em metáfase I, os resultados publicados até ao momento mostram que, quando os oócitos são obtidos nesta fase os resultados em termos de sobrevivência à criopreservação são superiores quando comparados com a criopreservação na fase de vesícula germinal (Versieren *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Combelles and Chateau, 2012; Fasano *et al.*, 2012). Quando se fala em oócitos em metáfase II, à partida pensa-se que estes são os mais sensíveis ao processo de criopreservação, uma vez que têm dimensões superiores aos acima referidos, devido à presença do fuso meiótico, estrutura extremamente sensível às diferenças de temperatura e ainda devido ao baixo coeficiente de permeabilidade da membrana plasmática (Ata *et al.*, 2010; Anderson & Wallace, 2011; Wang *et al.*, 2012). Contudo, os resultados clínicos de criopreservação de oócitos imaturos por congelação lenta ou vitrificação ficaram aquém dos resultados obtidos com oócitos maduros (Ata *et al.*, 2010; Anderson & Wallace, 2011).

A tabela abaixo apresentada (Tabela 2) compila a informação de oito estudos com elevado impacto nesta temática. O que se pode concluir após análise dos mesmos é que, até ao momento, parece ser mais benéfico, a criopreservação de

oócitos MII após maturação *in vitro*, em vez de oócitos VG seguidos de maturação *in vitro* (Combelles & Chateau, 2012). Contudo, esta não será certamente uma resposta definitiva à questão “o que é melhor: vitrificar antes ou após maturação *in vitro*?”, uma vez que existe uma variabilidade entre estudos, no que respeita à fonte de oócitos, tipos de infertilidade, sistemas de criopreservação e maturação *in vitro*; variáveis essas que devem ser tidas em conta (Combelles & Chateau, 2012)

Tabela 2: Comparação da criopreservação de oócitos na fase VG e MII (pós-IVM) (Adaptado de Combelles & Chateau, 2012).

Autores	Fonte de oócitos	Oócitos da mesma uterina (sibling design)	Método de Criopreservação	% Sobrevivência	Maturação com células do cumulus	% Maturação	Fusos normais (n)	Cromossomas Normais (n)	% Fertilização/ Ativação	% Clivagem
Baka <i>et al.</i> , 1995	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=188)	Não	Congelação lenta	VG:63 MII:58	Não	Pós crió: 43	Pós crió: 35 Pré crió: 22 Sem crió: 84	Pós crió: 36 MII: 26 Sem crió: 87		
Chung <i>et al.</i> , 2000	Sem estimulação Cirurgias (n=46)	Não	Vitrificação	VG:63 MII:56	Sim	Pós crió: 40 Pré crió: 70			Pós crió: 23 Pré crió: 22	Pós crió: 22 Pré crió: 23
	Ciclos de estimulação (n=43)			VG:65 MII:100		Pós crió: 53 Pré crió: 71			Pós crió: 35 Pré crió: 59	Pós crió: 29 Pré crió: 59
Goud <i>et al.</i> , 2000	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=189)	Não	Vitrificação	VG:48 MII:84	Parcialmente	Pós crió: 30 Pré crió: 73 Sem crió: 70			Pós crió:17 Pré crió: 29 Sem crió: 50	Pós crió: 16 Pré crió: 26 Sem crió: 41
Boiso <i>et al.</i> , 2002	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=237)	Não	Congelação lenta	VG:73 MII:56	Não	Pós crió: 53 Pré crió: 73	Pós crió: 5 Pré crió:16 Sem crió:72	Pós crió: 5 Pré crió: 19 Sem crió: 82		
Cao <i>et al.</i> , 2009	Ciclos de estimulação IVM (n=472)	Não	Vitrificação	VG:85 MII:86	Misto	Pós crió: 43 Pré crió: 85			Pós crió: 27 Pré crió: 51 Sem crió: 66	Pós crió: 19 Pré crió: 34 Sem crió: 58
Versieren <i>et al.</i> , 2011	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=330)	Não	Congelação lenta	VG:76 MII:72	Não	Pós crió: 56 Pré crió: 72			^ Pós crió: 80 Pré crió: 75 Sem crió: 82	^ Pós crió: 88 Pré crió: 76 Sem crió: 93
Fasano <i>et al.</i> , 2012	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=184)	Sim	Vitrificação	VG:81 MII:87	Não	Pós crió: 0 Pré crió: 29			# Pós crió: 0 Pré crió: 21	# Pós crió: 0 Pré crió: 11
Wang <i>et al.</i> , 2012	Ciclos de estimulação Falha na maturação (n=216)	Sim	Congelação lenta	VG:70 MII:71	Não	Pós crió: 36 Pré crió: 76 Sem crió: 75	* Pós crió:1 Pré crió:6 Sem crió :40	* Pós crió: 0 Pré crió: 5 Sem crió:13		

VG e MII correspondem à criopreservação nas respectivas fases de VG e MII (pós-IVM), "Sem crió" representa o grupo onde não houve criopreservação. "Pós crió" representa o grupo de oócitos onde se realizou a maturação *in vitro* de VG após a criopreservação. "Pré crió" representa o grupo de oócitos onde se realizou a maturação *in vitro* de VG ou MI antes da criopreservação. * A análise do fuso e dos cromossomas refere apenas os oócitos classificados como perfeitamente normais, nestes grupos os resultados correspondem ao número total de oócitos analisados. ^ A ativação da partenogénese foi usada em vez da fertilização com espermatozoides. # As taxas de fertilização e clivagem aparecem como zero uma vez que os oócitos não maturaram.

6. PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

As doenças oncológicas são, depois das doenças cardiovasculares, a segunda principal causa de morte em Portugal (Portal da saúde, 2012). De acordo com o registo oncológico de 2010, estima-se que foram diagnosticados tumores malignos a aproximadamente 8653 mulheres, só nesse ano em Portugal (Oncol, 2010). Os avanços ao nível da prevenção, deteção precoce e tratamento, permitem a estas mulheres viver por longos períodos de tempo, e assim, questões como a qualidade de vida e a preservação da fertilidade, tornaram-se cada vez mais importantes para as sobreviventes em idade reprodutiva (Noyes *et al.*, 2010). Para além das doentes oncológicas, todas as mulheres que são expostas a agentes gonadotóxicos para o tratamento de doenças não-oncológicas, como lúpus eritematoso sistémico, aquelas que são submetidas a cirurgia para endometriose, e mulheres com síndromes genéticas, como síndrome de Turner e pré-mutação do X frágil, enfrentam risco de menopausa precoce, contribuindo ainda mais para a população de mulheres que necessitam de procedimentos de preservação da fertilidade (Ata *et al.*, 2010).

Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento considerável da atividade clínica no campo de preservação da fertilidade em mulheres, isto porque, apesar da preservação da fertilidade para os homens, através da criopreservação de espermatozoides estar disponível há muitos anos, não existe, até à data, nenhuma técnica análoga, não invasiva, disponível para as mulheres (Anderson & Wallace, 2011). As técnicas atualmente disponíveis podem dividir-se em dois grupos. Um primeiro grupo que se baseia na minimização do dano a nível reprodutivo; e um segundo que diz respeito à preservação do material celular propriamente dito. Do primeiro fazem parte estratégias como a seleção de protocolos com menor gonadotoxicidade; utilização de hormonas agonistas da GnRH com o intuito de aumentar a resistência das células gonadais; e ainda estratégias de cirurgia

conservadora, que se baseiam na transposição dos ovários para zonas distantes da zona a ser irradiada, nos casos de tratamento por radioterapia (Combelles & Chateau, 2012). O segundo grupo abrange estratégias invasivas e que muitas vezes exigem uma estimulação hormonal, o que pode não ser indicado em alguns casos (Anderson & Wallace, 2011; Combelles & Chateau, 2012). Até 2013 o único método totalmente estabelecido para a preservação da fertilidade nestas mulheres era a criopreservação de embriões (Ata *et al.*, 2010; Tomasi-Cont *et al.*, 2014). Apesar da criopreservação de embriões ser considerado um método totalmente estabelecido para a preservação da fertilidade, existem alguns aspetos a ter em conta quando se recorre a esta opção. No caso de se tratar de mulheres com doenças oncológicas é preciso ter em conta que, dependendo do momento da primeira consulta, poderá haver um atraso de 2 a 5 semanas no tratamento da doença pela necessidade de realizar uma estimulação ovárica, requerida para a fertilização *in vitro* e haverá exposição a níveis de estrogénios supra fisiológicos. É necessário considerar também que certos tipos de cancro, como alguns tipos de cancro da mama, ovário e endométrio, ou seja, cancros estrogénio-dependentes, podem invalidar a possibilidade da realização de uma estimulação clássica sob risco de induzir a proliferação das células cancerígenas. Nesses casos pode ser realizada uma estimulação com utilização conjunta de inibidores de aromatase (enzima envolvida na síntese de estrogénios). As outras implicações são a exigência de um parceiro masculino ou vontade de usar esperma de um dador para a produção de embriões; a idade das utentes (não é aplicável a raparigas pré púberes); os direitos legais sobre os embriões em caso de separação e todas as questões éticas, morais e religiosas que esta técnica envolve (Ata *et al.*, 2010; Combelles & Chateau, 2012). Quanto à criopreservação de tecido ovárico, esta opção tem a vantagem de não necessitar de qualquer estimulação ovárica, nem implicar o atraso consequente no início da terapêutica antineoplásica no caso de utentes com doenças oncológicas. Para além disso, pode ser aplicada a mulheres das

mais diversas idades (adultas e adolescentes, pré-púberes); não implica a existência de um parceiro; permite a obtenção de um elevado número de oócitos e evita numerosos problemas éticos e morais que existem quando se fala de criopreservação de embriões. Contudo, dois fatores limitantes deste procedimento são o facto de implicar a realização de uma pequena cirurgia (laparoscopia) e de comportar o risco de recorrência da doença devido à presença de células neoplásicas no tecido, no caso de utentes com doenças oncológicas (Anderson & Wallace, 2011; Combelles & Chateau, 2012; Fasano *et al.*, 2012). A criopreservação de oócitos é permite assegurar a autonomia reprodutiva de uma utente, ao contrário do que acontece com a criopreservação de embriões. Para além disso, na impossibilidade (por falta de tempo ou por contra indicação), de se realizar uma estimulação ovárica, possibilita a obtenção de oócitos imaturos que podem ser posteriormente *maturados in vitro* (Combelles & Chateau, 2012). Todos estes procedimentos têm vantagens e desvantagens e relevância para diferentes situações clínicas e sociais (Tabela 3; Anderson & Wallace, 2011; Combelles & Chateau, 2012). Por isso é fundamental que médicos de cuidados primários e oncologistas sejam informados sobre as opções de preservação de fertilidade para prevenir perdas de tempo valioso e permitir o encaminhamento para um centro de reprodução medicamente assistida que ofereça toda a gama de opções de preservação de fertilidade existentes (Ata *et al.*, 2010).

Tabela 3: Vantagens e desvantagens das diferentes opções de preservação da fertilidade feminina (Adaptado de Combelles & Chateau, 2012).

Opções de criopreservação dos gametas femininos	Vantagens	Desvantagens
Embriões	Elevadas taxas de gravidez	Estimulação ovárica Necessidade de um parceiro Idade pubertal
Tecido ovárico	Sem necessidade de estimulação ovárica Aplicável em todas as idades Elevado número de oócitos imaturos Não requer a existência de um parceiro	Risco de conter células neoplásicas Baixas taxas de gravidez Invasivo (cirurgia)
Oócitos maduros	Não requer a realização de MIV Não requer um parceiro	Estimulação ovárica Baixas taxas de gravidez Danos celulares
Oócitos imaturos	Sem necessidade de estimulação ovárica Aplicável em todas as idades Não requer a existência de um parceiro	Baixo sucesso Requer a realização de MIV

7. OBJETIVO

A maturação *in vitro* e vitrificação de oócitos são técnicas que têm mostrado grande importância não só a nível das técnicas de reprodução medicamente assistida propriamente ditas, mas também como uma possível opção na preservação da fertilidade feminina. A manutenção da integridade estrutural de um oócito, após aplicação destas técnicas, é essencial para que este gâmeta seja viável e competente.

O objectivo deste trabalho é perceber se é mais ou menos benéfico em termos de integridade estrutural (presença de um fuso meiótico normal e correto alinhamento dos cromossomas), realizar a maturação *in vitro* dos oócitos imaturos pré ou pós vitrificação. A finalidade deste trabalho será contribuir para a optimização das taxas de sucesso da aplicação das duas técnicas em simultâneo, dando um contributo para que estas sejam uma real opção na preservação da fertilidade em mulheres.

II

I INTRODUÇÃO

II MATERIAL E MÉTODOS

III RESULTADOS

IV DISCUSSÃO

V CONCLUSÕES

VI BIBLIOGRAFIA

1. DESENHO EXPERIMENTAL

Após obtenção por punção folicular, desnudação (processo de separação das células do *cumulus* do oócito) e classificação dos oócitos imaturos, estes foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos:

- Grupo 1: Oócitos colocados a maturar *in vitro* após punção folicular (n=109). Deste grupo de oócitos maturados “a fresco”, numa parte deles foi analisada a maturação, a integridade do fuso meiótico e dos cromossomas (n= 14); enquanto que os restantes foram vitrificados/desvitrificados, e por fim, nestes oócitos foi também a maturação, a integridade do fuso meiótico e dos cromossomas (n= 6)
- Grupo 2: Oócitos vitrificados/desvitrificados após punção folicular (n=68). Após desvitrificação os oócitos foram colocados a maturar *in vitro*, e destes os que chegaram à fase de metáfase II foram marcados para análise da integridade do fuso meiótico e dos cromossomas (n=3).



2. MATERIAL BIOLÓGICO

Os oócitos imaturos (VG e MI), que não sofreram maturação *in vivo*, foram obtidos no Serviço de Reprodução Humana dos Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), EPE de mulheres sujeitas a ciclos de estimulação hormonal necessários à realização das técnicas de reprodução medicamente assistida.

Todos os oócitos utilizados neste estudo foram obtidos de acordo com as normas de ética do CHUC e com o consentimento informado dos utentes.

3. OBTENÇÃO DOS GÂMETAS

Os oócitos foram recolhidos por punção folicular ecoguiada e desnudados, num primeiro momento, por ação química da hialuronidase (SynVidro® Hyadase, Origio, Måløv, Dinamarca) e num segundo momento, por ação mecânica com pipeta de desnudação (Flexipet® adjustable handle set; COOK, EUA). Os gâmetas foram mantidos em caixas de Petri (Falcon®, Becton Dickinson Labware, EUA) com meio de cultura (IVF™ culture medium, Origio) a 37°C com uma atmosfera de 6% de CO₂ até à aplicação das técnicas laboratoriais.

