

Alvaro Petracco

Criopreservação Oocitária: Desempenho
Reprodutivo na Fertilização Assistida

São José do Rio Preto
2006

Alvaro Petracco

Criopreservação Oocitária: Desempenho
Reprodutivo na Fertilização Assistida

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Doutor no Curso
de Pós-graduação em Ciências da
Saúde, Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Hélio Oliani

São José do Rio Preto
2006

Petracco, Alvaro

Criopreservação oocitária: desempenho reprodutivo na fertilização assistida / Álvaro Petracco

São José do Rio Preto, 2006

98 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Antonio Hélio Oliani

1. Fertilização *in vitro*; 2. Oócitos; 3. Criopreservação; 4. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide; 5. Técnica de reprodução assistida.

SUMÁRIO

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabela e Quadro.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução	01
1.1. Objetivos	05
1.1.1. Gerais	05
1.1.2. Específicos	05
2. Revisão da Literatura	06
3. Casuística e Método	18
3.1. Delineamento	19
3.2. População e Amostra	19
3.2.1. População.....	19
3.2.2. Amostra	19
3.3. Protocolos de Criopreservação de Oócitos	21
3.3.1. Soluções de Estoque.....	21
3.3.2. Programa de Congelamento de Oócitos.....	24
3.3.3. Programa de Descongelamento de Oócitos	25

3.3.4.	Programa de Congelamento de Embriões.....	26
3.3.5.	Programa de Descongelamento de Embriões.....	27
3.4.	Curvas de Congelamento.....	28
3.4.1.	Curva de Congelamento de Oócito	28
3.4.2.	Curva de Congelamento de Embriões.....	29
3.5.	Pareamento da Amostra	30
3.5.1.	Variáveis Analisadas	31
3.5.1.1.	Sobrevivência dos Oócitos e Embriões	31
3.5.1.2.	Taxa de Fertilização.....	32
3.5.1.3.	Clivagem Embrionária.....	34
3.5.1.4.	Qualidade Embrionária	34
3.5.1.5.	Taxa de Gravidez	37
3.5.1.6.	Taxa de Implantação Embrionária	37
3.6.	CrITÉrios de Inclusão.....	37
3.7.	CrITÉrios de Exclusão	38
3.8.	Análise Estatística	38
4.	Resultados e Discussão	39
4.1.	Análise do Grupo de Mulheres Submetidas a Congelamento de Oócitos (GO): Comparação dos Oócitos Inseminados após a Folículo-Aspiração ou “A Fresco” (GO _f), ou após o Congelamento e Descongelamento (GO _c) quanto às Taxas de Fertilização, Clivagem e Qualidade Embrionária.....	40
4.1.1.	Comparação quanto à Taxa de Fertilização Normal e a Taxa de Clivagem Embrionária	40

4.1.2. Comparação quanto à Qualidade Embrionária.....	43
4.2. Análise do Grupo de Mulheres que Congelaram Óvulos (GOc) ou Embriões (GE): Comparação das Taxas de Sobrevivência de Ambos após o Descongelamento e das Taxas de Gravidez e Implantação Embrionária entre os Embriões Oriundos dos Diferentes Grupos...	52
4.1.3. Comparação quanto às Taxas de Sobrevivência	53
4.1.4. Comparação quanto às Taxas de Gravidez Clínica e Implantação Embrionária.....	57
5. Conclusões	62
5.1. Quanto às Taxas de Fertilização, Clivagem e Qualidade Embrionária.....	63
5.2. Quanto às Taxas de Sobrevivência ao Descongelamento.....	63
5.3. Quanto às Taxas de Gravidez e Implantação	63
6. Referências Bibliográficas.....	64
7. Apêndices	89

*À memória de meu pai, Dr. Admar Petracco,
que literalmente me pegou pela mão e
conduziu-me pelo maravilhoso mundo da
Medicina; e ao Dr. João Michelin, mais que
um companheiro de trabalho, um amigo, que
não tem a menor idéia do quanto tenho
aprendido com ele.*

Agradecimentos

- ✓ Devo agradecer a todos que têm possibilitado meu trabalho como médico, porque esta é uma tese que eu, de fato, jamais escreveria sem ajuda de um grande número de pessoas, por assim dizer, excepcionais, que guiaram esta minha neófito ousadia de conhecer o desconhecido e ajudaram a dar-lhe forma e sentido.
- ✓ Por não encontrar critério melhor, enumero agora por ordem alfabética aqueles que de forma especial contribuíram para o processo:
- ✓ Antonio Hélio Oliani, pessoa estelar, por seu apoio incondicional, seu conhecimento e todas as observações e sugestões estimulantes.
- ✓ Christine Heckmann, minha mulher, por tudo.
- ✓ Denise Vaz Oliani, por seu apoio sempre espontâneo, desde o início deste trabalho.
- ✓ Domingos Braile, por seu prazer contagiante na arte de ensinar.
- ✓ Equipe Fertilitat, pela ajuda incondicional em todos os momentos da minha vida profissional.

- ✓ Fabiana Godoy, José Antonio Silistino e Rosimeire Desidério pelo apoio e presteza irrestrita nos trâmites da pós- graduação.
- ✓ João Michelin, pelo seu apoio entusiástico e não solicitado desde sempre.
- ✓ Lílian Okada, pelo auxílio na busca de dados e informações laboratoriais e seu precioso cuidado com os oócitos.
- ✓ Mariangela Badalotti, pelo companheirismo no trabalho diário no Fertilitat e incentivo em realizar este trabalho.
- ✓ Reinaldo Azoubel, por seu apoio e estímulo para a realização desta tarefa.
- ✓ Ricardo Azambuja, por me introduzir e ensinar sobre enigmática ciência da criobiologia.
- ✓ Vanessa, Rafaella e Catarina, minhas filhas, por me fazerem pensar.

“A verdadeira viagem de descobrimento, não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos.”

Marcel Proust

Lista de Figuras

Figura 1.	Aspecto morfológico do oócito submetido ao efeito das soluções; A – Oócito a fresco pré congelamento; B – Oócito submetido às soluções para congelamento: observar a retração do ooplasma.....	25
Figura 2.	Aspecto morfológico do oócito pós descongelamento: observar a recuperação da sua forma original.....	26
Figura 3.	Aspecto morfológico do embrião submetido ao efeito das soluções; A – Embrião pré congelamento; B – Embrião submetido às soluções para congelamento: observar a integridade de seus blastômeros.....	27
Figura 4.	Embrião pós-descongelamento mantendo a integridade blastomérica e sua morfologia original.....	28
Figura 5.	Dados da curva computadorizada de congelamento de oócitos.....	29
Figura 6.	Dados da curva computadorizada de congelamento de embriões.....	30
Figura 7.	Oócito inviável após o descongelamento. Observar o aspecto granular e o escurecimento do citoplasma.....	32
Figura 8.	Embrião degenerado após o descongelamento. Observar a rotura da maioria do seus blastômeros e sua intensa fragmentação.....	32
Figura 9.	Oócito fertilizado de forma normal apresentando os dois pronúcleos no centro do ooplasma, e os dois corpúsculos polares na periferia à esquerda.....	33

Figura 10.	Oócito fertilizado de forma anormal. Observa-se a presença de três pronúcleos.....	33
Figura 11.	Embrião com dois blastômeros.....	34
Figura 12.	Embrião com fragmentação citoplasmática.....	35
Figura 13.	Embrião com quatro blastômeros simétricos.....	35
Figura 14.	Embrião com dois blastômeros assimétricos.....	35
Figura 15.	Velocidade de clivagem normal: A – Embrião às 24 horas; B – Embrião às 48 horas; C – Embrião às 72 horas.....	35
Figura 16.	Comparação gráfica das taxas de fertilização normal e clivagem embrionária em oócitos inseminados após o descongelamento ou a fresco.....	41
Figura 17.	Qualidade dos embriões resultantes da inseminação de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial.....	44
Figura 18.	Média e mediana de fragmentação citoplasmática entre embriões oriundos de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial.....	45
Figura 19.	Comparação gráfica da velocidade das clivagens dos embriões oriundos de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial.....	46
Figura 20.	Representação gráfica da viabilidade oocito-embrionária após descongelamento.....	53

Lista de Tabela e Quadro

Tabela 1.	Comparação das taxas de gravidez clínica e implantação embrionária entre mulheres com embriões procedentes de descongelamento oocitário ou embrionário.....	57
Quadro 1.	Graduação morfológica de embriões humanos cultivados <i>in vitro</i> , segundo critérios da REDLARA modificada.....	36

Lista de Abreviaturas e Símbolos

a-GnRH	- Análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CO₂	- Gás Carbônico
DMSO	- Dimethyl Sulfoxide
EG	- Etileno Glicol
ES	- Efeito das Soluções
FIV	- Fertilização <i>in vitro</i>
G	- Glicerol
GE	- Grupo Embriões
GO	- Grupo Oócito
GOc	- Grupo Oócitos Congelados
GOf	- Grupo Oócitos Frescos
HCG	- Gonadotrofina Coriônica Humana
HMG	- Gonadotrofina Menopáusica Humana
HTF	- Human Tubal Fluid
ICSI	- Injeção Intracitoplasmática de espermatozóides
LN2	- Nitrogênio Líquido
M	- Molar
MII	- Metáfase II