4. TÉCNICAS LABORATORIAIS

Os oócitos de cada mulher foram processados individualmente ou em grupo consoante a sua fase meiótica.

4.1. Maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* é um procedimento laboratorial cujo objetivo é a obtenção de oócitos maduros competentes a partir de oócitos imaturos.

O procedimento de maturação *in vitro* foi adaptado de acordo com as recomendações do fornecedor (MediCult IVM® system, Origio), 300 µL dos meios “LAG” e “IVM” foram colocados em tubos de 1,5 mL (Microcentrifuge tube, BIOplastics BV, Holanda) a estabilizar 12h, em estufa a 37°C com uma atmosfera de 6% de CO₂

antes do início do procedimento.

Os oócitos imaturos foram colocados numa caixa de Petri de 4 poços (Nunclon™ surface, Nunc™, Denmark) com meio “LAG” durante 2h em estufa a 6 % de CO₂, 37°C. Em seguida os gâmetas foram transferidos para outro poço com meio “IVM” suplementado com 33.3 µL de soro humano de mulheres sob estimulação hormonal (obtido e processado no Serviço de Reprodução Humana do CHUC), 0.22 µL hCG (Pregnyl® 5000IU human chorionic gonadotropin, Organon, Holanda) e 0.3 µL FSH (Puregon® 600IU solution for injection follitropin beta, Organon). O poço com meio “IVM” foi coberto com óleo mineral (Mineral oil, Sigma- ALdrich). Os oócitos foram colocados em estufa a 37°C com uma atmosfera de 6% de CO₂, durante 30h. Findas as 30h os oócitos foram transferidos para caixas de Petri (Falcon®, Becton Dickinson Labware) com gotas de meio de cultura (ISM1™ culture medium, Origio) e foram observados ao microscópio invertido de contraste de fase (Leica AM6000, Leica microsystems, Alemanha).

4.2. Vitrificação

O procedimento de vitrificação foi adaptado de acordo com as recomendações do fornecedor (MediCult vitrification cooling, Origio). Antes do início do procedimento as soluções foram colocadas a estabilizar à temperatura ambiente durante 30 min.

Numa caixa de Petri (Falcon®, Becton Dickinson Labware) foi feita uma gota de meio “equilibration” e outra de meio “vitrification”, cada gota com aproximadamente 50 µL de meio. Os oócitos foram transferidos um a um para a primeira gota, onde permaneceram durante um máximo de 15 min., foram depois transferidos para a segunda gota onde permaneceram no máximo 1 min., Finalmente, foram colocados na palheta de vitrificação, devidamente identificada, (Cryopettes®, Origio) e armazenados em azoto líquido.

4.3. Desvitrificação

O procedimento de desvitrificação foi adaptado de acordo com as recomendações do fornecedor (MediCult vitrification warming, Origio). Antes do início do procedimento as soluções foram colocadas a estabilizar à temperatura ambiente durante 30 min..

Numa caixa de poço central (BD Falcon™, Becton Dickinson Labware) foi colocado 1 mL de meio “warming”, e esta foi colocada na estufa (a 37°C com uma atmosfera de 6% de CO₂ durante 30 min. Numa caixa de 4 poços (Nunclon™ surface, Nunc™) foram colocados 300 µL de meio “dilution 1”, “dilution 2” nos dois primeiros poços, respetivamente, e “washing” nos dois últimos poços. Após a abertura da palheta de vitrificação (de acordo com as recomendações do fornecedor) os oócitos foram transferidos para a caixa de poço central onde permaneceram 3 min.. Com o auxílio da pipeta de desnudação, os oócitos foram transferidos para o primeiro poço da caixa de 4 poços onde permaneceram 3 min. Repetiu-se o procedimento para os restantes poços. Finalmente, os oócitos foram transferidos para uma placa de Petri (Falcon®, Becton Dickinson Labware) com gotas de meio “ISM1” (ISM1™ culture medium, Origio) cobertas por óleo mineral (Mineral oil, Sigma- Aldrich).

4.4. Imunocitoquímica e microscopia de epifluorescência

O princípio da técnica de imunocitoquímica baseia-se na utilização de anticorpos específicos, que neste caso funcionam como antígenos, com a finalidade de localizar determinadas proteínas numa determinada célula.

O protocolo de imunocitoquímica utilizado foi adaptado a partir do protocolo descrito por Ramalho Santos *et al.* (2004). O procedimento foi totalmente realizado em placas de quatro poços (Nunclon™ surface, Nunc™).

O primeiro passo da técnica consistiu em colocar os oócitos em ácido *tyrode* (Tyrode's solution acidic, Sigma-Aldrich), durante 5 min., à temperatura ambiente, de forma a ocorrer a dissolução da zona pelúcida. Em seguida procedeu-se à fixação das células

com 2% (v/v) de formaldeído em mPBS¹ (PBS tablets, Gibco, Invitrogen Corporation, Inglaterra; pH=7,2) durante 60 min., à temperatura ambiente. Seguiu-se a permeabilização com PBS com 1% (v/v) Triton X-100 (Triton x-100, Sigma-Aldrich) durante 20 min., à temperatura ambiente. E, finalmente o bloqueio com PBS com 100 mM de glicina (Glycine, Sigma-Aldrich) e 1mg/mL de albumina sérica bovina (Albumin from bovine sérum, Sigma-Aldrich), durante 30 min., à temperatura ambiente. Seguidamente, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário para α -tubulina, numa diluição de 1:200 (Monoclonal anti- α -tubulin antibody produced mouse, Sigma-Aldrich), durante 60 min., em estufa a 37°C, seguindo-se uma lavagem em PBS com 0,1% (v/v) Triton X-100 durante 30 min. Depois foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti mouse IgG verde e vermelho (anti mouse IgG green and red, Molecular Probes, EUA) numa diluição de 1:200, durante 60 min., em estufa a 37°C no escuro. Após nova lavagem, em PBS com 0,1% (v/v) Triton X-100 durante 30 min., no escuro, procedeu-se à montagem das lâminas, nas quais foi colocado 1 μ L de VectaShield com 4,6-diamino2-phenylindole (DAPI; Vetor Labs, Burlingame, Califórnia) sobre o qual foram colocados 2,5 μ L de meio com o oócito. Finalmente, selaram-se as lâminas com verniz e estas foram observadas por microscopia de epifluorescência no microscópio Zeiss (Axioplan 2 Imaging fluorescence, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) e avaliadas a integridade do fuso meiótico e cromossomas.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através da utilização do software SPSS para Windows (versão 20, Chicago, EUA). Verificou-se se os dados tinham uma distribuição normal através do teste “Kolmogorov-Smirnov”. Após se verificar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste “Chi-Square” para analisar a relação entre as percentagens de oócitos imaturos maturados *in vitro* “a fresco” e pós vitrificação; as percentagens de oócitos imaturos fecundados após maturação *in vitro* e as

¹mPBS- PBS com: 1090mg/L glucose (α -D-glucose anhydrous 96%, Sigma-Aldrich), 32,2 mg/L piruvato (Pyruvic acid, Sigma-Aldrich), 0,4%(w/v) BSA (Albumin from bovine sérum, Sigma-Aldrich) e 50 μ g/mL penicilina (Penicillin G sodium salt, Sigma-Aldrich).

percentagens de sobrevivência dos oócitos após vitrificação/desvitrificação. Sempre que o número de oócitos foi inferior a 5 numa das células, teve-se em conta o valor do “Fisher exact test”. Todas as correlações foram calculadas por análise da bivariância, teste “Pearson”. O teste “T” para amostras independentes foi utilizado para averiguar a existência de diferenças nas percentagens de maturação *in vitro* “a fresco” e pós vitrificação nos diferentes grupos em relação à idade, protocolos de estimulação hormonal, causas de esterilidade e resultado do teste imunológico de gravidez. Utilizou-se a análise “ANOVA de uma via” para estudar essas diferenças entre grupos relativamente ao número de embriões de boa qualidade (G1) transferidos. Os resultados foram expressos como médias \pm desvio-padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando associadas a um valor de $p < 0,05$.

III

- I INTRODUÇÃO
- II MATERIAL E MÉTODOS
- III RESULTADOS**
- IV DISCUSSÃO
- V CONCLUSÕES
- VI BIBLIOGRAFIA

1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Este trabalho foi desenvolvido utilizando os gâmetas femininos como modelo e, sendo assim a população de estudo abrange somente indivíduos do sexo feminino, num total de 75. As idades dos indivíduos variaram entre os 24 e os 39 anos, sendo que a média de idades foi de $34 \pm 3,68$ anos. Relativamente à idade da população em estudo é importante referir ainda que 45,3% das mulheres tinham idade ≥ 35 anos, ou seja, idade materna avança, enquanto que as restantes 54,7% tinham idade < 35 anos (tabela 4).

Tabela 4: Dados descritivos referentes à idade população de estudo.

Nº total de mulheres	Idade				
	Média	Mínimo	Máximo	% < 35	% ≥ 35
75	$34 \pm 3,68$	24	39	54,7	45,3

No que se refere às técnicas de reprodução medicamente assistida utilizadas, em 48% das utentes foi utilizada a fertilização *in vitro* (FIV) enquanto que em 41,3% das utentes foi realizada injeção intracitoplasmática de um espermatozoide. Nas restantes 10,6% foram utilizadas outras técnicas (IMSI ou FIV+ICSI; tabela 5).

Na população de estudo, no que diz respeito ao protocolo de estimulação, em 67,4% dos casos foi utilizado um protocolo curto, enquanto que em 31,3% dos casos foi utilizado um protocolo longo. Os restantes 1,3% correspondem a ciclo natural. Quanto ao tipo de esterilidade, 74,6% das utentes da população de estudo têm esterilidade 1ª e as restantes 25,4% têm esterilidade 2ª. No que respeita às causas de esterilidade na população em estudo 35,9% tem um fator masculino (Masc.), 15,6%

tem um fator tubar, 15,6% tem fator misto, a mesma percentagem tem um fator idiopático (Idio.), a restante população (17,2%) tem outras causas de esterilidade (vários fatores femininos; endometriose e fator anovulatório; tabela 5).

Tabela 5: Dados descritivos referentes à população de estudo (tipo de técnica de reprodução medicamente assistida, tipo de protocolo de estimulação hormonal, tipo de esterilidade e causas de esterilidade).

Tipo de técnica de reprodução medicamente assistida			Tipo de protocolo de estimulação hormonal			Tipo de esterilidade		Causas de esterilidade				
% FIV	% ICSI	% Outras*	% Curto	% Longo	% Ciclo natural	% 1 ^a	% 2 ^a	% Masc.	% Tubar	% Mista	% Idio.	% Outras**
48	41,3	10,6	67,4	31,3	1,3	74,6	25,4	35,9	15,6	15,6	15,6	17,2

Masc. (Masculina); Idio. (Idiopática)

* IMSI e ICSI+FIV

** Vários fatores femininos; endometriose, anovulatório

Na população em estudo, 26,7% das mulheres tiveram um teste imunológico de gravidez positivo, enquanto que as restantes 73,3% tiveram um teste negativo (tabela 6).

Tabela 6: Dados descritivos referentes à população de estudo (Teste imunológico de gravidez).

Teste imunológico de gravidez	
% Positivo	% Negativo
26,7	73,3

2. MATURAÇÃO *IN VITRO* “A FRESCO”

Como referido no capítulo anterior a maturação *in vitro* foi realizada em oócitos imaturos (VGs e MIs), que não maturaram *in vivo*, uma vez que estes não têm utilidade para as técnicas de reprodução medicamente assistida neste estado de desenvolvimento. Após realização da maturação *in vitro* “a fresco” destes oócitos, esta técnica mostrou ser mais eficiente quando o estado de desenvolvimento dos oócitos era mais avançado, ou seja, foi mais eficiente quando se partiu de oócitos em MI comparativamente com oócitos VG, sendo que esta diferença tem relevância estatisticamente significativa ($p < 0,001$; tabela 7).

Tabela 7: Percentagem de maturação *in vitro* “a fresco” de VGs e MIs.

	Nº de óocitos	% de maturação <i>in vitro</i>	
VGs colocadas a maturar	37	32,43	p < 0,001
VGs maturadas	12		
MIs colocados a maturar	72	61,11	
MIs maturados	44		
Total	109	51,38	109

Os óocitos imaturos foram obtidos em duas situações distintas. Quando a técnica de reprodução medicamente assistida a realizar era uma ICSI, os óocitos umas horas após punção folicular eram desnudados e antes de serem injetados era avaliado o seu grau de desenvolvimento, ou seja, se estavam maduros ou não, pela presença ou ausência do 1º globo polar (respetivamente). Os óocitos que estivessem imaturos (caso existissem) eram imediatamente retirados e colocados a maturar *in vitro*, os restantes eram injetados. Quando a técnica a realizar era uma FIV os óocitos eram colocados em contacto com os espermatozoides sem desnudação prévia, uma vez que as células do *cumulus oophorus* são necessárias para que ocorra o reconhecimento do óocito pelos espermatozóides e conseqüente fecundação. Neste caso, só após 20h e após desnudação para verificar se a fecundação tinha ou não ocorrido é que se verificava a presença ou não de óocitos imaturos e, só depois disso estes óocitos eram colocados a maturar *in vitro*. Assim sendo, verificou-se que alguns dos óocitos imaturos obtidos após FIV quando colocados a maturar *in vitro*, não só maturaram como também apresentavam sinais de fecundação. A percentagem de fecundação após maturação *in vitro* quando se partiu de óocitos em MI foi de 34% e de 8,3% quando se partiu de óocitos VG. Como se pode observar pela análise da tabela 8 não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entres os dois grupos (p=0,075).

Tabela 8: Oócitos fecundados após maturação *in vitro* “a fresco”.

	Nº de oócitos	% de oócitos fecundados após maturação <i>in vitro</i>	
MIs maturados	47	34,0	p=0,075
MIs fecundados	16		
VGs maturadas	12	8,3	
VGs fecundadas	1		

Dos 16 oócitos em MI que fecundaram, 14 apresentavam 2 pronúcleos (PN) e 2 apresentavam 3 pro-núcleos. Dos 14, apenas 2 evoluíram e originaram embriões de 2 células que posteriormente evoluíram para embriões de 4 células. Dos embriões de 4 células somente um evoluiu originando uma mórula inicial que posteriormente evoluiu para uma mórula que tinha iniciado o desenvolvimento do blastocélio, o outro embrião não evoluiu. Dos oócitos com 3 PN nenhum deles evoluiu. Relativamente às VGs, apenas uma fecundou após maturação *in vitro*, mas não evoluiu para além do estadio de zigoto (2 PN; figura 8,9,10,11).