- MP** - Membrana Pelúcida
- °C/min** - Grau centígrado por minuto
- PBS** - Solução Tamponada de Fosfato
- PrOH** - Propanodiol
- PUCRS** - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
- RA** - Reprodução Assistida
- rFSH** - Hormônio Recombinante Folículo Estimulante
- SFB** - Soro Fetal Bovino
- SSS** - Serum Substitute Supplement
- β-HCG** - Unidade Beta da Gonadotrofina Coriônica Humana

O avanço da Fertilização *in vitro* (FIV) fez surgir alguns dilemas que forçaram a profundas reflexões, dentre os quais se destaca o questionamento sobre o destino dos embriões excedentes originados desta tecnologia. Tendo em vista a polêmica observada nas diversas culturas quanto às questões éticas, morais, religiosas, políticas e científicas, relacionadas a esta situação embaraçosa, tornou-se necessário o desenvolvimento de mecanismos que pudessem solucionar ou amenizar as controvérsias; desse modo, técnicas de criopreservação oocitária foram criadas e aperfeiçoadas para acondicionar de forma viável o material genético não-fertilizado. A pesquisa buscou avaliar o desempenho reprodutivo de mulheres submetidas às técnicas de Reprodução Assistida pela técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) a partir de oócitos criopreservados. Um grupo de dezesseis mulheres (GO) coletou 362 oócitos, dos quais 204 (GO_f) foram destinados à fertilização pela técnica de ICSI após a foliculoaspiração (a fresco), e os demais (158) foram congelados – destes, os que sobreviveram (99) ao posterior descongelamento (GO_c) também foram fertilizados. O segundo grupo (GE), formado por 32 mulheres, teve seus embriões excedentes congelados e posteriormente descongelados (117). Nas mulheres do GO, foram realizadas comparações quanto às taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária entre o GO_f e GO_c. Para o grupo GE, foram feitas comparações com embriões originados de oócitos descongelados quanto às taxas de sobrevivência ao descongelamento, de implantação embrionária e gravidez clínica. Na análise foram incluídas

mulheres abaixo de 40 anos, excetuando-se aquelas com fator imunológico ou uterino, más respondedoras e pertencentes a programa de ovodoação. Foram usados testes estatísticos do Qui-quadrado, Exato de Fisher, Risco relativo e Mann-Whitney. Na comparação das taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária entre os oócitos do GOf e GOc, não foram observadas diferenças significativas ($p=0,59$; $p=0,56$ e $p=0,21$ respectivamente). No que se refere à velocidade de clivagem adequada, os embriões oriundos do GOc exibiram significativo retardo na velocidade das divisões celulares, comparada àqueles procedentes do GOf. Houve diferença significativa na comparação das taxas de sobrevivência entre embriões do GE e os oócitos do GOc: enquanto estes últimos tiveram 37,3% de inviabilidade após o descongelamento, os primeiros apresentaram apenas 22,4% ($p=0,01$). Quando se compararam as taxas de implantação embrionária e gravidez clínica entre embriões oriundos do GE e do GOc, nos dois eventos avaliados não houve diferença significativa ($p=0,06$ e $p=0,20$ respectivamente). A presente pesquisa mostra que o desempenho reprodutivo das mulheres submetidas à FIV com oócitos criopreservados ou a fresco é semelhante na maioria dos aspectos analisados. Com base nos resultados, o estudo sugere a criopreservação oocitária como alternativa ao congelamento e à estocagem de embriões humanos.

Palavras-Chave: 1. Fertilização *in vitro*; 2. Oócitos; 3. Criopreservação; 4. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide; 5. Técnicas de reprodução assistida.

The advance of in vitro fertilization (IVF) caused the emergence of a few dilemmas that forcibly led to deep reflections, standing out among these the questioning about the destination of excess embryos originated from this technology. In view of the controversy observed in several cultures as to ethic, moral, religious, political and scientific issues related to this embarrassing situation, it became necessary to develop mechanisms that can solve or soften the controversies; thus, oocyte cryopreservation techniques were created and improved to store in a viable way unfertilized genetic material. The research sought to assess the reproductive performance of women subjected to assisted reproduction techniques by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of spermatozoa from cryopreserved oocytes. A group of 16 women (GO) collected 362 oocytes, of which 204 (GO_f) were fertilized by the ICSI technique after fresh follicle aspiration, and the remaining (158) were frozen; of these, the ones that survived (99) to subsequent thawing (GO_c) were also fertilized. The second group (GE), formed by 32 women, had its excess embryos frozen and subsequently thawed (117). In the GO group, comparisons were carried out for rates of fertilization, cleavage and embryo quality between GO_f and GO_c. For the GE group, comparisons were made with embryos originated from thawed oocytes for rates of thawing survival, embryo implant and clinical pregnancy. In the analysis, women under 40 years old were included, except for those with immune or uterine factor, bad responders and participants in the oocyte donation program. The statistical tests Chi-Square, Fisher's exact test, Relative Risk, and Mann-Whitney were employed. In the comparison for fertilization,

cleavage and embryo quality rates between GOf and GOc oocytes, no significant differences were observed ($p=0.59$, $p=0.56$ and $p=0.21$, respectively). Regarding an adequate cleavage speed, embryos from GOc showed a significant delay in the speed of cell division as compared to those from GOf. There was a significant difference in the comparison of survival rates between GE embryos and GOc oocytes; while the latter had 37.3% of inviability after thawing, the former had only 22.4% ($p=0.01$). When embryo implantation and clinical pregnancy rates were compared between GE and GOc embryos, no significant difference was observed in the two events ($p=0.06$ and $p=0.20$, respectively). The present study shows that the reproductive performance of women subjected to in vitro fertilization with cryopreserved or fresh oocytes is similar in most analyzed aspects. Based on the results, the study suggests oocyte cryopreservation as an alternative to thawing and storage of human embryos.

Key-Words: 1. *In vitro* fertilization; 2, Oocytes; 3, Cryopreservation; 4, Intracytoplasmic sperm injection; 5, Assisted reproduction techniques

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em tempos modernos, em que a evolução do conhecimento é entusiástica e o imaginário é cada vez mais real, a reprodução assistida avança em tecnologia e eficiência, permitindo que o sonho da concepção, quando naturalmente lesado, possa acontecer, saindo da utopia para uma realidade vivida intensamente.

Passados quase três décadas do primeiro nascimento humano resultante da Fertilização *in vitro* (FIV), diversos avanços e refinamentos nas técnicas têm sido implementados. Criada inicialmente para tratar mulheres com fator tubário grave, a FIV passou a ser indicada para outras formas de infertilidade que não respondiam às terapias convencionais, tornando-se, com isso, progressivamente popular.

Na infertilidade masculina, há pouco mais de uma década, criaram-se diferentes maneiras para auxiliar o espermatozóide a atravessar a zona pelúcida, dentre as quais sobressai-se a *intracytoplasmic sperm injection* ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide – ICSI, por sua alta efetividade.⁽¹⁾ A técnica permite a introdução mecânica do espermatozóide diretamente no ooplasma oocitário, podendo tratar com efetividade casos considerados insolúveis até então; homens que eram candidatos a utilizar sêmen de doadores passam a desfrutar da paternidade geneticamente conservada.

O domínio da FIV fez surgir, também, alguns dilemas que forçaram a profundas reflexões; dentre eles, destaca-se o questionamento sobre o destino

dos embriões excedentes originados destas tecnologias. A polêmica, observada nas diversas culturas quanto às questões éticas, morais, religiosas, políticas e científicas – todas relacionadas a esta situação embaraçosa – tornou necessário o desenvolvimento de mecanismos que pudessem solucionar ou amenizar as controvérsias. Técnicas de criopreservação embrionária foram criadas e aperfeiçoadas para acondicionar por tempo indeterminado e de forma viável os embriões excedentes.

O congelamento de embriões tornou-se técnica fundamental em reprodução assistida (RA), permitindo a transferência para o útero de número adequado de embriões; além disso, favoreceu a redução da chance de gestação múltipla,⁽²⁾ evitou a necessidade de re-estimulação ovariana na transferência de embriões descongelados, amenizou o risco da síndrome de hiperestimulação ovariana⁽³⁾ e ajustou os fatores endometriais que pudessem comprometer as chances de gravidez.

De outra parte, o excesso de embriões congelados reacendeu novos questionamentos. O que fazer com estes embriões? Que destino dar-lhes quando passam a ser renegados pelos progenitores, ou mesmo quando estes venham a faltar?

Atualmente, isso representa um problema relevante para as clínicas que utilizam técnicas de RA. Independente do consentimento livre e esclarecido sobre o destino dos mesmos, a resolução do Conselho Federal de Medicina sob o número 1.358/92 é restritiva e sugere como alternativa a manutenção dos embriões sob congelamento por tempo indeterminado ou a doação dos mesmos.⁽⁴⁾ A lei de biossegurança n.º 11.105, de 23.03.2005, aprovada

recentemente, que dispõe no seu artigo 5º a possibilidade de doação de embriões congelados há três anos ou mais para pesquisa, tenta amenizar o problema; porém, faz reavivar outras grandes discussões e cria mais dilemas.⁽⁵⁾

No Brasil, a casuística real é desconhecida; porém, dados da Red Latinoamericana de Reproducción Asistida⁽⁶⁾ do ano de 2002 apontaram 12790 transferências de embriões a fresco e 1677 de embriões congelados. Esses dados fazem supor a existência de um grande número de embriões excedentes, visto que aproximadamente 40% dos ciclos de FIV geram embriões para congelamento. Ao considerar-se uma média de congelamento de dois embriões por ciclo e o tempo que a técnica está disponível no nosso meio, concluiu-se que os números são preocupantes.

Assim, permeada por vasta controvérsia, a ciência avança e suscita o interesse pela criopreservação de oócitos, que já em 1986 fez surgir o primeiro nascimento com o uso da técnica. O subsequente aprimoramento desta arte veio acalentar as polêmicas que cingiram o congelamento de embriões⁽⁷⁾ e novas indicações, como a preservação da capacidade reprodutiva de mulheres jovens com perda precoce da função ovariana, das pacientes que necessitem tratamento oncológico,⁽⁸⁾ ou mesmo para aquelas que apenas desejam postergar a época de ter filhos para uma fase tardia da vida reprodutiva, em que naturalmente a chance seria extremamente baixa, dado o efeito deletério do envelhecimento sobre a função gonadal.

Pela relevância que o armazenamento de material genético fertilizado em clínicas de reprodução humana assume e a crescente preocupação com a preservação da fertilidade em tempos modernos, a criopreservação de oócitos

vem despertando interesse internacional, especialmente no que se refere ao aprimoramento da técnica para melhor sobrevivência celular. Direciona-se, pois, esta pesquisa no sentido de avaliar o desempenho reprodutivo de mulheres submetidas a congelamento de oócitos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Geral

Avaliar o desempenho reprodutivo de mulheres submetidas à técnica de RA, cujos óvulos foram congelados e, posteriormente descongelados, submetendo-os à fertilização através da ICSI.

1.1.2. Específicos

No grupo de mulheres submetidas a congelamento de oócitos, comparar:

- as taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária entre os oócitos submetidos a ICSI, imediatamente após a aspiração folicular com aqueles injetados após seus descongelamentos.

Na avaliação dos grupos de mulheres submetidas a congelamento de oócitos e de embriões, comparar:

- as taxas de sobrevivência dos oócitos e embriões após os seus descongelamentos;
- as taxas de gravidez e implantação dos embriões descongelados e dos embriões originados da fertilização dos oócitos descongelados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

O sucesso na criopreservação celular envolve um grande número de variáveis e exige profundo conhecimento das alterações biofísicas ali processadas. Os fenômenos deflagrados pela ação física e química podem ser letais para as células, ou afetar gravemente sua integridade funcional.

A base dos estudos para o congelamento oocitário é espelhada no domínio atual da criopreservação de embriões humanos. Os trabalhos pioneiros na criopreservação de embriões animais,^(9,10) realizados no início da década de 70, serviram de base para o propósito humano. Em 1983, Trounson & Mohr⁽¹¹⁾ foram capazes de demonstrar, de forma inédita, a eficácia da técnica de congelamento e descongelamento de embrião humano, fertilizado e cultivado *in vitro*, resultando no nascimento de uma criança saudável. Desde então, diferentes protocolos vêm sendo aprimorados, para que as chances de sucesso e a segurança do método sejam cada vez melhores.

A taxa de sobrevivência embrionária ao descongelamento é diretamente proporcional à qualidade dos embriões e ao seu estágio de desenvolvimento no pré-congelamento; embriões de alta qualidade sobrevivem com muito mais eficiência.⁽¹²⁾ No estágio de pronúcleo, a sobrevivência varia de 68% a 74%; quando clivados, varia entre 60% e 77%.^(13,14)

O acompanhamento da clivagem embrionária depois do descongelamento é um importante fator preditivo de sua viabilidade.⁽¹⁵⁾

A técnica para congelamento oocitário apresenta peculiaridades pela alta complexidade celular destes; são células grandes e altamente especializadas,

que apresentam uma série de detalhes no seu desenvolvimento até a metáfase II.

Apesar de haver relatos isolados de gestação com oócitos congelados,^(7,16,17) os índices globais de sucesso na sobrevivência ao descongelamento e à gravidez, inicialmente reportados, foram muito baixos, desencorajando a criopreservação de oócitos como rotina clínica.⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Hoje, com mais de 150 nascimentos catalogados e ausência de anormalidades cromossômicas, o método tornou-se um procedimento seguro e de crescente aplicabilidade.⁽²¹⁾ Há poucos anos, Porcu *et al.*⁽²²⁾ reforçaram o estudo de Gook⁽²¹⁾ ao reportarem os nascimentos de 13 crianças sem alterações cromossômicas, utilizando oócitos congelados.

Os oócitos mostram-se mais vulneráveis ao choque térmico do que os embriões. Johnson *et al.*⁽²³⁾ foram capazes de demonstrar que oócitos congelados de camundongo apresentaram menor taxa de fertilização, mas suas evoluções até blastocisto são semelhantes, quando comparados com oócitos frescos fertilizados.

Chen⁽⁷⁾ demonstrou taxas de sobrevivência oocitária e fertilização após o descongelamento de 75%, além de clivagem até 6 a 8 células em 60% dos embriões. Por outro lado, Mandelbaum *et al.*⁽²⁴⁾ reportaram, em 1988, uma taxa de sobrevivência de até 37%, e de fertilização de 32%. Porcu *et al.*⁽²⁵⁾ e Yang⁽²⁶⁾ demonstraram resultados semelhantes usando óvulos frescos ou congelados.

O princípio básico dos protocolos de congelamento é induzir a formação de gelo exclusivamente no meio extracelular. O resfriamento intracelular deve ocorrer sem a formação de cristais; para tanto, há uma combinação entre os

solutos usados para o equilíbrio osmótico e o tempo de congelamento. O aumento da concentração de solutos extracelular favorece a saída da água do espaço intracelular, processo conhecido como efeito das soluções (ES), prevenindo a formação de gelo neste local. O tempo de resfriamento deve ser suficientemente lento para permitir a saída de água antes que ocorra a formação de gelo; porém, como consequência da baixa velocidade, as células são expostas, por tempo demasiado, às altas concentrações de sais, o que pode desestabilizar as membranas celulares.

Os sais de sódio presentes em todas as soluções crioprotetoras e meios de cultura celular contribuem significativamente, através de seus íons, para o ES durante o processo de resfriamento e aquecimento dos embriões. As altas concentrações de sódio, resultantes deste processo, podem ser incompatíveis com o funcionamento normal das células pelo grave comprometimento à sua integridade funcional.^(27,28) No que se refere ao congelamento de oócitos, as baixas concentrações de sódio apresentam melhores resultados do que as soluções com concentração tradicional.⁽²⁷⁾

Os íons da colina, ao contrário do sódio, não atravessam a membrana celular, o que evita a alta concentração de cátions dentro da célula. Por sua provável relação na síntese dos fosfolipídios da membrana celular, tem sido proposta uma possível função protetora sobre essa membrana.⁽²⁹⁾ A substituição do sódio pela colina parece minorar o estresse osmótico.⁽²⁷⁾

Em verdade, a eficácia do processo de congelamento depende basicamente de três fatores: da substância crioprotetora, das curvas de

resfriamento e do posterior descongelamento e, especialmente, da complexidade do elemento a ser congelado, seja ele célula ou tecido.

Com relação aos crioprotetores, o glicerol (G), inicialmente utilizado para o congelamento seminal, passou a ser aplicado na criopreservação de embriões por apresentar baixa permeabilidade à membrana celular. O etileno glicol (EG), o 1,2-propanodiol (PrOH) e o dimethyl sulfoxide (DMSO) são mais permeáveis e têm sido utilizados com bastante sucesso na proteção das células embrionárias contra baixas temperaturas.⁽³⁰⁾ O EG parece ser o mais efetivo crioprotetor do grupo glicol (etileno, dietileno, trieleno, propileno e polietileno).

Os estudos de Miyamoto & Ishibashi⁽³¹⁾ puderam demonstrar que o EG foi mais eficiente que o DMSO para proteger o embrião de camundongo durante o processo de congelamento. Outro trabalho de Miyamoto,⁽³²⁾ em 1986, utilizando o EG em embriões de camundongo, conseguiu uma taxa de sobrevivência ao descongelamento de 86%. Resultados semelhantes também foram obtidos com blastocistos de ovelhas,⁽³³⁾ e mostraram-se mais efetivos em embriões de bovinos quando comparado à solução contendo glicerol.⁽³³⁾ Voekel & Hu⁽³⁴⁾ observaram que 70% de embriões bovinos congelados em EG e re-hidratados diretamente em phosphate buffered solution ou solução tamponada de fosfato – PBS – eram viáveis 72 horas após descongelamento; por outro lado, quando utilizado o propileno glicol, DMSO e G, o percentual foi respectivamente 11%, 25% e 30%.