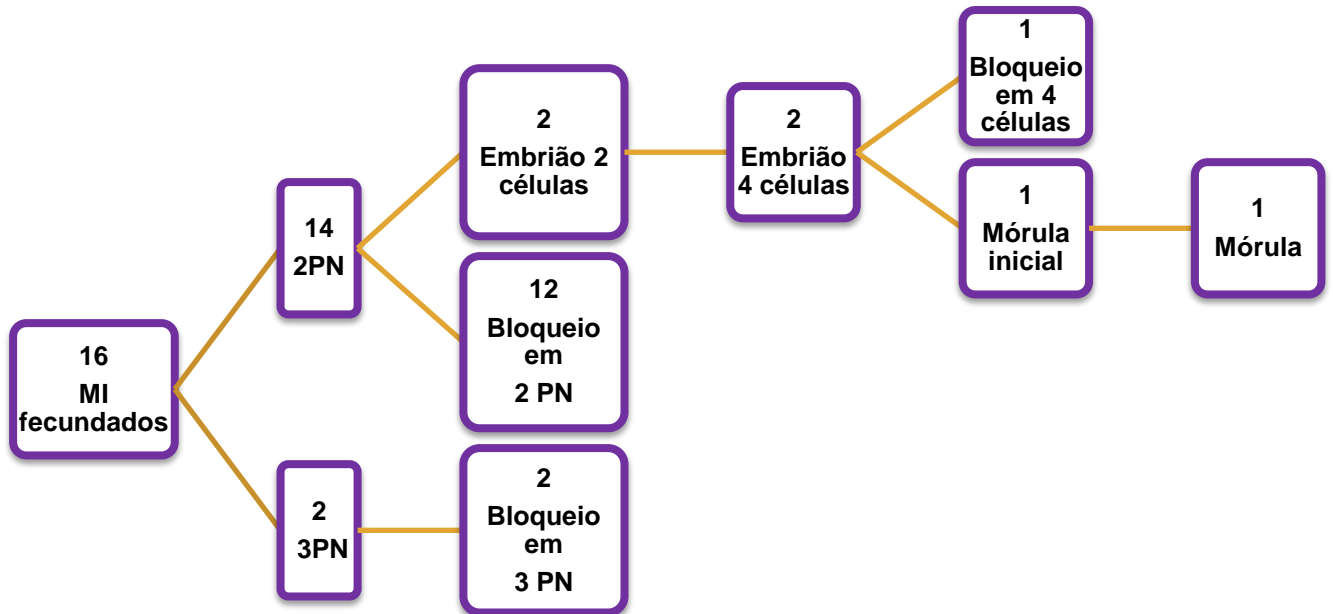


Figura 8: Esquema representativo da evolução dos oócitos em MI fecundados.

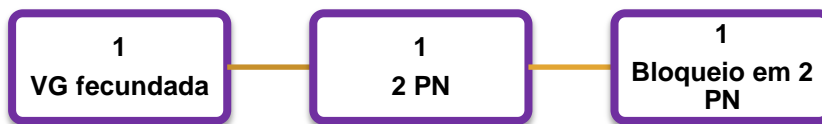


Figura 9: Esquema representativo da evolução dos oócitos VG fecundados.

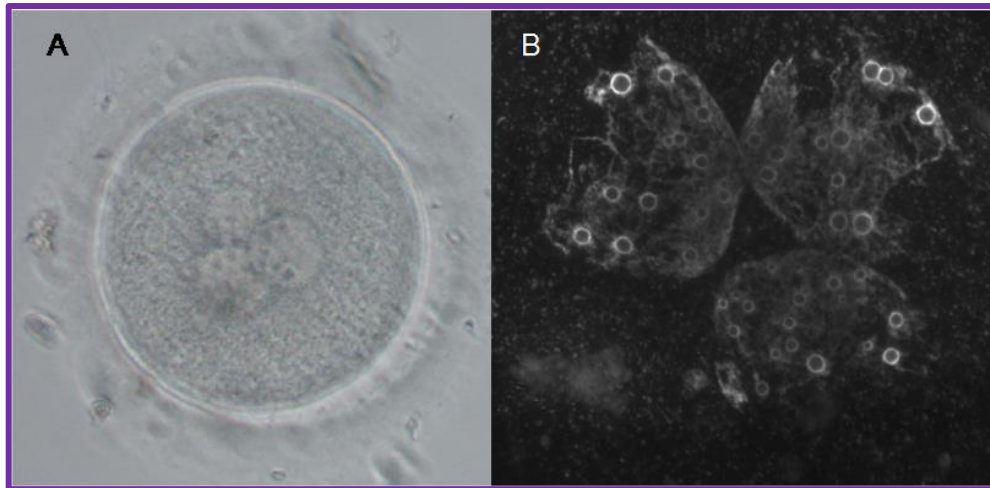


Figura 10: Oócito 3PN após 30h em meio de maturação. A) Imagem de contraste de fase; B) Imagem de microscopia de epifluorescência (marcação com DAPI).



Figura 11: Oócito fecundado. A) Oócito 2PN após 30h em meio de maturação; B) Embrião de 4 células após 44h em cultura; C) Mórula inicial após 5 dias em cultura; D) Mórula a iniciar o desenvolvimento do blastocélio após 6 dias em cultura.

Os óocitos utilizados neste estudo fazem parte de um *pool* de óocitos obtidos de mulheres com as características acima referidas (tabela 5) e, portanto, estes gâmetas estiveram sob as mesmas condições e condicionantes que os óocitos do mesmo *pool* que foram utilizados nas técnicas de reprodução medicamente assistida. Posto isto, foram calculadas algumas correlações e realizados testes estatísticos para verificar se existiriam relações e diferenças estatisticamente relevantes entre grupos com o intuito de perceber se havia alguma variável dentro da população de estudo que afetasse a qualidade oocitária e conseqüentemente, por um lado a eficácia da maturação *in vitro* e por outro lado as taxas de fertilização, desenvolvimento e qualidade embrionária e as taxas de gravidez, dos óocitos utilizados nas técnicas. Para além disso, pretendia-se saber se seria possível definir uma população restrita de utentes com características específicas para aplicação da técnica de maturação *in vitro* com o objetivo de maximizar a eficácia da mesma.

Primeiramente, tentou-se perceber se haveria algum tipo de relação entre o número de óocitos em MII obtidos após maturação *in vivo* e o número de óocitos em MII obtidos após maturação *in vitro*. Tal como ilustra a figura 12, essa relação não se verificou ($p=0,240$).

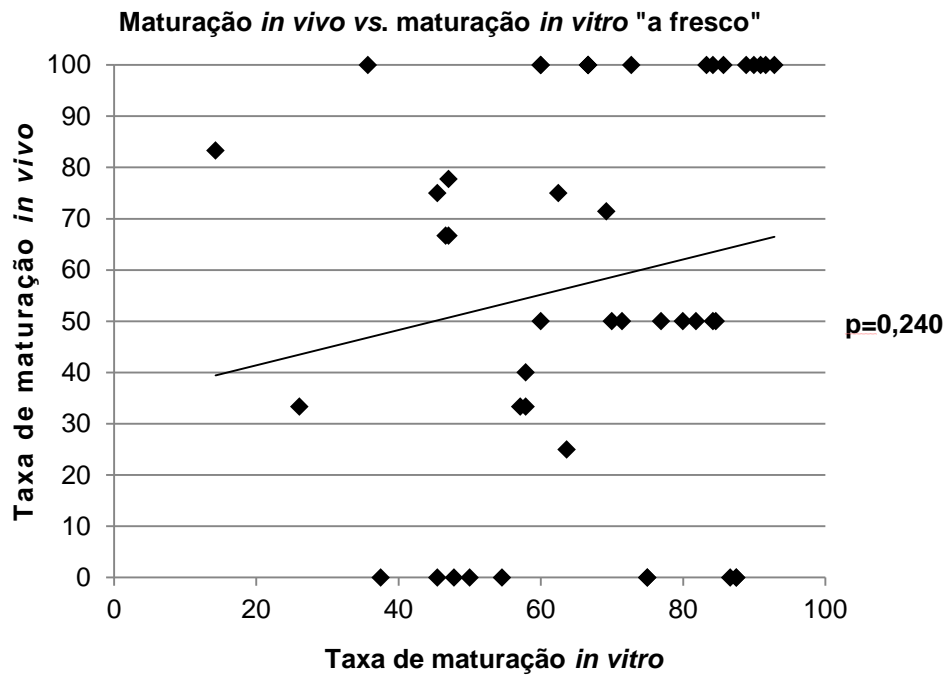


Figura 12: Relação entre a percentagem de óocitos em MII após maturação *in vivo* e a percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* "a fresco".

Verificou-se também não existir nenhuma relação entre a idade das mulheres e a taxa de maturação *in vitro* ($p=0,221$; figura 13). Para além disso, verificou-se também não haver nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a percentagem de maturação *in vitro* de óocitos de mulheres com idade <35 e idade ≥ 35 anos ($p = 0,097$; figura 14).

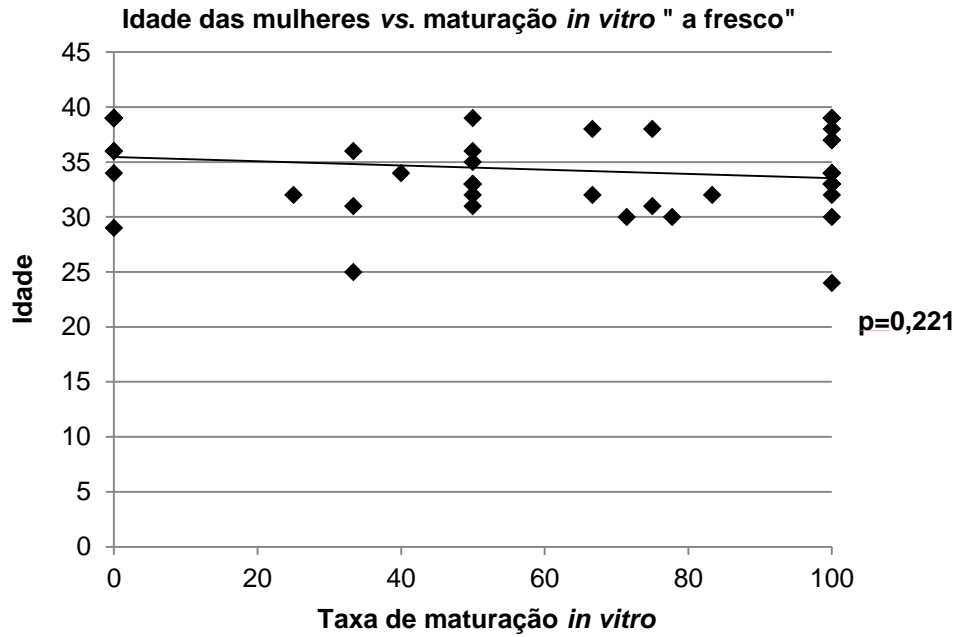


Figura 13: Relação entre a idade das mulheres e a percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* "a fresco".

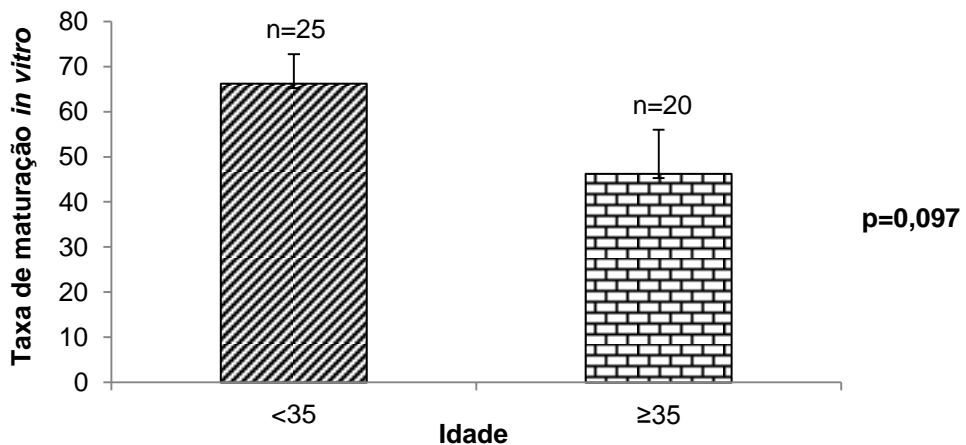


Figura 14: Percentagem de oócitos em MI após maturação *in vitro* "a fresco" em mulheres com idade inferior a 35 e idade superior ou igual a 35 anos.

Relativamente ao protocolo de estimulação hormonal, não foi encontrado qualquer tipo de influência do protocolo de estimulação hormonal (curto ou longo) nas percentagens de oócitos em MI após maturação *in vitro* ($p = 0,160$; figura 15). Da mesma forma, a causa de esterilidade parece não afectar as taxas de maturação *in vitro* ($p = 0,518$; figura 16).

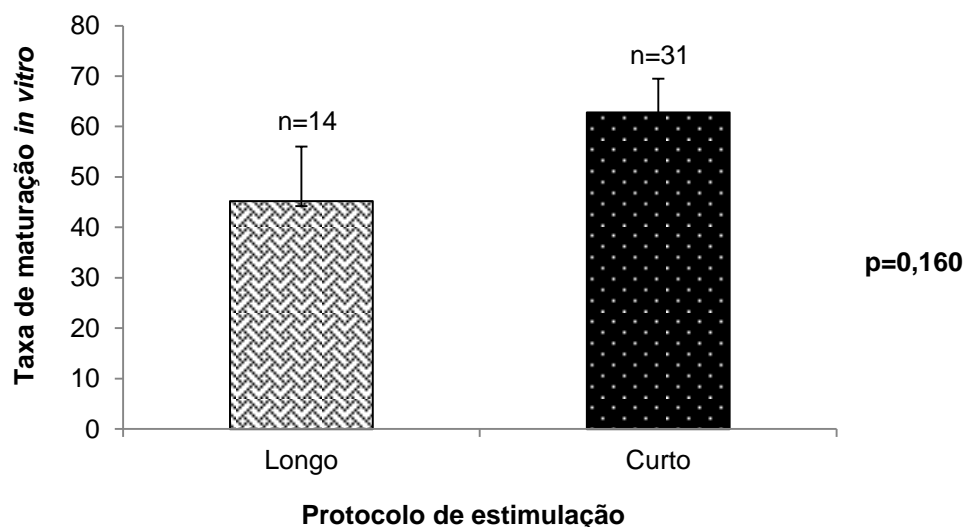


Figura 15: Percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* “a fresco” consoante o protocolo de estimulação hormonal.