A temperatura do meio onde o crioprotetor é adicionado pode afetar a sobrevivência dos embriões. Exemplo disso foi demonstrado por Kasai *et al.*⁽³⁵⁾

ao observarem que a remoção do DMSO a 37°C em mórulas de camundongos resultou em 70% de evolução embrionária, enquanto apenas 37% tiveram evolução quando o DMSO foi removido a 0°C. Pouco mais tarde, os mesmos autores⁽³⁶⁾ demonstraram que as mórulas de camundongos apresentavam baixa taxa de desenvolvimento até blastocisto, quando os embriões eram mantidos em G ou EG e removidos tanto a 20°C quanto a 0°C.

A adição e a remoção das substâncias crioprotetoras são pontos-chaves para o sucesso da sobrevivência embrionária e obtenção de gestação. Nos protocolos iniciais de adição de crioprotetor, denominados de “step-wise”, esse processo era conduzido entre quatro e seis etapas, para evitar mudanças abruptas no volume dos embriões.⁽³⁷⁾ Procedimento em duas ou três etapas foram propostos mais tarde, sem comprometer a sobrevivência embrionária.^(38,39) O processo evoluiu para o chamado “one-step”, que consiste na adição do crioprotetor em uma única etapa, possibilitando resultados animadores com simplificação da técnica; nesse protocolo, os embriões são transferidos de uma solução de PBS para uma solução contendo o crioprotetor.⁽³⁴⁾ Em ambos os protocolos, puderam ser demonstradas excelentes taxas de sobrevivência embrionária em embriões de bovinos e de camundongos.^(35,40,41)

O uso de soluto não permeável é fundamental para a remoção da substância crioprotetora. Para manter a osmolaridade externa e evitar o afluxo de água para o interior do embrião e o seu intumescimento, foi sugerido por alguns autores^(42,43) o uso de composto não-permeável à base de sacarose com a intenção de manter constante a osmolaridade externa e o equilíbrio no

deslocamento da água através das membranas celulares. Com o uso da sacarose,⁽⁴⁴⁾ índices de 60,5% de viabilidade embrionária em ratos puderam ser demonstrados.

A combinação específica das curvas de resfriamento e reaquecimento exerce influência ímpar na sobrevivência embrionária. A curva ideal de resfriamento deve permitir o encolhimento gradual do embrião enquanto a água intracelular flui para fora da célula. Quando a curva for demasiadamente lenta, pode haver o rompimento da organização interna da célula, o que comprometerá o seu metabolismo. De modo contrário, o citoplasma não terá tempo hábil para desidratar-se, levando à ruptura da membrana celular.⁽⁴⁵⁾ No descongelamento, a sobrevivência e o potencial de desenvolvimento embrionário precisam ser preservados para assegurar uma probabilidade positiva de implantação e gravidez, nesse sentido, a qualidade embrionária antes do congelamento exerce fator deliberativo.

A técnica crioterapêutica com resfriamento lento propõe que a temperatura baixe menos de um grau centígrado por minuto ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), até atingir uma temperatura de -60°C , para depois ser armazenado em nitrogênio líquido (LN2) a -196°C . Quando submetido ao descongelamento, a curva de temperatura também deve ser lenta, com um gradiente que não supere os $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ou em geral próximo dos $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.⁽⁴⁶⁾

Tendo em vista o tempo e trabalho gasto com esse tipo de curva, a alternativa menos íngreme é o processo denominado “método rápido-morno”, que apresenta como base o resfriamento lento, até atingir cifras entre -25°C e -40°C para depois ser transferido para o NL2. Da mesma forma, o

descongelamento é também considerado rápido, pois as curvas atingem níveis de 300°C/minuto ou 5°C/segundo.^(47,48)

Nos serviços que disponibilizam essa tecnologia, há uma tendência de se utilizar o protocolo de congelamento que imerge os embriões em NL2 entre -25°C e -40°C após terem sido submetidos a uma curva de refrigeração lenta de 0,1°C a 0,5°C/min. O descongelamento deve acontecer em temperatura de 30°C a 37°C até que todo o gelo desapareça.⁽⁴⁹⁾ Utilizando essa técnica, Chupin *et al.*⁽⁴⁰⁾ obtiveram uma taxa de gravidez de 41%.

Quando se processa o congelamento embrionário, esse é exposto a uma solução de alta osmolaridade que, pela diferença de pressão osmótica, determina a saída da água intracelular para restaurar o equilíbrio osmótico; neste momento, o embrião retrai-se. A substância crioprotetora empregada difunde-se para o interior da célula, estabilizando o volume original do embrião.⁽⁵⁰⁾ A permeabilidade do embrião e as modificações volumétricas no seu tamanho são moduladas pelo crioprotetor. Existe a necessidade de que esse fenômeno ocorra de forma lenta e gradativa para se evitar o chamado choque osmótico, onde fatalmente ocorrerá lesão celular por intumescimento rápido, muito além do limite tolerável.⁽³³⁾

O impacto que o processo de criopreservação pode ter sobre o embrião está creditado na qualidade morfológica que o mesmo possuía antes do congelamento. Embriões de boa qualidade têm sobrevida significativamente maior que os de má qualidade, além de apresentarem melhores índices de gravidez, implantação e nascimentos.⁽⁵¹⁻⁵³⁾ Embriões com quatro células que resistiram intactos ao descongelamento apresentam índices de implantação

significativamente maior do que aqueles com duas células (16,9% e 7,2%, respectivamente).⁽⁵⁴⁾

Ao avaliarem 4006 embriões congelados, Salumets *et al.*⁽⁵⁵⁾ observaram que quanto maior fosse o desenvolvimento embrionário pré-congelamento, menor era o índice de sobrevivência; zigotos apresentaram sobrevivência de 86,5%, embriões de 2º dia 61,7%, e os de 3º dia de 43,1% com índices de gravidez de 20,1%, 21,1% e 18,3%, respectivamente. Em outros estudos,^(56,57) os resultados de gravidez foram reproduzidos de forma semelhante.

A organização molecular e estrutural dos elementos do citoesqueleto é indispensável e precisa ser mantida nos processos de criopreservação. O fuso meiótico é uma estrutura do citoesqueleto composta por microtúbulos responsáveis pelo formato da célula e pela organização citoplasmática; exercem importante papel na manutenção da euploidia durante o processo de fertilização e apresentam grande sensibilidade e risco de rupturas durante o processo de congelamento e descongelamento.⁽⁵⁸⁾ Os microtúbulos são estruturas dinâmicas formadas por dímeros de tubulina, a qual exerce papel importante na migração de organelas intracelulares, inclusive no movimento dos cromossomos durante a mitose.⁽⁵⁹⁾

Em camundongos, Pickering & Johnson⁽⁶⁰⁾ demonstraram que a simples exposição dos oócitos a uma temperatura de 25°C durante 10 minutos era capaz de alterar o fuso meiótico com dispersão ou ausência de cromossomos; quando resfriados, durante 20 minutos a 4°C, não se identificou fuso meiótico normal, e 14% deles tinham os cromossomos dispersos. Entretanto, após o reaquecimento, a aparência do fuso era normal em 89% dos oócitos. Em

humanos, menos de 50% dos oócitos expostos à temperatura ambiente por 10 minutos conseguiram retornar à normalidade após 4 horas de reaquecimento a 37°C, sugerindo que a inabilidade dos oócitos humanos para reestruturar o fuso meiótico esteja relacionada à perda de material pericentriolar, necessário para a polimerização dos microtúbulos.⁽⁶¹⁾

A membrana pelúcida (MP), outro componente do citoesqueleto, pode ser danificada nos processos de criopreservação. Johnson *et al.*⁽²³⁾ postularam que o congelamento pode determinar endurecimento da MP, criando maior dificuldade de penetração do espermatozóide e, por isso, menores taxas de fertilização. Carrol *et al.*⁽⁶²⁾ observaram elevada incidência de poliploidia em oócitos de camundongos submetidos ao processo de congelamento devido à retenção do segundo corpúsculo polar (digenia), e não por polispermia como se imaginava, sugerindo que o resfriamento e aquecimento oocitário não danificam a MP. Por outro lado, a polispermia pode ser facilitada por uma reação cortical prematura, causada pela formação de cristais de gelo atuantes nos filamentos de actina abaixo da membrana celular.^(61,63-66)

O efeito do crioprotetor sobre a MP pode ser completamente eliminado quando os oócitos são resfriados a 10°C ou a 4°C, pela maior liberação de grânulos corticais.⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ Por sua vez, Gooch *et al.*⁽⁷⁰⁾ demonstraram que o congelamento lento e o descongelamento rápido são capazes de manter a integridade dos grânulos e do fuso meiótico.

O possível efeito deletério, que o congelamento poderia trazer sobre a MP por endurecimento ou fratura, parece ser minimizado, se os oócitos estiverem envolvidos pelas células do *cúmulus* e se o resfriamento ocorrer de forma lenta

e gradual.⁽²³⁾ Essa conclusão foi contraposta por outros autores,^(24,70,71) que acreditam que as células do *cúmulus* podem causar alteração na difusão do crioprotetor e na desidratação celular durante o congelamento, da mesma forma que a rigidez do complexo *cúmulus-corona* limita o ajuste na forma do oócito, quando há formação do gelo intracelular.

A adição de soro fetal bovino (SFB) ao crioprotetor, durante o processo de congelamento, pode impedir o endurecimento da MP por sua intervenção sobre a proteólise da glicoproteína ZP2, principal componente glicoproteico da MP, protegendo o oócito contra os efeitos adversos do DMSO. Essa proteção parece ser maior quando a concentração do soro utilizado for de 20%, pela inibição completa da conversão de ZP2 à ZP2f, responsável pelo endurecimento da membrana pelúcida.⁽⁷²⁾ Outra possibilidade é que o SFB atue inibindo diretamente a atividade das enzimas dos grânulos corticais ou como substrato alternativo para as proteínas da MP.⁽⁷³⁾

Fabbri *et al.*⁽⁷⁴⁾ não descobriram diferença significativa na sobrevivência de oócitos que tiveram seus *cúmulus oophorus* desnudados enzimaticamente ou não. Ao utilizar a técnica de ICSI, encontraram índices de fertilização de 57%, de clivagem embrionária de 91% e embriões de boa qualidade. Com base nesses resultados, propôs a criopreservação dos oócitos depois de completamente desnudados, para facilitar uma avaliação criteriosa da qualidade e do estágio de maturidade.

A integridade do oolema é outro ponto a ser considerado no processo de criopreservação. Embora pareça que o resfriamento isolado não compromete seriamente a estrutura do oolema na maioria das espécies,⁽⁷⁵⁾ tem sido

proposta a utilização de substância crioprotetora na concentração de 1,2 molar (M) para a conservação da sua integridade, ainda que efeitos negativos na maturação e fertilização tenham sido observados.⁽⁷⁶⁾

O pouco conhecimento que cinge esse tema e a diversidade de locais onde o fenômeno da criobiologia pode interferir marcam esse processo como um evento complexo e hesitante. A julgar a peculiaridade da ação a que se destina, o congelamento requer perícia e responsabilidade, de tal forma que roga por embasamento científico sustentado. Visa a presente pesquisa cooperar no entendimento dos fenômenos clínicos e laboratoriais do processo das técnicas de RA, no contexto das mulheres que propõem ter seus oócitos ou embriões criopreservados.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Delineamento

A pesquisa é um estudo observacional de coorte retrospectivo.

3.2. População e Amostra

3.2.1. População

A população do estudo é constituída por pacientes que buscaram assistência médica para tratamento de infertilidade conjugal e que posteriormente foram submetidas ao programa de RA pela técnica de ICSI, com congelamento de oócitos ou embriões e conseqüente descongelamento e transferência dos mesmos para o útero.

Os dados coletados dos prontuários médicos da clínica Fertilitat – Centro de Medicina Reprodutiva – no período de janeiro de 2001 a julho de 2004, foram autorizados pela administração e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-PUCRS), respeitando-se os critérios éticos para uso dos mesmos (Apêndice 1).

3.2.2. Amostra

A amostra constituiu-se por dois grupos de mulheres submetidas a RA, que foram assim divididos.

- O primeiro, chamado grupo oócito (GO), foi formado por 16 mulheres; parte dos seus oócitos coletados foi submetido a ICSI após a foliculo-aspiração (GO_f), e uma outra parte foi congelado (GO_c).
- O segundo grupo, denominado de grupo embrião (GE), ficou constituído por 32 mulheres, cujos embriões excedentes foram congelados.

Das 16 mulheres pertencentes ao GO, foram coletados 362 oócitos, dos quais 158 foram congelados (GO_c) e 204 seguiram o processo de RA (GO_f). Desses últimos, 135 oócitos mostravam-se aptos para serem submetidos à fertilização pela técnica de ICSI. Todos os 158 oócitos congelados do GO_c sofreram descongelamento em um prazo inferior a dois anos, dos quais 99 oócitos resultaram viáveis para serem submetidos a ICSI.

O grupo GE gerou o congelamento de 117 embriões, dos quais 91 apresentaram-se viáveis para a transferência, após descongelamento.

A análise comparativa da evolução laboratorial dos embriões resultantes da inseminação de oócitos a fresco (GO_f) ou após o descongelamento (GO_c) foi efetuada nos dois primeiros dias de evolução, pelo fato de 90,3% dos embriões procedentes do GO_c terem sido transferidos no segundo dia. Já, a análise dos resultados de gravidez e implantação embrionária, feita entre os embriões resultantes do grupo GO_c e daquele de descongelamento de embriões (GE), foi feita com base na transferência realizada no segundo ou terceiro dia.

Encontram-se descritos, no Apêndice 2, os protocolos de RA, incluindo a estimulação ovariana, etapa laboratorial, transferência embrionária e suporte hormonal de fase lútea; e o preparo endometrial para transferência embrionária pós-descongelamento de oócitos ou embriões.

3.3. Protocolos de Criopreservação de Oócitos

3.3.1. Soluções de Estoque

O preparo das soluções estoque utilizando-se o PrOH como crioprotetor é realizado como se segue:

Solução 1 (CJ2)

Diluir em 500 mL de água Mili-Q:

KCl	(P8041)	0,100 g
K ₂ HPO ₄	(P5504)	0,745 g
KH ₂ PO ₄	(P5655)	0,100 g
MgCl ₂	(M8266)	0,0235g
CaCl ₂	(C4901)	0,050 g
CHCl (0.2M)	(C7527)	13,96 g
D-Glucose	(G7021)	0,500 g
Phenol Red	(P5530)	0,0025 g
Kanamicina	(K1377)	0,0125 g

Filtrar a solução preparada e conservá-la sob refrigeração

Solução 2 (Sacarose 0,2M)

Diluir em 200 ml da solução CJ2:

Sacarose: 13,68 g

Filtrar a solução preparada e conservá-la sob refrigeração

Solução 3 (Sacarose 0,1M)

Diluir em 200 ml da solução CJ2:

Sacarose: 6,84 g

Filtrar a solução preparada e conservá-la sob refrigeração

Solução para congelamento de oócitos

Solução 1 (CJ2 / 1.5 PrOH)

9 ml da solução estoque 1

1 ml *Serum substitute supplement– Irvine scientific* (SSS)

Retirar 1,1 ml da mistura acima

Acrescentar 1,1 ml 1-2 propanodiol

Conservar sob refrigeração

Solução 2 (CJ2 / 1.5 PrOH / 0.2 Sacarose)

9 mL da solução estoque 2

1 mL SSS

Retirar 1,1 ml da mistura acima

Acrescentar 1,1 ml 1-2 propanodiol

Conservar sob refrigeração

Solução para descongelamento de oócitos

Solução 1 (CJ2 / 1.0 PrOH / 0.2 Sacarose)

9 ml solução estoque 2

1 ml SSS

Retirar 0,75 ml da mistura acima

Acrescentar 0,75 ml 1-2 propanodiol

Conservar sob refrigeração

Solução 2 (CJ2 / 0.5 PrOH / 0.2 Sacarose)

3 ml da solução de uso 1

3 ml da solução de uso 3

Conservar sob refrigeração

Solução 3 (CJ2 / 0.2 Sacarose)

9 ml solução estoque 2

1 ml SSS

Conservar sob refrigeração

Solução 4 (CJ2 / 0.1 Sacarose)

9 ml solução estoque 3

1 ml SSS

Conservar sob refrigeração

Solução 5 (CJ2)

9 ml solução estoque 1

1 ml SSS

Conservar sob refrigeração

3.3.2. Programa de Congelamento de Oócitos

Os oócitos selecionados para congelamento em estágio de metáfase II são lavados em meio *Human Tubal Fluid with Hepes - Irvine scientific (HTF-h)* a 37°C. Em seguida, são mergulhados em solução CJ2 / 1.5M PrOH por 10 minutos; após, os oócitos são transferidos para uma solução CJ2 / 1.5M PrOH / 0.2M sacarose por mais 10 minutos. Ambas as soluções permanecem à temperatura de 37°C. Cada palheta de 0,25 ml com 5 a 10 oócitos é selada e colocada no equipamento de congelamento (*Cryo Bath – Freeze control – by Cryologic, Austrália*). Após o término do congelamento, as palhetas são guardadas em tanque de nitrogênio líquido a -196°C. A Figura 1 mostra o aspecto oocitário “a fresco” e durante o preparo para o congelamento.

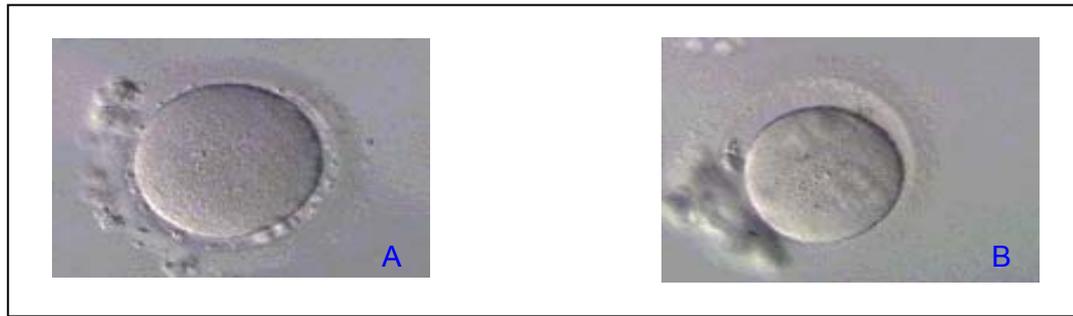


Figura 1. Aspecto morfológico do oócito submetido ao efeito das soluções; A – Oócito a fresco pré congelamento; B – Oócito submetido às soluções para congelamento: observar a retração do ooplasma.