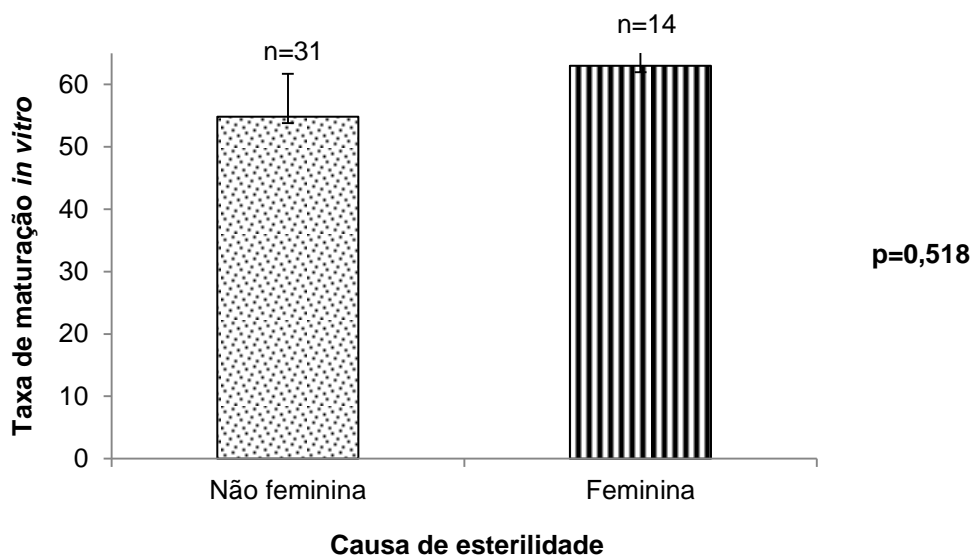


Figura 16: Percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* “a fresco” consoante a causa de esterilidade.

No que se refere à percentagem de embriões de boa qualidade transferidos (embriões G1; classificação atribuída de acordo com as normas definidas por Almeida *et al.*, 2012), obtidos de óocitos MII maturados *in vivo*, utilizados nas técnicas de reprodução medicamente assistida, não se observou nenhuma relação entre a taxa de maturação *in vitro* e a percentagem de embriões de boa qualidade (grau 1-G1; p=0,451; figura 17). Observou-se ainda, não existir nenhuma diferença com relevância estatística entre o

número de embriões de grau 1 transferidos e a taxa de maturação *in vitro* ($p=0,444$; figura 18).

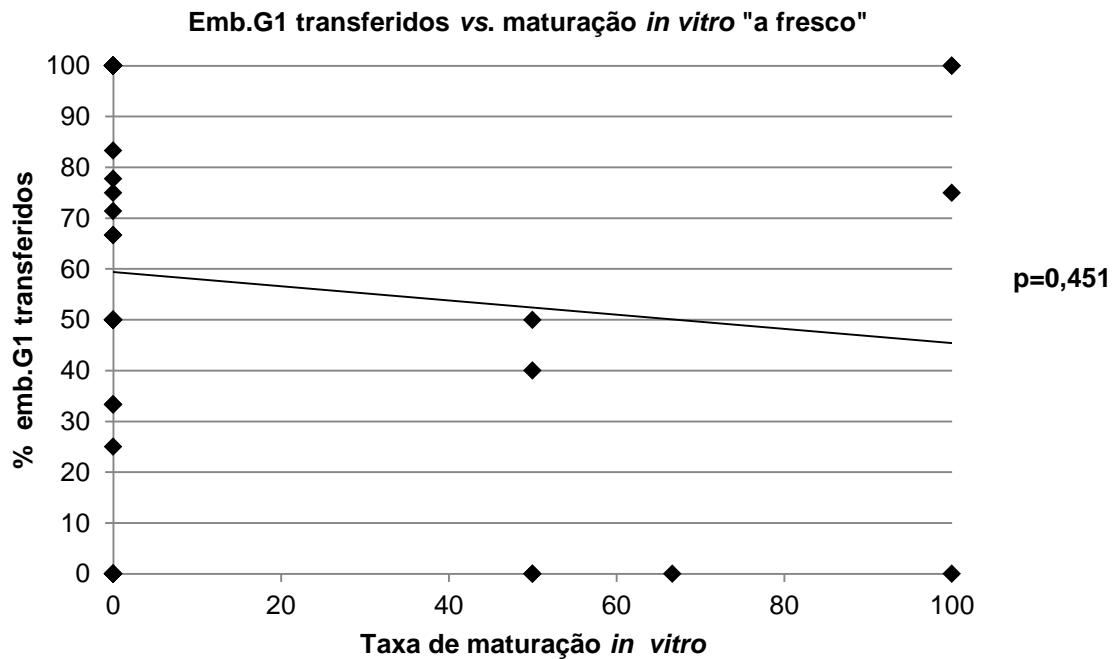


Figura 17: Relação entre a percentagem de embriões de G1 transferidos em relação à percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* "a fresco".

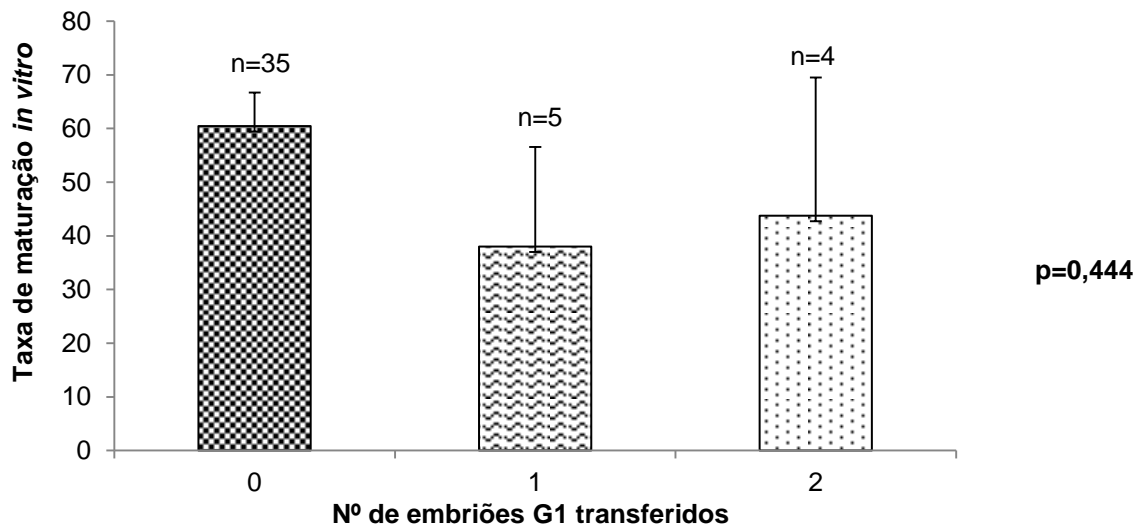


Figura 18: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* "a fresco" consoante o número de embriões de grau 1 transferidos obtidos a partir de oócitos em MII maturados *in vivo*.

No que diz respeito aos resultados do teste imunológico de gravidez, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,258$) nas taxas de maturação *in vitro* e os resultados do teste imunológico de gravidez (figura 19).

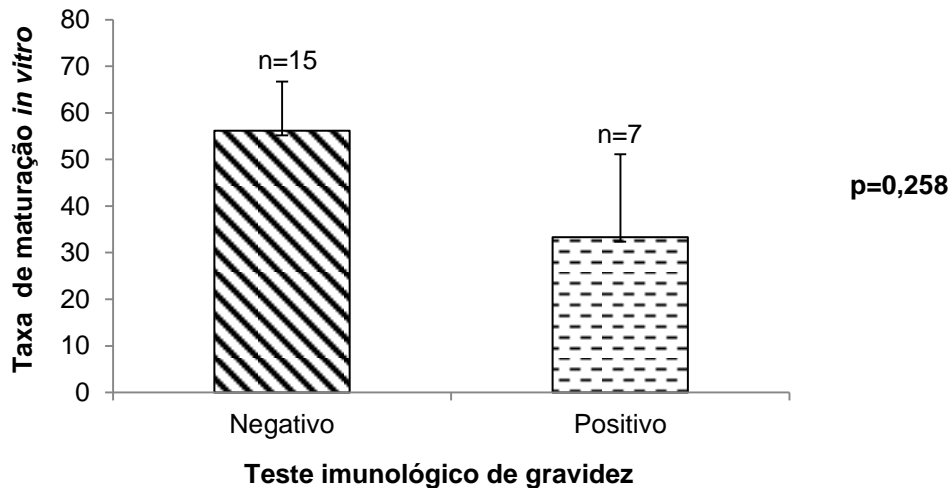


Figura 19: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* “a fresco” consoante o resultado teste imunológico de gravidez.

3. MATURAÇÃO *IN VITRO* PÓS VITRIFICAÇÃO

Com o objetivo de perceber se a maturação *in vitro* é mais eficaz antes ou após maturação, a segunda parte deste trabalho consistiu em maturar oócitos, também eles imaturos (VGs e MIs) após vitrificação.

Tal como apresentado na tabela 9, não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,267$) entre a percentagem de maturação *in vitro* após vitrificação de VGs e MIs.

Tabela 9: Taxa de maturação *in vitro* de VGs e MIs pós vitrificação.

	Nº de oócitos	% de maturação <i>in vitro</i>	
VGs colocadas a maturar	12	8,33	p=0,267
VGs maturadas	1		
MIs colocados a maturar	16	25,00	
MIs maturados	4		
Total	28	17,86	28

À semelhança do que foi feito com os dados obtidos com a maturação dos oócitos *in vitro* “a fresco”, também com aqueles que foram maturados *in vitro* após vitrificação foram calculadas correlações e foram realizados testes estatísticos para perceber se existiam ou não relações e diferenças com relevância estatística entre as variáveis testadas.

Como demonstra a figura 20 não há correlação ($p=0,775$) entre as taxas de maturação *in vivo* e as taxas de maturação *in vitro* pós vitrificação.

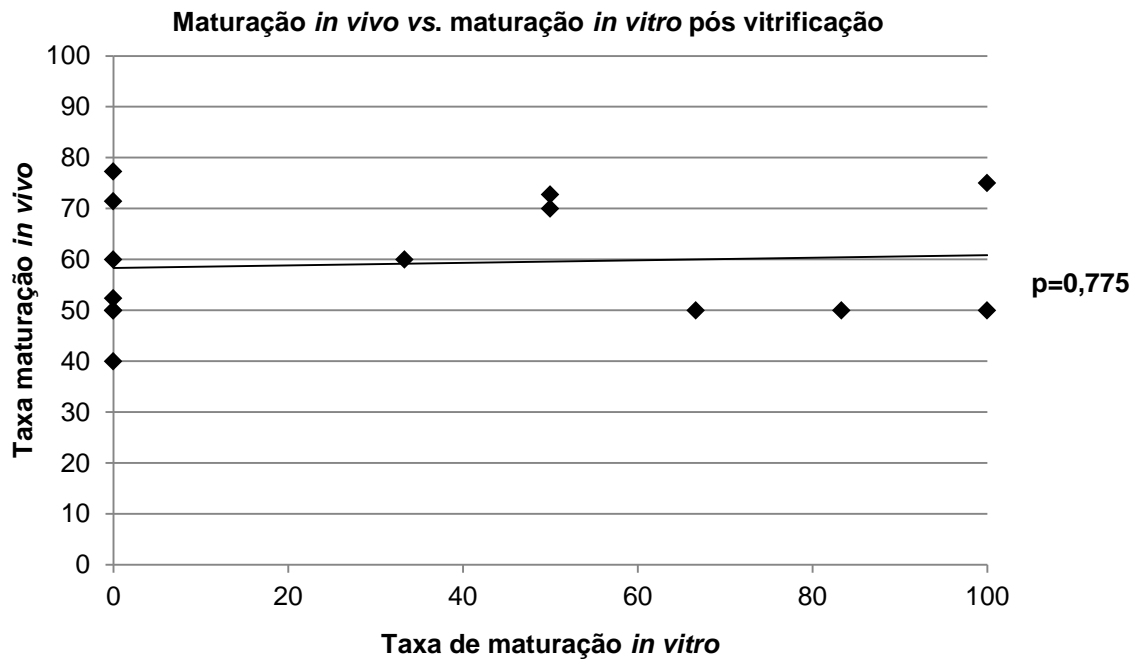


Figura 20: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vivo* consoante a percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação.

A idade das mulheres parece não estar relacionada ($p=0,399$) com a taxa de maturação *in vitro* após vitrificação (figura 21). Também não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,598$) entre as taxas de maturação *in vitro* pós vitrificação em mulheres com idade inferior a 35 anos e idade superior ou igual a 35 anos (figura 22).

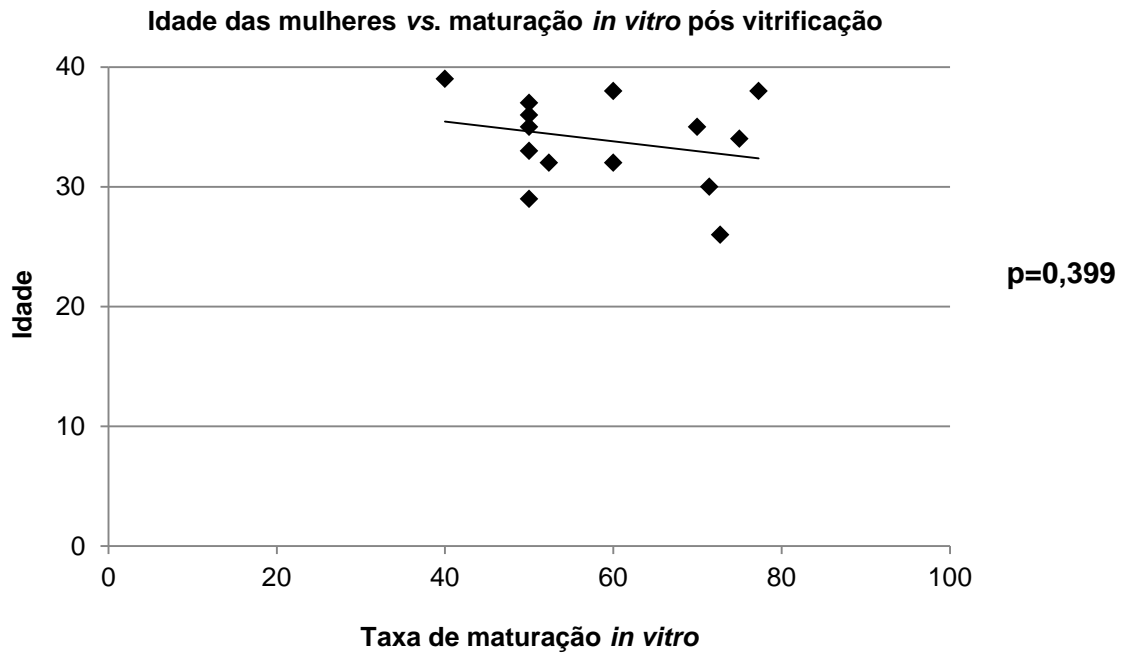


Figura 21: Relação entre a idade das mulheres e a percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação.