3.3.3. Programa de Descongelamento de Oócitos

A palheta é retirada do tanque de nitrogênio e descongelada a temperatura ambiente. Com o auxílio de um filete metálico, o meio com os oócitos é exteriorizado da palheta. Os oócitos são mergulhados em solução CJ2 / 0.2M sacarose / 1.0M PrOH, solução CJ2 / 0.2M sacarose / 0.5M PrOH, solução CJ2 / 0.2M sacarose, solução CJ2 / 0.1M sacarose e solução CJ2, respectivamente, por 5 minutos em cada meio a temperatura de 37°C; por fim, são lavados em meio HTF a 37°C. Os oócitos descongelados são transferidos para o meio de cultivo *Human Tubal Fluid* - Irvine scientific (HTF) com 7,5% de SSS e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o momento da inseminação espermática. Na Figura 2 visualiza-se o aspecto oocitário após o descongelamento.



Figura 2. Aspecto morfológico do oócito pós descongelamento: observar a recuperação da sua forma original.

3.3.4. Programa de Congelamento de Embriões

Os embriões selecionados para congelamento são lavados em meio PBS (Phosphate buffered saline solution – Irvine scientific) a 37°C. Em seguida são mergulhados em solução 1,5M 1,2-propanodiol por 15 minutos e transferidos em solução 1,5M 1,2-propanodiol / 0,1M sacarose por mais 15 minutos; ambas as soluções permanecem a temperatura de 37°C. Cada palheta de 0,25 ml com no máximo 5 embriões é selada e colocada no equipamento de congelamento (Cryo Bath – Freeze control – by Cryologic, Austrália). Após o término do congelamento, as palhetas são guardadas em tanque de nitrogênio líquido a -196°C. A Figura 3 apresenta o embrião nas fases pré e após o preparo para o congelamento.

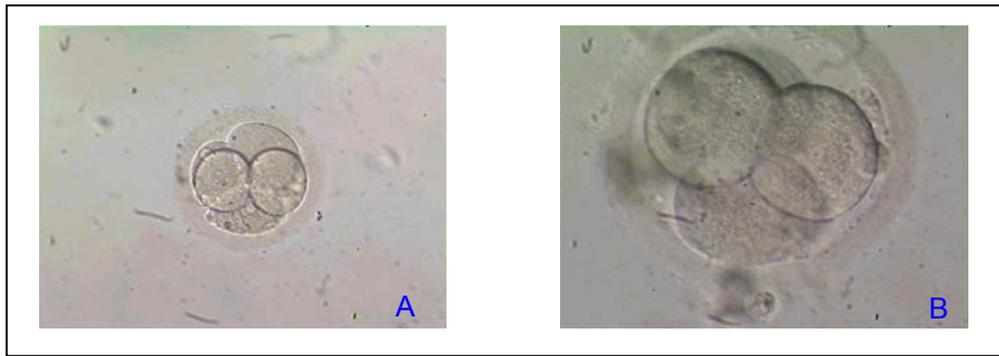


Figura 3. Aspecto morfológico do embrião submetido ao efeito das soluções;
A – Embrião pré congelamento; B – Embrião submetido às soluções
para congelamento: observar a integridade de seus blastômeros.

3.3.5. Programa de Descongelamento de Embriões

A palheta é retirada do tanque de nitrogênio e descongelada à temperatura ambiente. Com auxílio de um filete metálico, o meio com os embriões é exteriorizado da palheta. Os embriões são mergulhados em solução 1.0M 1,2-propanodiol / 0.2M sacarose, solução 0.5M 1,2-propanodiol / 0.2M sacarose, solução 0.2M sacarose, respectivamente, por 5 minutos em cada meio à temperatura de 37°C; por fim, são lavados em meio PBS a 37°C. Os embriões descongelados são transferidos para uma placa de cultivo com HTF com 15% de SSS e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o momento da transferência para o útero. A Figura 4 mostra o embrião após o seu descongelamento.



Figura 4. Embrião pós-descongelamento mantendo a integridade blastomérica e sua morfologia original.

3.4. Curvas de Congelamento

3.4.1. Curva de Congelamento de Oócitos

Os dados para o controle computadorizado (Figura 5) da curva de congelamento de oócitos foram assim determinados:

- Início 20°C
- Declínio de 2°C / min até -7°C
- Seeding / 10 min
- Declínio de 0,3°C / min até -33°C
- Declínio de 50°C / min até -120°C
- Holding / 20 min

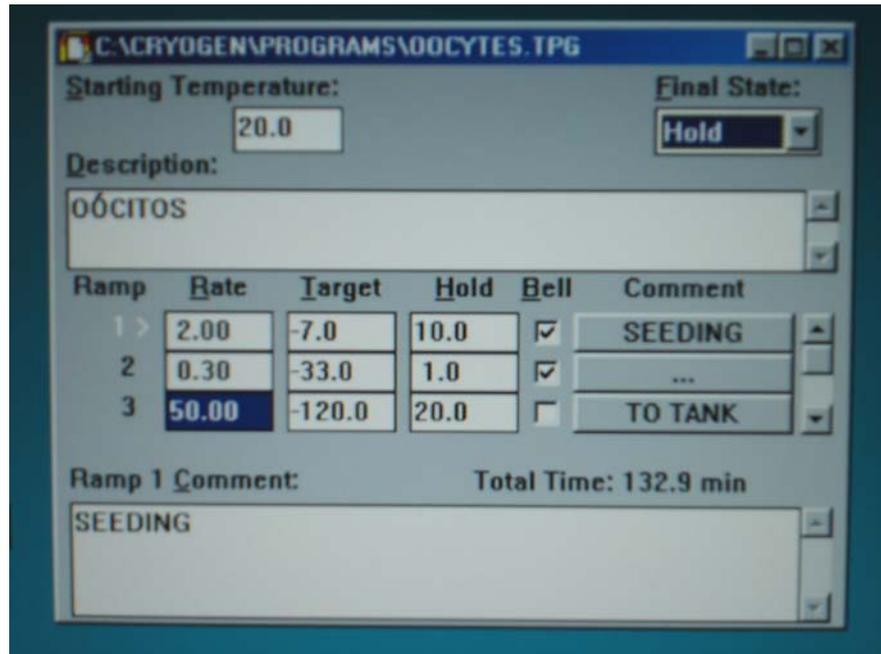


Figura 5. Dados da curva computadorizada de congelamento de oócitos.

3.4.2. Curva de Congelamento de Embriões

Os dados para o controle computadorizado (Figura 6) da curva de congelamento de embriões foram assim determinados:

- Início 20°C
- Declínio de 2°C / min até -7°C
- Seeding / 10 min
- Declínio de 0,3°C / min até -30°C
- Declínio de 50°C / min até -120°C
- Holding / 20 min

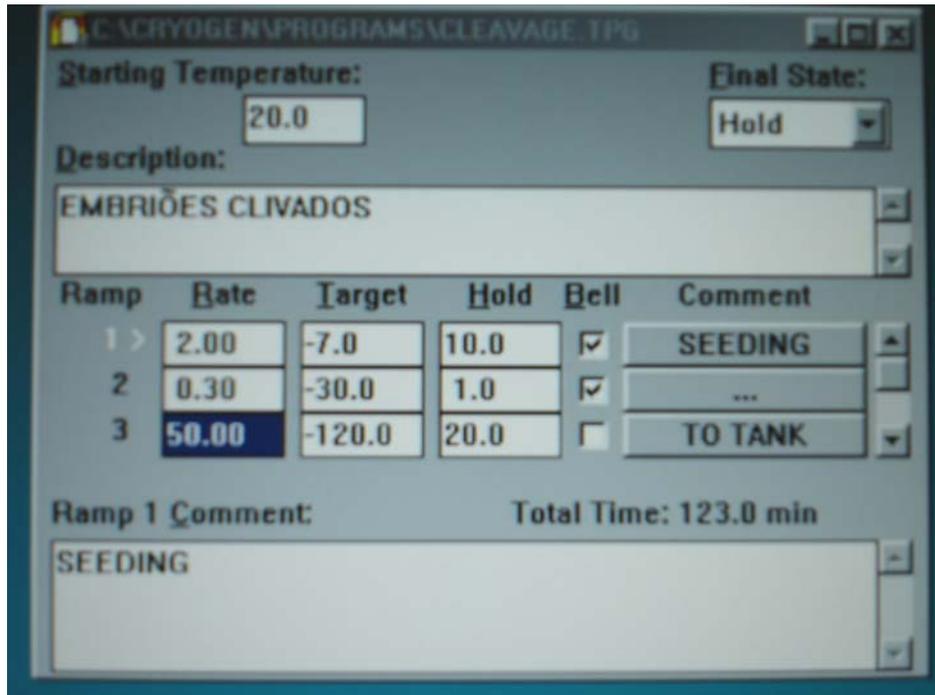


Figura 6. Dados da curva computadorizada de congelamento de embriões.