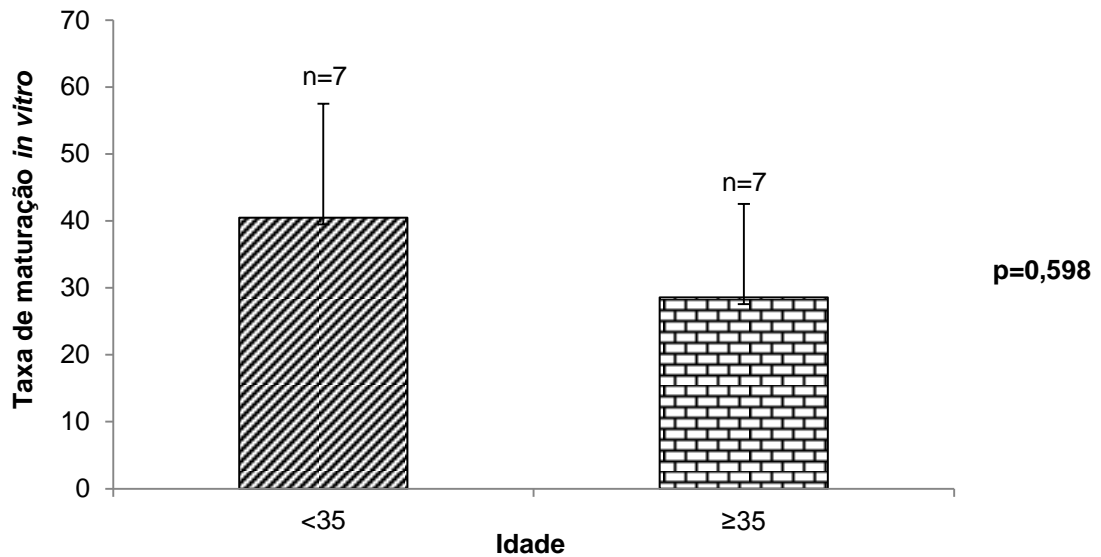


Figura 22: Percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação consoante a idade.

Relativamente aos protocolos de estimulação hormonal e causas de esterilidade, as taxas de maturação *in vitro* pós vitrificação parecem não ser afetadas pelo protocolo de estimulação utilizado (curto ou longo; $p=0,766$; figura 23), nem pela causa de esterilidade das mulheres ($p=0,348$; figura 24).

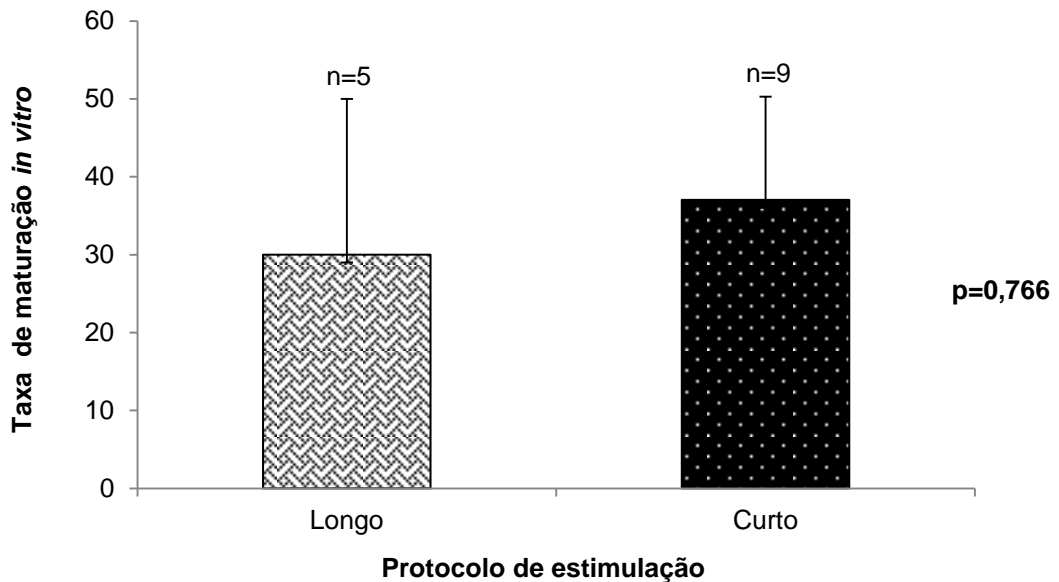


Figura 23: Percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação consoante o protocolo de estimulação hormonal.

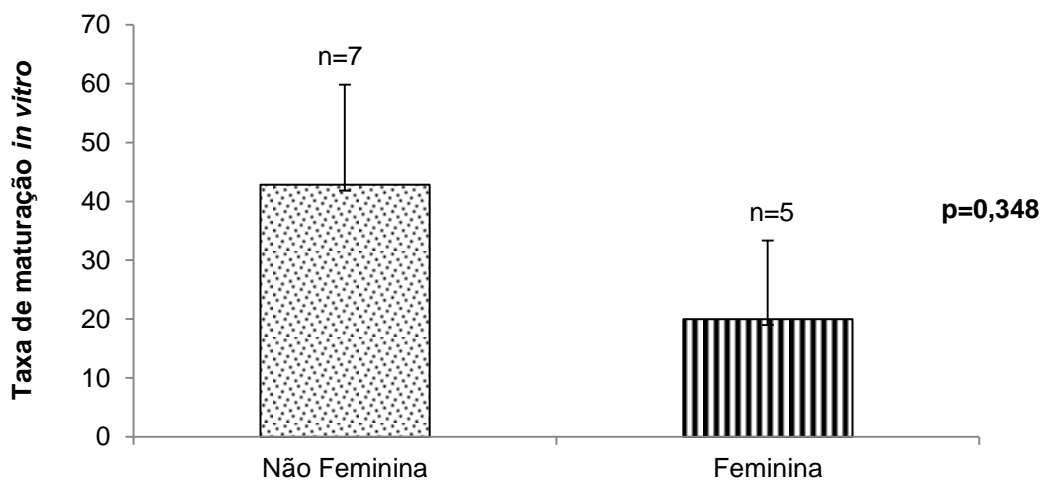


Figura 24: Percentagem de óocitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação consoante a causa de esterilidade.

No que diz respeito à percentagem de embriões G1 transferidos, não foi observada nenhuma correlação ($p=0,269$) entre a percentagem de embriões de boa qualidade (G1) transferidos e a taxa de maturação *in vitro* pós vitrificação (figura 25). Da mesma forma, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,120$) entre o número de embriões de boa qualidade transferidos e a taxa de maturação *in vitro* após vitrificação (figura 26).

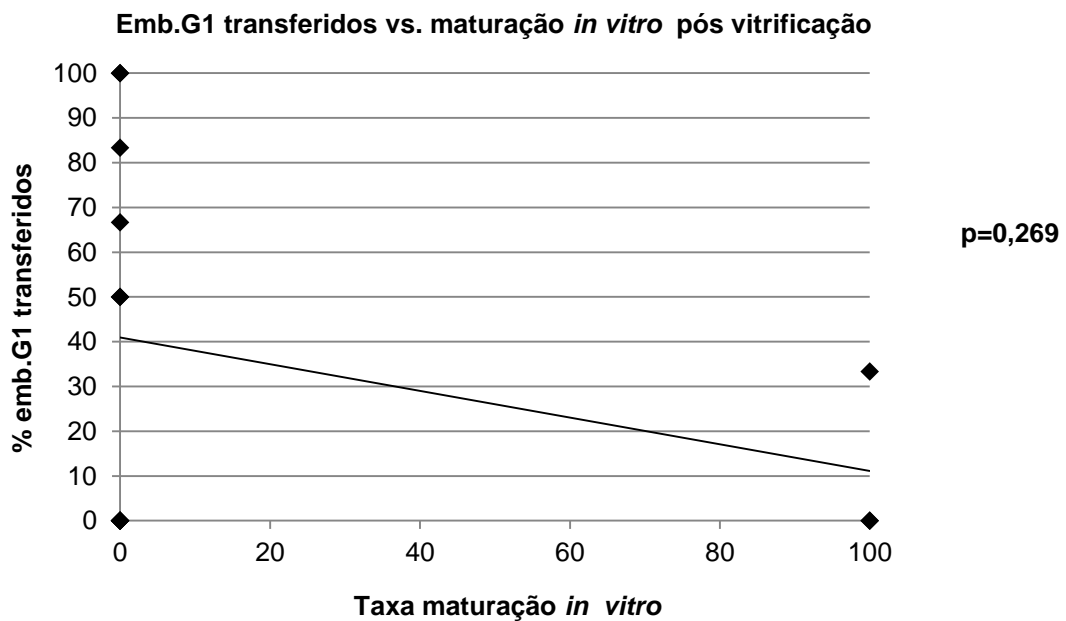


Figura 25: Relação entre a percentagem de embriões G1 transferidos e a percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação.

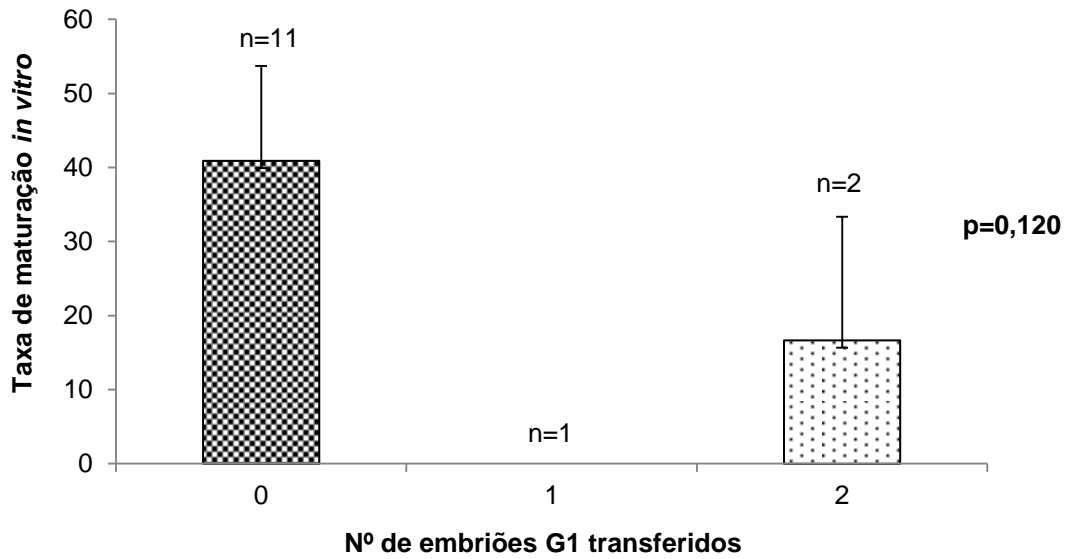


Figura 26: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação consoante o número de embriões G1 transferidos.

Por fim, relativamente aos resultados do teste imunológico de gravidez não foram verificadas diferenças com relevância estatística ($p=0,383$ entre as taxas de maturação *in vitro* pós vitrificação e os resultados do teste de gravidez imunológico (figura 27).

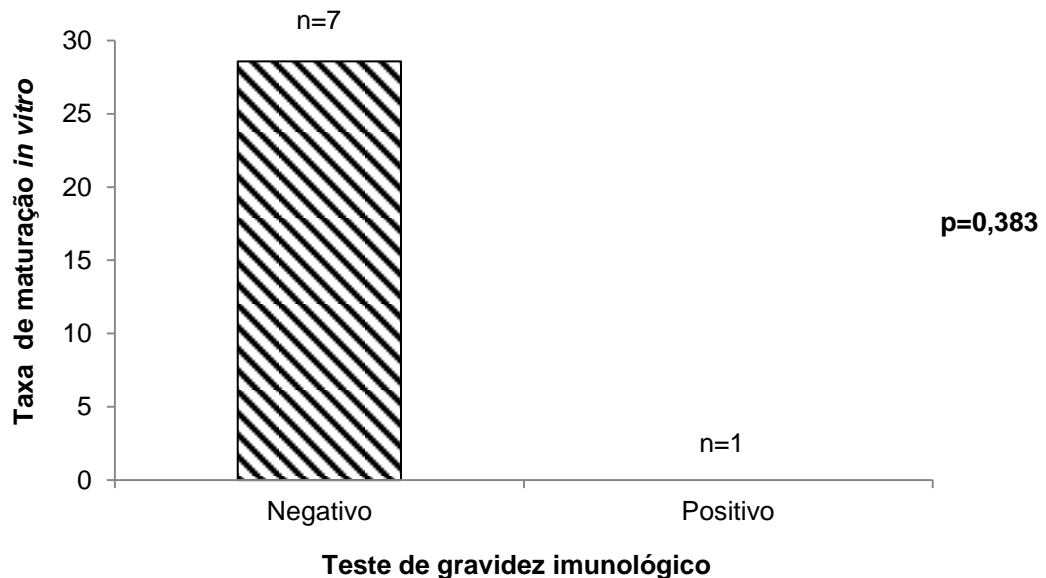


Figura 27: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação consoante o resultado do teste de gravidez imunológico.

4. MATURAÇÃO *IN VITRO* “A FRESCO” E PÓS VITRIFICAÇÃO

A sobrevivência ao processo de vitrificação é um dos elementos essenciais para o sucesso desta técnica. Considera-se que um oócito sobreviveu ao processo se tiver totalmente expandido e se apresentar um citoplasma homogêneo e de cor clara. Pela observação da tabela 10 pode verificar-se que nos resultados obtidos com este estudo não existem diferenças estatisticamente significantes ($p=0,121$) entre a percentagem de sobrevivência de oócitos imaturos (VGs e MIs) e oócitos em MII maturados *in vitro*.

Tabela 10: Taxa de sobrevivência de oócitos VG, MI e MII vitrificados.

	Nº total de oócitos	Nº total de oócitos que sobreviveram	% sobrevivência à vitrificação	
VG	18	5	27,78	p=0,121
MI	50	8	16,00	
MI	21	8	38,10	
Total	89	21	23,60	

Para tentar perceber se existem diferentes taxas de maturação *in vitro* de oócitos imaturos antes ou depois da vitrificação (objetivo deste trabalho) foi feita a análise da percentagem de maturação de oócitos VG e MI. Tal como apresentado na tabela 11, na maturação *in vitro* das VGs não se detetaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,098$) independentemente da altura em que elas foram maturadas, contudo quando se observam as percentagens de maturação *in vitro* dos MIs verifica-se que estes têm percentagens de maturação significativamente superiores ($p=0,009$) quando maturados antes da vitrificação (tabela 12).