3.5. Pareamento da Amostra

Com o objetivo de homogeneizar a amostra e minimizar possíveis interferências sobre as variáveis investigadas, os grupos foram pareados quanto à idade da mulher, fator determinante da infertilidade, a data da realização do procedimento de RA e protocolo de estimulação ovariana.

Quanto ao fator que determinou a infertilidade ou a indicação de RA, os grupos foram equiparados na mesma proporção, respeitando-se sempre os critérios de inclusão e exclusão.

Procurou-se emparelhar as datas das fertilizações entre os dois grupos para controlar algumas variáveis que pudessem interferir nos resultados, tais como mudança do profissional que executou a tarefa laboratorial, alterações na

rotina, prazos de vencimento dos meios de cultura, aprimoramentos tecnológicos ou refinamento da técnica.

Os grupos foram homogeneamente pareados em relação ao tipo de droga usada, tanto para o protocolo de estimulação ovariana para dessensibilização hipofisária e folículo-estimulação, quanto para o protocolo de preparo endometrial para a recepção dos embriões descongelados (GE) ou oriundos da fertilização dos oócitos descongelados (GOc).

3.5.1. Variáveis Analisadas

Um banco de dados foi criado para incluir informações a partir da evolução oócito-embriônica, até o desfecho clínico de gravidez. Os formulários de dados podem ser observados nos Apêndices 3 e 4.

3.5.1.1. Sobrevivência dos Oócitos e Embriões

Os oócitos que apresentaram degeneração após o descongelamento foram considerados inviáveis e desprezados (Figura 7). Por outro lado, os embriões foram assim denominados, quando seus blastômeros apresentavam mais que 50% de degeneração (Figura 8).



Figura 7. Oócito inviável após o descongelamento. Observar o aspecto granular e o escurecimento do citoplasma.



Figura 8. Embrião degenerado após o descongelamento. Observar a rotura da maioria do seus blastômeros e sua intensa fragmentação.

3.5.1.2. Taxa de Fertilização

O critério usado para definir fertilização normal foi a presença de dois pronúcleos e a visualização do segundo corpúsculo polar dezoito horas após a

inseminação oocitária (Figura 9). Os oócitos que apresentavam um, três ou mais pronúcleos foram classificados como fertilização anormal (Figura 10), sendo, então, considerados inviáveis - e, por conseguinte, foram descartados.



Figura 9. Oócito fertilizado de forma normal apresentando os dois pronúcleos no centro do ooplasma, e os dois corpúsculos polares na periferia à esquerda.



Figura 10. Oócito fertilizado de forma anormal. Observa-se a presença de três pronúcleos.

3.5.1.3. Clivagem Embrionária

O oócito fertilizado foi considerado clivado quando demonstrou a primeira divisão celular mitótica (Figura 11).



Figura 11. Embrião com dois blastômeros.

3.5.1.4. Qualidade Embrionária

A qualidade embrionária foi avaliada seguindo as variáveis de:

- percentagem de fragmentação citoplasmática (Figura 12);
- simetria dos blastômeros (Figura 13 e 14);
- velocidade das clivagens (Figura 15).



Figura 12. Embrião com fragmentação citoplasmática.



Figura 13. Embrião com quatro blastômeros simétricos.



Figura 14. Embrião com dois blastômeros assimétricos.

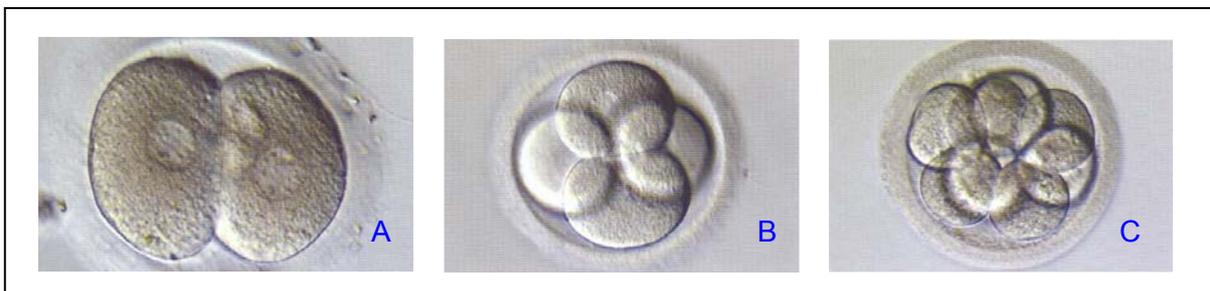


Figura 15. Velocidade de clivagem normal: A – Embrião às 24 horas; B – Embrião às 48 horas; C – Embrião às 72 horas.

Os critérios a serem usados para a medida da qualidade embrionária foram baseados nos protocolos da Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (REDLARA), modificado por este grupo de estudo e descrito, a seguir, no Quadro 1.

Quadro 1. Graduação morfológica de embriões humanos cultivados *in vitro*, segundo critérios da REDLARA modificada.⁽⁷⁷⁾

Grau	Descrição
Grau I	Embriões com blastômeros simétricos e ausência de fragmentação citoplasmática.
Grau II	Embriões com blastômeros simétricos ou assimétricos, e/ou com menos de 20% de fragmentação citoplasmática.
Grau III	Embriões com blastômeros simétricos ou não, e com 20 a 50% de fragmentação citoplasmática.
Grau IV	Embriões com blastômeros simétricos ou não, e com mais de 50% de fragmentação citoplasmática.

Foram considerados bons embriões aqueles com grau morfológico I e II, sendo os dados comparativos da qualidade embrionária restritos ao segundo dia de evolução dos embriões, data da transferência dos mesmos. Quanto à velocidade das clivagens, considerou-se a presença de três a cinco blastômeros como a mais adequada divisão celular para este dia de evolução.

3.5.1.5. Taxa de Gravidez

Foi considerada gravidez clínica a presença de saco gestacional intra-uterino com embrião apresentando batimentos cardíacos detectados pelo exame de ultra-sonografia.

3.5.1.6. Taxa de Implantação Embrionária

A taxa de implantação, que corresponde ao percentual de implantação embrionária, foi obtida pelo cálculo do número de sacos gestacionais com embrião vivo dividido pelo número de embriões transferidos.

3.6. Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo:

- as mulheres com fator de infertilidade definido ou infertilidade sem causa aparente abaixo de 40 anos;
- os homens com ou sem infertilidade, independente da idade, que puderam fornecer espermatozóides viáveis para o programa de ICSI, coletados por masturbação ou cirurgicamente através de PESA (*Percutaneous epididymal sperm aspiration*), TESA (*Testicular sperm aspiration*) ou TESE (*Testicular sperm extraction*).

3.7. Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste estudo:

- casais com infertilidade por fator imunológico;
- mulheres definidas como de baixa reserva ovariana ou má-respondedora à estimulação ovariana prévia;
- mulheres com fator uterino; e
- mulheres em programas de doação/recepção de oócitos.

3.8. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste não-paramétrico do Qui-quadrado e do teste exato de Fisher. Para as variáveis em que ocorreram diferenças significativas em nível de significância $\alpha \leq 0,05$, foi calculado o Risco Relativo, com respectivo índice de confiança (CI) = 95%. Dados contínuos foram comparados entre os dois grupos etários através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico SPSS, versão 10.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 48 mulheres avaliadas no estudo, a idade média daquelas pertencentes ao grupo oócito (GO) foi $32,9 \pm 3,5$ anos, e daquelas do grupo embrião (GE) foi $33,1 \pm 2,61$ anos.

4.1. Análise do Grupo de Mulheres Submetidas a Congelamento de Oócitos (GO): Comparação dos Oócitos Inseminados após a Foliculo-Aspiração ou “A Fresco” (GO_f), ou após o Congelamento e Descongelamento (GO_c) quanto às Taxas de Fertilização, Clivagem e Qualidade Embrionária

4.1.1. Comparação quanto à Taxa de Fertilização Normal e a Taxa de Clivagem Embrionária

A taxa de fertilização normal não foi significativamente diferente no GO quando inseminados, a fresco, após a foliculo-aspiração (GO_f) ou após o descongelamento (GO_c). No GO_c dos 99 oócitos intactos após descongelamento que foram inseminados, houve fertilização normal em 61 deles, sendo observada uma frequência de 61,6%; por outro lado, houve fertilização em 89 oócitos dos 135 inseminados a fresco (GO_f), perfazendo uma taxa de 65,9% ($\chi^2=0,29$; $gl=1$; $p=0,59$).

Na avaliação da ocorrência da primeira clivagem, observaram-se taxas semelhantes desse fenômeno. Dos 61 oócitos fertilizados a partir de oócitos

descongelados (GOc), 56 clivaram, equivalendo a uma taxa de clivagem de 91,8%. Já, dos 89 fertilizados a partir de oócitos a fresco (GOf), a taxa foi de 95,5%, correspondendo a 85 oócitos clivados ($\chi^2=0,35$; gl=1; p=0,56). A Figura 16 mostra a comparação gráfica entre os grupos.