Tabela 11: Percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* “a fresco” e percentagem de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação de VGs.

	% Maturação <i>in vitro</i> “a fresco”	% Maturação <i>in vitro</i> pós vitrificação	n	
VG maturada	32,4	8,3	13	p=0,098
VG não maturada	67,6	91,7	36	

Tabela 12: Percentagem de de oócitos em MII após maturação *in vitro* “a fresco” e percentagem de de oócitos em MII após maturação *in vitro* pós vitrificação de MIs.

	% Maturação <i>in vitro</i> “a fresco”	% Maturação <i>in vitro</i> pós vitrificação	n	
MI maturado	61,1	25,0	48	p=0,009
MI não maturada	38,9	75,0	40	

Com o intuito de se perceber se a maturação *in vitro* e a vitrificação estariam a causar alterações a nível molecular, nos elementos essenciais à divisão celular e segregação dos cromossomas, os microtúbulos, foi feita uma análise dos mesmos após maturação *in vitro* “a fresco” e após maturação *in vitro* pós vitrificação.

O que se constatou no presente trabalho foi que, independentemente do momento em que a maturação *in vitro* foi realizada e independentemente da fase inicial dos oócitos imaturos utilizados (VGs ou MIs), todos os oócitos MII aos quais se fez a análise da integridade do fuso meiótico e cromossomas apresentavam danos ao nível da integridade dos microtúbulos e do alinhamento e condensação dos cromossomas (tabela 13). Apesar

de todos os oócitos em MII apresentarem anomalias no fuso e nos cromossomas, foi possível observar quatro conjugações diferentes de danos, tal como é demonstrado na figura 28.

Tabela 13: Danos observados no fuso meiótico e cromossomas em oócitos VG e MI maturados *in vitro* a fresco, prés e pós vitrificação.

Fase inicial		Maturação <i>in vitro</i> "a fresco"	Maturação <i>in vitro</i> pré vitrificação	Maturação <i>in vitro</i> pós vitrificação
		n (%)	n (%)	n (%)
VGs	MIs com danos no fuso e cromossomas	2	0	1
	MIs sem fuso			
	MIs com fuso não bipolar	2		1
	MII com cromossomas dispersos	2		1
	MIs com cromossomas pouco condensados			
	MIs com cromossomas alinhados			
MIs	MIs maturados com danos no fuso e cromossomas	12	3	5
	MIs sem fuso	3 (25)	3	4 (80)
	MIs com fuso não bipolar	9 (75)		1 (20)
	MIs com cromossomas dispersos	10 (83,3)		1(20)
	MIs com cromossomas pouco condensados	1 (8,3)	2 (75)	4 (80)
	MIs com cromossomas alinhados	1 (8,3)	1 (25)	
Total de MIs com danos		14	3	6

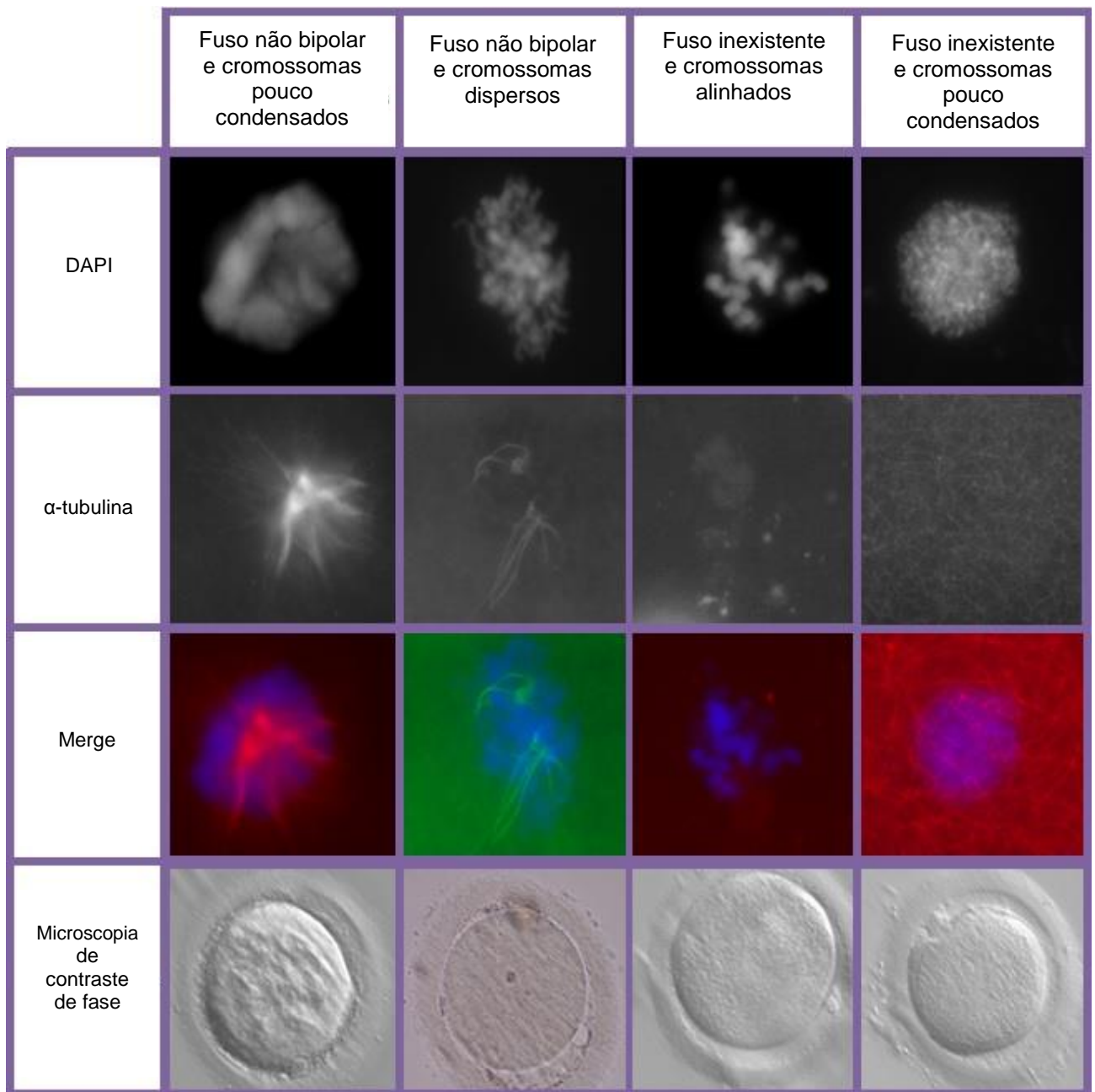


Figura 28: As quatro conjunções de anomalias observadas ao nível do fuso meiótico e cromossomas.

IV

- I INTRODUÇÃO
- II MATERIAL E MÉTODOS
- III RESULTADOS
- IV DISCUSSÃO**
- V CONCLUSÕES
- VI BIBLIOGRAFIA

O número de mulheres em idade reprodutiva, que poderão ser alvo de processos que comprometam a sua fertilidade, tem aumentado consideravelmente e, conseqüentemente, a preservação da fertilidade feminina tem sido alvo de atenção de embriologistas e médicos, sobretudo os que se encontram ligados à medicina da reprodução (Noyes *et al.*, 2010). A criopreservação de oócitos deixou de ser considerada uma técnica experimental apenas em Janeiro de 2013 (Tomasi-Cont *et al.*, 2014), contudo, dentro das várias opções de preservação da fertilidade feminina é aquela que permite assegurar a autonomia reprodutiva de uma mulher (Anderson & Wallace, 2011). A vitrificação de oócitos é a técnica de criopreservação que se tem mostrado mais eficaz na criopreservação dos gâmetas femininos e a maturação *in vitro* é uma técnica muito importante quando se trata da criopreservação de oócitos imaturos (Combelles & Chateau, 2012).

1. FONTE DE OÓCITOS

Os protocolos de estimulação ovárica utilizados nos tratamentos de reprodução medicamente assistida resultam no desenvolvimento de múltiplos folículos e oócitos (Combelles, 2003). No entanto, apesar da indução da maturação por parte da hCG administrada (Combelles, 2003), 15 a 20% dos oócitos obtidos das utentes estão imaturos (Lei *et al.*, 2014). Os oócitos neste estado de desenvolvimento não têm qualquer utilidade em termos clínicos e, por isso, podem ser uma fonte interessante para estudos do tipo do aqui apresentado em gâmetas femininos. Foram estes oócitos imaturos que foram utilizados no presente estudo, ou seja, oócitos imaturos que não maturaram *in vivo*. Muitos dos estudos deste género publicados utilizam também esta fonte de oócitos, contudo alguns autores defendem que estes gâmetas podem ter falhado a maturação *in vivo* por apresentarem a sua integridade genómica comprometida (Coticchio *et al.*, 2013). Para além da integridade genómica, estes oócitos podem ter a sua integridade estrutural também comprometida.

2. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO E TAXAS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* PRÉ E PÓS VITRIFICAÇÃO

A população de estudo é sempre um fator que pode condicionar os resultados obtidos e, de facto no presente estudo a população utilizada tem uma elevada heterogeneidade, não só em termos de idade, como também em termos do tipo e causa de esterilidade e do tipo de protocolo aplicado. A idade e a causa de esterilidade são fatores que condicionam a escolha do protocolo de estimulação hormonal e a resposta de cada utente ao protocolo condiciona a qualidade oocitária, que é uma condição importantíssima não só para o sucesso das técnicas de reprodução assistida (Alviggi *et al.*, 2012), mas também para as técnicas aqui em estudo: a maturação *in vitro* e a vitrificação. Posto isto, é preciso ter em conta esta elevada variabilidade quando se analisam os resultados aqui apresentados. Os resultados obtidos mostram não haver qualquer tipo de correlação entre as taxas de maturação *in vitro* “a fresco” e pós vitrificação e a idade das utentes, as causas de esterilidade e os protocolos de estimulação aplicados. À semelhança dos resultados obtidos neste trabalho, um estudo publicado em 2012 por Wang e um conjunto de investigadores mostrou não haver influência da idade das utentes (neste caso <36 e ≥36 anos) nas taxas de maturação *in vitro*. Todavia, no estudo de Mohsenzadeh e colaboradores publicado em 2012, a taxa de maturação *in vitro* “a fresco” e após vitrificação foi superior em mulheres com idade inferior ou igual 30 anos, tais como as taxas de maturação *in vitro* em pacientes com causa de infertilidade masculina foram superiores comparativamente com as que possuíam uma causa de esterilidade ovárica. A idade e os restantes fatores acima referidos seriam as variáveis que poderiam afetar e condicionar a qualidade oocitária e por isso comprometer a eficácia da maturação *in vitro*. Contudo, estas variáveis em estudo parecem não afetar a eficácia desta técnica, e ao contrário do que era esperado também não permitem definir um perfil ideal de utente para a qual seria oportuno indicar a maturação *in vitro* como alternativa a uma estimulação hormonal (maturação *in vivo*).

Relembrando o que foi referido no capítulo anterior os oócitos utilizados na realização deste trabalho fazem parte de um *pool* de oócitos que esteve sujeito ao mesmo tipo de condições e condicionantes que os oócitos que foram utilizados nas técnicas de reprodução medicamente assistida. Por tudo isto, e de uma forma mais indireta, analisou-se se haveria alguma correlação entre as taxas de maturação *in vitro* “a fresco” e pós vitrificação e alguns indicadores do sucesso das técnicas de reprodução medicamente assistida e do próprio resultado final de um ciclo de tratamentos. Os indicadores escolhidos foram a percentagem de oócitos em metáfase II maturados *in vivo*, o número e percentagem de embriões de boa qualidade transferidos e os resultados dos testes imunológicos de gravidez. Neste caso também não foi identificada nenhuma correlação entre estes indicadores e as taxas de maturação *in vitro* e não existe na literatura nenhum estudo que faça uma análise deste tipo.

3. MATURAÇÃO *IN VITRO* “A FRESCO”: FONTE DE OÓCITOS, CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* E MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Como mencionado no capítulo anterior as taxas de maturação *in vitro* “a fresco” foram significativamente superiores ($p < 0,001$) quando se partiu de oócitos em metáfase I comparativamente às taxas obtidas quando a fase inicial dos oócitos era vesícula germinal. Estes resultados não são difíceis de compreender, visto ser mais simples atingir a metáfase II quando a fase de desenvolvimento inicial dos oócitos é mais avançada, ou seja quando se parte de um oócito em metáfase I comparativamente com um oócito em prófase I (vesícula germinal). Os resultados de um estudo publicado em 2013 por Lee e colaboradores estão em concordância com os resultados obtidos neste trabalho, contudo Mohsenzadeh e investigadores publicaram um estudo em 2012 cujos resultados mostraram que as taxas de maturação “a fresco” eram superiores em VGs comparativamente com oócitos em MI. Relativamente a estes resultados obtidos no presente trabalho é importante referir que as taxas de maturação *in vitro* obtidas podem ser inferiores às taxas apresentadas noutros estudos do mesmo tipo publicados (Boiso *et*

al., 2002; Cao *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2012; Mohsenzadeh *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2014), no entanto é necessário ter em conta a dimensão da amostra do presente estudo e dos restantes similares, a origem das amostras e as condições de maturação (maturação com ou sem células do *cumulus* e meio de maturação). Alguns estudos publicados utilizaram também oócitos obtidos de ciclos de estimulação hormonal (oócitos que não maturaram *in vivo*; Baka *et al.*, 1995; Boiso *et al.*, 2002; Christopikou *et al.*, 2010; Fasano *et al.*, 2012; Mohsenzadeh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2014), contudo existem outros que utilizaram oócitos dos chamados ciclos “IVM” (Cao *et al.*, 2009). Os ciclos “IVM” são ciclos nos quais é feita uma estimulação distinta do comum (doses mais baixas de hMG e menos dias de estimulação) que tem como objectivo recrutar um número restrito de oócitos, mas que estes mantenham o seu estado imaturo (Cao *et al.*, 2009) e ainda outros que utilizaram oócitos de mulheres sujeitas a cirurgia para remoção dos ovários (Chung *et al.*, 2000). Para além desses estudos não utilizarem a mesma fonte de oócitos, são muito raros os que se referem à maturação *in vitro* de oócitos em MI (Mohsenzadeh *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013), a grande maioria usa somente oócitos VG (; Baka *et al.*, 1995; Boiso *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2009; Christopikou *et al.*, 2010; Fasano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2014). Ainda sobre estes resultados é muito importante referir que a maturação *in vitro* foi realizada com oócitos desnudados, ou seja, quando os oócitos foram colocados a maturar não estavam rodeados por células do *cumulus oophorus*. Tal como referido no primeiro capítulo as células do *cumulus oophorus* estabelecem uma comunicação bidirecional com o oócito mediada por junções tipo gap. Esta comunicação é considerada a chave para a maturação do gâmeta feminino, uma vez que é ela que mantém o bloqueio meiótico; que, na devida altura, induz o reinício da meiose e a conclusão da divisão meiótica e é também esta comunicação que permite a maturação citoplasmática do oócito (Hardy *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013). Para além disso, permite ainda o transporte de pequenas moléculas essenciais ao oócito, como é o caso de alguns aminoácidos, colesterol e moléculas sinalizadoras (Hardy *et al.*,

2000; Tanghe *et al.*, 2002; Coticchio *et al.*, 2013). No entanto, nos estudos em que são utilizados oócitos imaturos de ciclos de estimulação hormonal (anteriormente referidos), a maturação *in vitro* é feita com oócitos desnudados, contudo alguns autores defendem que a presença de células foliculares é necessária à resposta mediada por gonadotrofinas e que, por sua vez, esta é essencial à maturação *in vitro* (Christopikou *et al.*, 2010). A ausência de células do *cumulus oophorus* pode comprometer a eficácia da maturação *in vitro* (Fasano *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014) e é inquestionavelmente incompatível com uma correta maturação nuclear e citoplasmática (Sutton, 2003). Como já foi mencionado neste trabalho outro dos elementos essenciais à maturação *in vitro* é o próprio meio de maturação. De acordo com um estudo publicado por Christopikou e outros investigadores em 2010, a suplementação dos meios de maturação (mesmo que comerciais) com LH, FSH e estradiol aumenta consideravelmente as taxas de maturação *in vitro* (Christopikou *et al.*, 2010). No presente estudo foi utilizado um meio de maturação *in vitro* comercial que foi suplementado com FSH, hCG e soro humano de mulheres em estimulação (indicações do fornecedor). Contudo, e à semelhança do que acontece com outros meios (comerciais e não comerciais) e com outros estudos (Christopikou *et al.*, 2010), este meio foi desenvolvido para a maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito e não de oócitos desnudados, fator este que pode condicionar os resultados obtidos. No entanto tendo em conta a fonte dos oócitos, era impossível maturá-los com células do *cumulus oophorus*.

4. FECUNDAÇÃO APÓS MATURAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação de oócitos imaturos após maturação *in vitro* é algo que não se encontra descrito na literatura, pelo menos, em artigos relevantes na área. Esta situação deve-se ao facto de todos esses estudos utilizarem apenas oócitos dos chamados ciclos de estimulação ICSI, ou seja, oócitos imaturos de utentes cuja técnica de reprodução medicamente assistida aplicada foi a ICSI. Nesta parte do estudo estes oócitos foram obtidos de ciclos de estimulação FIV. Os oócitos de FIV são colocados em caixa de Petri

em contacto com os espermatozóides ainda como complexo *cumulus*-oócito, ou seja eles não são desnudados e, não sendo desnudados é difícil ter acesso ao seu grau de maturação. Como tal, só um dia após punção folicular é que os oócitos de FIV são desnudados e só aí se sabe se existem ou não oócitos imaturos. Dito isto, estes oócitos ainda que imaturos já estiveram em contacto com os espermatozóides, e em determinadas situações, estes penetraram os gâmetas femininos, mas como eles não se encontravam em metáfase II não foi possível correta ocorrência e visualização de fecundação. Contudo, quando são colocados em meio de maturação *in vitro*, estes oócitos conseguem atingir a metáfase II reunindo-se as condições para que ocorra a fecundação, uma vez que o espermatozóide já se encontra no seu interior. Relativamente a estes resultados não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,075$) entre a percentagem de fecundação em oócitos em MI maturados *in vitro* e oócitos VG maturados *in vitro*. No entanto, se a dimensão da amostra for superior é possível que essas diferenças surjam. Há que referir ainda que, de um total de 16 oócitos fecundados a partir de oócitos em MI maturados *in vitro*, apenas 2 evoluíram originando embriões com 4 células e apenas um evoluiu até mórula. Os restantes MI e VG maturados *in vitro* não evoluíram. Possivelmente, o reduzido número de oócitos fecundados que evoluíram poderá dever-se a danos ao nível dos microtúbulos que impediram as corretas divisões celulares, danos esses visíveis nos oócitos maturados *in vitro* (figura 28).

5. TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO

A vitrificação de oócitos imaturos e posterior maturação *in vitro* é uma das opções para a preservação da fertilidade feminina. Esta é uma alternativa viável em situações em que não é possível ou é de todo desaconselhável a realização de uma estimulação ovárica (Combelles & Chateau, 2012).

A sobrevivência ao processo de vitrificação é fundamental para o sucesso da

técnica. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de perceber se é mais benéfico, em termos de eficácia da técnica, vitrificar oócitos imaturos (VG e MI) ou oócitos maduros (MII). No estudo de 2009 publicado por Cao e colaboradores e no estudo de Fasano e colaboradores de 2012, os resultados mostraram que as taxas de sobrevivência à vitrificação foram comparáveis entre oócitos VG e oócitos em MII. No estudo de 2013 realizado por Lee e colaboradores, a técnica de criopreservação usada foi a congelação lenta e à semelhança do presente estudo e dos referidos anteriormente, as taxas de sobrevivência de oócitos VG, MI e MII (maturados *in vitro*) não foram estatisticamente distintas ($p=0,121$) entre os três grupos. Ao contrário destes estudos, os resultados do trabalho de 2002 de Boiso e colaboradores mostraram que a taxa de sobrevivência de oócitos VG ao processo de criopreservação (congelação lenta) era significativamente superior à taxa de sobrevivência de oócitos em MII maturados *in vitro*. No presente trabalho, as taxas de sobrevivência nos três grupos testados (oócitos VG, MI e MII) foram inferiores às descritas por outros autores (Boiso *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). No entanto, é importante lembrar uma vez mais que tem de se ter em conta as reduzidas dimensões da presente amostra (VG, $n=18$; MI, $n=50$; MII, $n=21$), comparativamente com as amostras de outros estudos publicados. Para além disso, o início do estudo foi concomitante com a introdução da técnica de vitrificação no laboratório, como tal é preciso ter em conta que as primeiras amostras deste estudo foram criopreservadas na fase experimental da técnica.

Alguns autores defendem que o desenvolvimento de protocolos ótimos para cada fase meiótica vai permitir a criopreservação eficaz de oócitos em qualquer uma das fases (VG, MI ou MII; Combelles & Chateau, 2012, Wang *et al.*, 2012).

6. MATURAÇÃO *IN VITRO* PRÉ E PÓS VITRIFICAÇÃO

Como foi referido várias vezes ao longo deste trabalho, o objetivo deste estudo era tentar perceber se é mais benéfico, em termos de eficácia das técnicas, maturar *in*

in vitro oócitos pré ou pós vitrificação. De acordo com o descrito na literatura, grande parte dos estudos refere que as taxas de maturação *in vitro* são significativamente superiores antes da realização da criopreservação dos oócitos quer por vitrificação (Cao *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2012; Mohsenzadeh *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013) ou por congelação lenta (Wang *et al.*, 2012). Contudo, outros estudos referem não existir diferenças significativas nas taxas de maturação de VG antes ou após vitrificação (Lei *et al.*, 2014) e antes ou após congelação lenta (Boiso *et al.*, 2002). No presente trabalho, a taxa de maturação *in vitro* de oócitos VG foi igual ($p=0,098$) “a fresco” e após vitrificação, contudo, no que diz respeito aos oócitos em MI, a taxa de maturação *in vitro* “a fresco” foi superior à taxa de maturação *in vitro* pós vitrificação ($p=0,009$). Relativamente a este dado é importante referir que no estudo de 2013 publicado por Lee e outros investigadores, os autores verificaram que independentemente da congelação lenta ser realizada antes ou após maturação *in vitro* os oócitos em MI maturaram melhor que os oócitos VG.

7. MATURAÇÃO *IN VITRO*, VITRIFICAÇÃO E DANOS NO FUSO MEIÓTICO E MICROTÚBULOS

A formação de um fuso meiótico na metáfase da segunda divisão meiótica é essencial para a separação dos cromatídeos irmãos e consequente obtenção de oócitos euploides (Baka *et al.*, 1995; Boiso *et al.*, 2002; Christopikou *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013). A formação de oócitos aneuploides pode reduzir as taxas de fertilização e implantação (Christopikou *et al.*, 2010; Coticchio *et al.*, 2013).

Este estudo é pioneiro na análise de danos nos microtúbulos de oócitos maturados *in vitro* “a fresco”, pré e pós vitrificação. No entanto, é possível encontrar na literatura outros trabalhos onde foi feita a análise do estado do fuso meiótico e dos cromossomas em oócito maturados *in vitro* “a fresco” e após criopreservação (vitrificação e congelação lenta). Em 1995, o estudo publicado por Baka e colaboradores mostra que os danos no fuso meiótico eram significativamente superiores em oócitos em MII resultantes de maturação *in vitro* e criopreservados (congelação lenta) comparativamente

com os oócitos VG criopreservados e maturados após descongelação e comparativamente a oócitos maturados *in vitro* sem serem criopreservados e oócitos maturados *in vivo*. Os autores deste estudo concluem que a criopreservação de VGs e posterior maturação *in vitro* não aumenta significativamente os danos ao nível do fuso meiótico. Já em 2002 Boiso e outros investigadores publicaram um estudo onde concluem que os efeitos negativos ao nível do fuso meiótico e cromossomas ocorrem independentemente do momento em que a criopreservação (congelção lenta) foi realizada (antes ou após maturação *in vitro*). À semelhança destes resultados também em 2012 os resultados do estudo de Wang e colaboradores mostraram que os danos na configuração do fuso meiótico e cromossomas eram semelhantes independentemente da altura em que a maturação das VG era realizada, antes ou após criopreservação (congelção lenta). Ao contrário dos estudos anteriores, um mais recente publicado em 2014 por Lei e outros investigadores mostra que 45,2% dos oócitos maturados *in vitro* e 48% dos oócitos maturados *in vitro* e vitrificados apresentam danos no fuso meiótico. Estes autores concluíram que a maturação *in vitro* tem efeitos adversos na organização do fuso meiótico e dos cromossomas independentemente de estes serem ou não vitrificados, uma vez que não observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, e concluem ainda que a vitrificação afeta significativamente a atividade mitocondrial. No presente trabalho os oócitos em MII (maturação avaliada pela presença do primeiro globo polar) em que foi feita a análise da integridade dos microtúbulos e cromossomas, independentemente da fase de maturação inicial dos oócitos (VGs ou MIs) e do momento em que foi realizada a maturação *in vitro* (“a fresco”, pré ou pós vitrificação), todos eles apresentaram danos. No entanto, foi possível identificar quatro conjunções diferentes de danos: 1) oócitos em MII com fuso meiótico não bipolar e cromossomas pouco condensados, 2) oócitos em MII com fuso meiótico não bipolar e cromossomas dispersos; 3) oócitos em MII sem fuso meiótico e cromossomas alinhados e 4) oócitos em MII sem fuso meiótico e pouco condensados. A conjunção fuso meiótico não bipolar e cromossomas dispersos é a anomalia aparentemente menos grave e foi a

mais observada. Os diferentes estudos que fazem análise da integridade dos microtúbulos e alinhamento dos cromossomas também verificaram a existência de diferentes conjugações de danos. No entanto, as classificações atribuídas a cada dano são distintas de estudo para estudo, tal como o tipo de microscopia utilizada (fluorescência 2D ou confocal). Relativamente a este último ponto, há autores que defendem que a fluorescência 2D limita a análise das anomalias do fuso (Combelles & Chateau, 2012) e que também não está ainda perfeitamente definido o que será um fuso com ou sem anomalias dentro das diferentes conjugações que se vão observando (Combelles & Chateau, 2012). Apesar de tudo, um grupo de investigadores refere que em bebés nascidos de oócitos maturados *in vitro* não existe um aumento de anomalias fetais comparativamente com bebés concebidos por técnicas de reprodução medicamente assistida com oócitos maturados *in vivo* e bebés concebidos naturalmente (Liu *et al.*, 2014).

É importante referir uma vez mais que os oócitos utilizados no presente trabalho poderiam à partida ter a integridade do seu fuso e cromossomas comprometida, uma vez que não maturaram *in vivo*. Por outro lado, mesmo sem qualquer tipo de manipulação *in vitro* os oócitos e o seu fuso podem ser afetados por fatores como a idade (Combelles *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2011) e fatores de infertilidade como a endometriose (Sharma *et al.*, 2011). A incidência de aneuploidias nos oócitos é afetada pela idade materna sobretudo depois dos 35 anos (Coticchio *et al.*, 2013), mas em mulheres com idade superior a 30 anos, o número de oócitos obtidos e a taxa de formação e expansão de blastocistos diminuem. No que se refere especificamente ao fuso meiótico, 79% dos oócitos de mulheres com idade materna avançada têm anomalias no fuso e cromossomas comparativamente com 17% em mulheres jovens (Sharma *et al.*, 2011). Uma explicação possível pode ser o declínio da competência dos oócitos provocada pela diminuição dos mecanismos reguladores e reparadores de danos como resultado do stress oxidativo (Sharma *et al.*, 2011).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até ao momento parece que existe um maior número de estudos a concluírem que é mais benéfico realizar a maturação *in vitro* antes de vitrificar os oócitos (Cao *et al.*, 2009; Fasano *et al.*, 2012; Mohsenzadeh *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Contudo, é preciso ter em conta que nestes estudos a análise feita se baseia somente na maturação nuclear.

Há muito que a congelação lenta começou a ser substituída pela vitrificação. Estudos onde esta técnica foi aplicada na criopreservação de oócitos antes ou após maturação, mostraram todos eles que os danos ao nível do fuso eram causados pela criopreservação e não pela maturação *in vitro* (Boiso *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012). Com a vitrificação, o paradigma é completamente o oposto. Neste caso os autores defendem que os danos se devem à maturação *in vitro* e não à vitrificação (Lei *et al.*, 2014). Por isso, e tal como já se sabia a vitrificação é a técnica de criopreservação mais eficaz a evitar a ocorrência de danos provocados pela redução extrema das temperaturas (Vajta, 2000; Vajta & Kuwayama, 2006; Santos *et al.*, 2010). O gâmeta feminino é uma célula muito frágil e sensível a variações do meio em que se encontra, por mais pequenas que estas sejam (Fasano *et al.*, 2012; Coticchio *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013). Num oócito sujeito a condições inadequadas existe um elevado risco de despolimerização do seu fuso (estrutura celular particularmente sensível a baixas temperaturas; (Boiso *et al.*, 2002; Combelles, 2003; Coticchio *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013) e de outros componentes celulares deixarem de exercer a sua função (Combelles, 2003; Sharma *et al.*, 2013). A maturação *in vitro* pode ter efeitos nefastos ao nível da formação do fuso meiótico e do adequado alinhamento dos cromossomas (Christopikou *et al.*, 2010; Coticchio *et al.*, 2013), crescimento oocitário incompleto e maturação citoplasmática anormal, (Christopikou *et al.*, 2010) e a sua eficácia pode ser muito afetada por condições sub-óptimas do meio (Christopikou *et al.*, 2010; Fasano *et al.*, 2012). É importante ressaltar que as técnicas de maturação *in vitro* e vitrificação variam

significativamente com os níveis de prática, protocolos e condições laboratoriais (Combelles & Chateau, 2012). Contudo, e apesar de todas as dificuldades, o primeiro bebê concebido a partir de oócitos vitrificados após maturação *in vitro* nasceu em 2009 (Chian *et al.*, 2009) e que até ao momento estão documentados um total de 4 nados-vivos após aplicação conjunta destas técnicas (Combelles & Chateau, 2012).

V

- I INTRODUÇÃO
- II MATERIAL E MÉTODOS
- III RESULTADOS
- IV DISCUSSÃO
- V CONCLUSÕES**
- VI BIBLIOGRAFIA

Globalmente, os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que a maturação *in vitro* é mais eficaz quando os oócitos imaturos estão em metáfase I comparativamente com oócitos em prófase I e que a maturação *in vitro* de oócitos em metáfase I é mais eficaz quando realizada antes da vitrificação. Relativamente ao processo de vitrificação é de referir ainda que as taxas de sobrevivência de oócitos VG, MI e MII (maturados *in vitro*) não foram estatisticamente distintas ($p=0,121$) entre os três grupos testados. Os resultados permitem ainda concluir que, independentemente do momento em que a maturação *in vitro* foi realizada (pré ou pós vitrificação), os oócitos maturados *in vitro*, nos quais foi feita a análise da integridade do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomas, apresentavam todos danos a este nível. No entanto, é importante referir uma vez mais que os gâmetas utilizados neste estudo pertenciam a uma coorte de oócitos induzidos a maturar *in vivo* mas que não conseguiram maturar, podendo os danos ao nível do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomas serem pré-existentes.

Este trabalho é o resultado de um estudo muito preliminar. Num futuro próximo seria interessante numa primeira fase aumentar o número da amostra nos diferentes grupos e parâmetros testados de forma a obter resultados mais sólidos. Ainda nesta primeira fase seria benéfico substituir a microscopia 2D por microscopia confocal que permite ter uma noção tridimensional e, portanto mais clara e real das estruturas a analisar. Num segundo momento seria interessante fazer a análise de embriões resultantes de oócitos maturados *in vivo* e utilizados nas técnicas de reprodução assistida, que ficaram parados em determinada fase do seu desenvolvimento, de forma a perceber se estes danos verificados ao nível do fuso meiótico e cromossomas têm repercussão nos embriões ou se o oócitos têm capacidade de reparar estes danos. Por fim, seria necessário fazer análise da maturação citoplasmática “a fresco”, pré e pós vitrificação, nomeadamente pela análise da localização e funcionalidade das mitocôndrias, localização dos grânulos corticais e atividade de enzimas específicas do

metabolismo do oócito. Tal como já foi referido neste trabalho, a maturação citoplasmática é muitas vezes menosprezada, mas tem um papel fulcral na competência dos oócitos.

A maturação *in vitro* e vitrificação de oócitos são já uma realidade em alguns laboratórios de FIV e a tendência é para que este número suba consideravelmente nos próximos anos dado o aumento notável de mulheres em idade reprodutiva com necessidade de preservar a sua fertilidade. Para além disso, a maturação *in vitro* é uma mais valia em situações de utentes com ovários poliquísticos (uma vez que estas têm uma elevada predisposição para o desenvolvimento de uma hiperestimulação), para más respondedoras, com síndrome dos ovários resistentes, mulheres com endometriose e para doação de oócitos. A vitrificação para além da sua aplicabilidade na preservação da fertilidade e doação de oócitos, é também importante em situações em que a realização das técnicas de reprodução medicamente assistida não é possível pela falta de espermatozoides no dia da punção folicular ou em situações de hiperestimulação em que na impossibilidade da realização da transferência se criopreservam os gâmetas femininos, evitando questões éticas da criopreservação de um número elevado de embriões.

Tendo em conta que o presente estudo e outros semelhantes têm demonstrado que estas técnicas podem ter efeitos nefastos ao nível da integridade do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomas, outra tendência será a utilização de tecnologias, como o PolScope que permitem a visualização *in vivo* da integridade do fuso meiótico e, que portanto permitem a seleção de oócitos com fusos intatos para as técnicas de reprodução medicamente assistida.

VI

- I INTRODUÇÃO
- II MATERIAL E MÉTODOS
- III RESULTADOS
- IV DISCUSSÃO
- V CONCLUSÕES
- VI BIBLIOGRAFIA**

- Almeida V., Sousa A.P., Plancha C., Leal F., Figueiredo H., Silva J. (2012). Classificação da Qualidade Embrionária. In Orientações Técnicas em Medicina da Reprodução. Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. Lisboa. 119–139.
- Alviggi C, Humaidan P, Ezcurra D. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2012;**10**:9. BioMed Central Ltd.
- Anderson R a, Wallace WHB. Fertility preservation in girls and young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* [Internet] 2011;**75**:409–419.
- Ata B, Shalom-Paz E, Chian R-C, Tan SL. In vitro maturation of oocytes as a strategy for fertility preservation. *Clin Obstet Gynecol* [Internet] 2010;**53**:775–786.
- Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HW, Muasher SJ, Lanzendorf SE. Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation. *Hum Reprod* [Internet] 1995;**10**:1816–1820.
- Barrett SL, Albertini DF. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning and enhances developmental competence. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2010;**27**:29–39.
- Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* [Internet] 2002;**17**:1885–1891.
- Bos-Mikich A, Ferreira M, Höher M, Frantz G, Oliveira N, Dutra CG, Frantz N. Fertilization outcome, embryo development and birth after unstimulated IVM. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2011;**28**:107–110.
- Cao Y, Xing Q, Zhang Z-G, Wei Z-L, Zhou P, Cong L. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2009;**19**:369–373. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Cha K, Chian R. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. 1998;**4**:103–120.
- Chian R-C, Gilbert L, Huang JYJ, Demirtas E, Holzer H, Benjamin A, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril* [Internet] 2009;**91**:372–376. American Society for Reproductive Medicine.
- Christopikou D, Karamalegos C, Doriza S, Argyrou M, Sisi P, Davies S, Mastrominas M. Spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro in two different culture media. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2010;**20**:639–648. Reproductive Healthcare Ltd.
- Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH, Cha KY. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* [Internet] 2000;**73**:545–551.

- Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* [Internet] 2011;**96**:277–285.
- Combelles CMH, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. 2002;**17**:1006–1016.
- Combelles CMH, Chateau G. The use of immature oocytes in the fertility preservation of cancer patients: current promises and challenges. *Int J Dev Biol* [Internet] 2012;**56**:919–929.
- Combelles CMH. Distinct microtubule and chromatin characteristics of human oocytes after failed in-vivo and in-vitro meiotic maturation. *Hum Reprod* [Internet] 2003;**18**:2124–2130.
- Coticchio G, Guglielmo MC, Canto MD, Fadini R, Renzini MM, Ponti E De, Brambillasca F, Albertini DF. Mechanistic foundations of the metaphase II spindle of human oocytes matured in vivo and in vitro. 2013;**0**:1–12.
- Dinnyes A, Nedamble TL. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod.Fertil.Dev.*2009;**21**:45-59
- Donnez J, Dolmans M-M, Pellicer A, Diaz-Garcia C, Sanchez Serrano M, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril* [Internet] 2013;**99**:1503–1513.
- Escrich Laura, Grau Noelia, de los Santos María José, Romero Josep-Lluís PA and EM-J. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* [Internet] 2012;**98**:5.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF..Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 11 (7)
- Fasano G, Demeestere I, Englert Y. In-vitro maturation of human oocytes: before or after vitrification? *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2012;**29**:507–512.
- Fathalla M. Current challenges in assisted reproduction. In *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*. Vayena, R.P. editor. World Health Organization. 2002; 3-12
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes : Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. 2009;**71**:836–848.
- Fox S. Human Physiology. Décima Segunda Edição. McGraw-Hill, New York.2011
- Grynberg M, Hachem H El, Bantel A de, Benard J, Parco S le, Fanchin R. In vitro maturation of oocytes: uncommon indications. *Fertil Steril* [Internet] 2013;**99**:1182–1188. Elsevier Inc.

- Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RML. In vitro maturation of oocytes. *Br Med Bull* 2000;**56**:588–602.
- Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J Reprod Dev* [Internet] 2009;**55**:
- Huang JYJ, Buckett WM, Gilbert L, Tan SL, Chian R-C. Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: a case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* [Internet] 2007;**105**:542–544.
- Hurk R van den, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* [Internet] 2005;**63**:1717–1751.
- Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* [Internet] 2006;**86**:1037–1046.
- Junqueira L.C. e Carneiro J. *Histologia Básica*. Décima Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 2004.
- Katska-Ksiazkiewicz L., Alm H., Torner H., Helleil B., Tuchscherer A. RB. Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology* 2011;**75**:662–670.
- Lee J a, Barritt J, Moschini RM, Slifkin RE, Copperman AB. Optimizing human oocyte cryopreservation for fertility preservation patients: should we mature then freeze or freeze then mature? *Fertil Steril* [Internet] 2013;**99**:1356–1362. Elsevier Inc.
- Lee J a, Sekhon L, Grunfeld L, Copperman AB. In-vitro maturation of germinal vesicle and metaphase I eggs prior to cryopreservation optimizes reproductive potential in patients undergoing fertility preservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet] 2014;**26**:168–173.
- Lei T, Guo N, Liu J-Q, Tan M-H, Li Y-F. Vitrification of in vitro matured oocytes: effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet] 2014;**7**:1159–1165.
- Leibo S.P., Picton H.M., Gosden R.G. Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*. Vayena, R.P. editor. World Health Organization. 2002; 152-166.
- Liu S, Li Y, Gao X, Yan J-H, Chen Z-J. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril* [Internet] 2010;**93**:1550–1555. Elsevier Ltd.
- Malter H.E. e Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. In *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction*. Vayena, R.P. editor. World Health Organization. 2002; 134–139.
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2014;**28**:284–299. Reproductive Healthcare Ltd.

- Mohsenzadeh M, Khalili MA, Nazari S, Jahromi VH, Agharahimi A, Halvaei I. Effect of vitrification on morphology and in-vitro maturation outcome of human immature oocytes. *Ital J Anat Embryol* [Internet] 2012;**117**:190–198.
- Nishi Y., Takeshita T., Sato K., Araki T. Change of the Mitochondrial Distribution in Mouse Ooplasm During In Vitro Maturation. *J.Nippon Med. Sch.*2003;**70**:408-415
- Noyes N, Labella PA, Grifo J, Knopman JM. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. *J Assist Reprod Genet* [Internet] 2010;**27**:495–499.
- Picton H., Briggs D., Gosden R. The molecular basis of oocytes growth and development. *Mol. Cel. Endocrinol.*1998; **145**: 27-37
- Registo oncológico 2010.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* [Internet] 2009;**15**:553–572.
- Sampaio M.G., Tavares A., Pinto G., Nunes J., Dantas S. Classificação da Qualidade Embrionária. In Orientações Técnicas em Medicina da Reprodução. Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. Lisboa. 2012; 33-49
- Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF. Meiotic spindle morphogenesis in vivo and in vitro matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmic quality. 2004;**19**:2889–2899.
- Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2010;**122**:151–163. Elsevier B.V.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* [Internet] 2011;**141**:1–19.
- Sharma RK, Azeem A, Agarwal A. Spindle and chromosomal alterations in metaphase II oocytes. *Reprod Sci* [Internet] 2013;**20**:1293–1301.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonc PB, Wolf E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture 1. 2001;**909**:904–909.
- Sutton ML. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* [Internet] 2003;**9**:35–48.
- Tang-Pedersen M., Westergaard L G., Erb k., Mikkelsen A L. Combination of IVF and IVM in naturally cycling women. *Repro. Biomed. Online.*2012;**24**:47-53

- Tanghe S, Soom A Van, Nauwynck H, Coryn M, Kruif A de. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* [Internet] 2002;**61**:414–424.
- Tomasi-Cont N, Lambertini M, Hulsbosch S, Peccatori AF, Amant F. Strategies for fertility preservation in young early breast cancer patients. *Breast* [Internet] 2014;1–8 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934638>.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Hölker M, Tomek W, Phatsara C, Alm H, Sirard M-A, Kanitz W, Schellander K, *et al*. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction* [Internet] 2008;**135**:197–212.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001;**12**:51–75.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* [Internet] 2006;**65**:236–244.
- Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2000;**60-61**:357–364.
- Versieren K, Heindryckx B, O'Leary T, Croo I De, Abbeel E Van den, Gerris J, Sutter P De. Slow controlled-rate freezing of human in vitro matured oocytes: effects on maturation rate and kinetics and parthenogenetic activation. *Fertil Steril* [Internet] 2011;**96**:624–628.
- Voronina E, Wessel GM. The regulation of oocyte maturation. *Curr Top Dev Biol* [Internet] 2003;**58**:53–110.
- Walls M, Junk S, Ryan JP, Hart R. IVF versus ICSI for the fertilization of in-vitro matured human oocytes. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2012;1–5. Reproductive Healthcare Ltd. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23063820>.
- Wang H, Racowsky C, Combelles CMH. Is it best to cryopreserve human cumulus-free immature oocytes before or after in vitro maturation? *Cryobiology* [Internet] 2012;**65**:79–87. Elsevier Inc.
- Wiser A, Son W-Y, Shalom-Paz E, Reinblatt SL, Tulandi T, Holzer H. How old is too old for in vitro maturation (IVM) treatment? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet] 2011;**159**:381–383.
- World Health Organization (2012). <http://www.who.int/en/> (acedido a 30/01/2014).
- Zhang Z, Liu Y, Xing Q, Zhou P, Cao Y. Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by in vitro maturation: vitrification is superior to the slow freezing method. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet] 2011;**9**:156. BioMed Central Ltd.