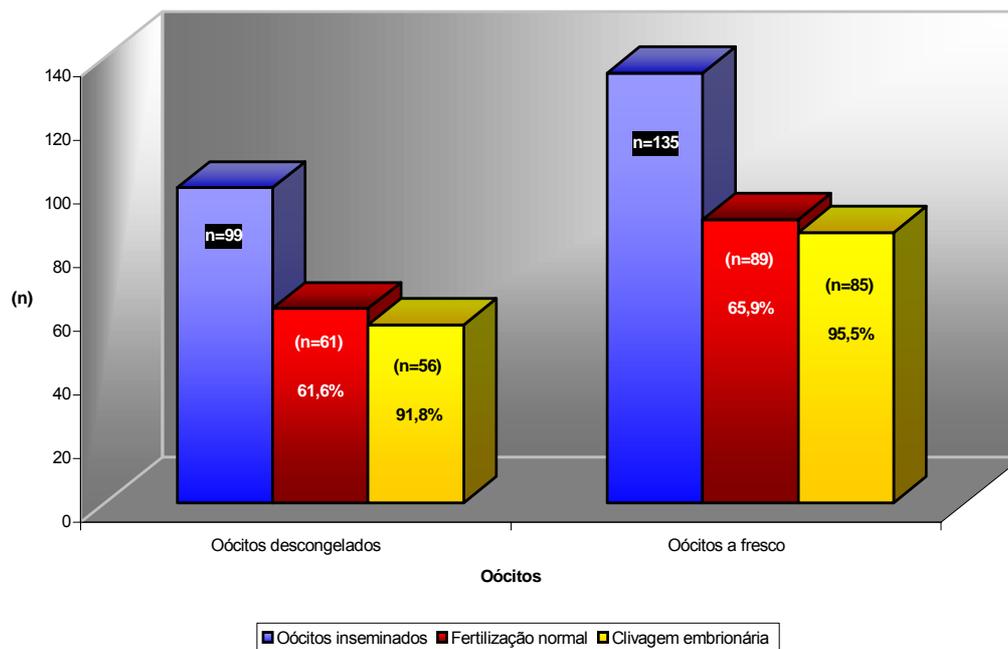


Figura 16. Comparação gráfica das taxas de fertilização normal e clivagem embrionária em oócitos inseminados após o descongelamento ou a fresco.

A busca por zigotos de boa qualidade, caracterizados pela presença de dois pronúcleos, dois corpúsculos polares, citoplasma claro, forma regular e membrana pelúcida intacta é desejada nos protocolos de FIV e pode assegurar melhores resultados de implantação e gravidez.⁽⁷⁸⁾

No presente estudo, as taxas de fertilização normal e a ocorrência da primeira clivagem foram semelhantes entre os dois grupos. Houve uma

habilidade discretamente maior de fertilização e clivagem pelo grupo de oócitos inseminados após a aspiração folicular (65,9% e 95,5% respectivamente) em relação àqueles após o descongelamento (61,6% e 91,8% respectivamente), não caracterizando diferença significativa. Esse resultado contempla certa surpresa, dada a conjectura inicial de que os protocolos de congelamento pudessem comprometer a integridade funcional dos oócitos. Devemos considerar que as taxas de fertilização de oócitos congelados tiveram melhora considerável depois da utilização da microinjeção pela técnica de ICSI.⁽⁷⁹⁾

Os achados relacionados à fertilização e clivagem estão em acordo com outras publicações da literatura. Quintans *et al.*,⁽⁸⁰⁾ utilizando a técnica de ICSI, relataram taxa de fertilização de 72% no seu programa de FIV; resultados semelhantes foram anunciados por Bos-Mikich *et al.*,⁽⁸¹⁾ Qublan *et al.*⁽⁸²⁾ e Isiklar *et al.*⁽⁸³⁾ na proporção de 62%, 73,9% e 74,8%, respectivamente.

Boldt *et al.*⁽⁸⁴⁾ e Quintans *et al.*,⁽⁸⁰⁾ utilizando meio de congelamento semelhante ao presente trabalho, relataram taxa de fertilização de 59% e clivagem de 84% dos oócitos congelados previamente; por outro lado, Porcu *et al.*⁽⁸⁵⁾ relataram disparidade ampla nas taxas de fertilização a partir de oócitos congelados, variando de 13 a 71%. Fabbri *et al.*⁽⁷⁴⁾ observaram 91% de clivagem embrionária no segundo dia de evolução.

Ao avaliar a performance do congelamento de oócitos de 38 mulheres portadoras de fator tubário de infertilidade, Fabbri *et al.*,⁽⁸⁶⁾ utilizando crioprotetor 1,2 propanediol e sacarose, obtiveram taxa de fertilização de 65%. Porcu *et al.*,⁽⁸⁷⁾ mesmo utilizando meio de congelamento diferente ao apresentado no presente trabalho, obtiveram taxa de fertilização de 50%.

Notricia *et al.*,⁽⁸⁸⁾ entretanto, relataram apenas 25% de fertilização ao utilizar oócitos e sêmem congelados de um casal, cuja mulher tinha 24 anos, e o esposo era portador de seminoma testicular.

Utilizando o mesmo meio de congelamento aqui proposto, Azambuja *et al.*⁽⁸⁹⁾ relataram 100% de fertilização dos oócitos sobreviventes ao descongelamento.

4.1.2. Comparação quanto à Qualidade Embrionária

Comparando a boa qualidade embrionária (graus morfológicos I e II) no segundo dia de evolução em laboratório, não houve diferença significativa na freqüência deste evento. Nos embriões oriundos do GO_f, a taxa foi de 89,4%; nos procedentes do GO_c, a freqüência de boa qualidade foi de 80,4% ($\chi^2=1,59$; gl=1; p=0,21).

Numa análise específica do número de embriões que sofreram mais de 20% de fragmentação citoplasmática, caracterizando o embrião como de baixa qualidade, observou-se que os embriões procedentes do GO_c tiveram quase o dobro da chance de este fato ocorrer quando comparados aos embriões oriundos do GO_f (19,6% versus 10,6%), mesmo não havendo diferença significativa (R=1,86; IC95%=0,82-4,19). Os dados estão representados na Figura 17.

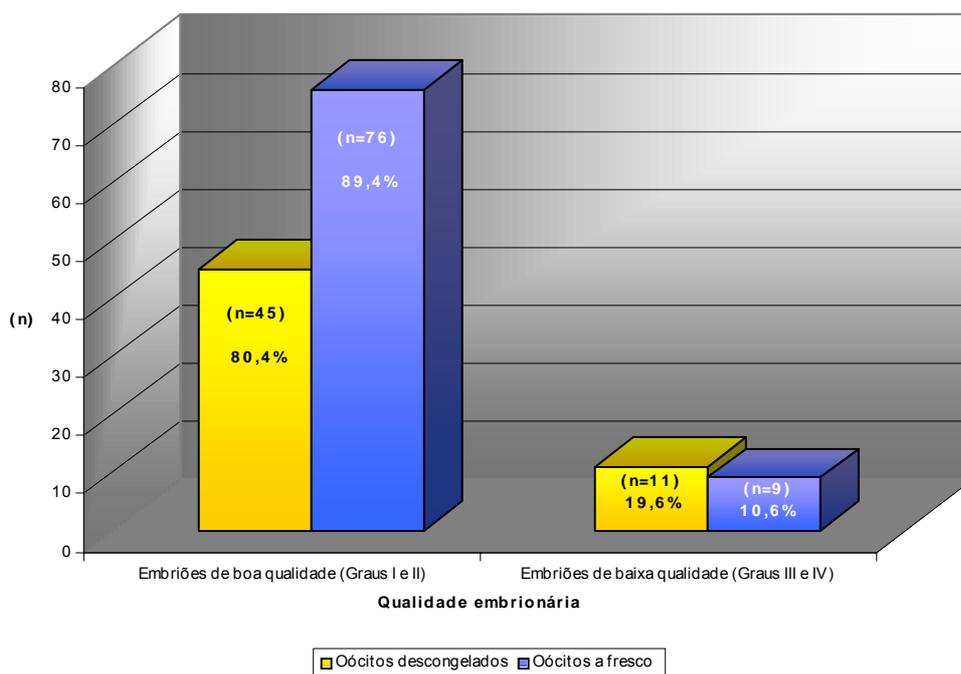


Figura 17. Qualidade dos embriões resultantes da inseminação de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial.

Na apreciação da fragmentação citoplasmática no segundo dia de evolução embrionária, não se observou diferença significativa na ocorrência deste fato entre os embriões provenientes do GOf ou do GOc (Mann-Whitney test: $p=0,17$). A média \pm dp e mediana de fragmentação embrionária dos embriões originados do GOc foram de $11,88 \pm 12,1\%$ e 10% ; e dos procedentes do GOf foram de $8,59 \pm 8,9\%$ e 5% , respectivamente. Os resultados estão apresentados comparativamente na Figura 18.

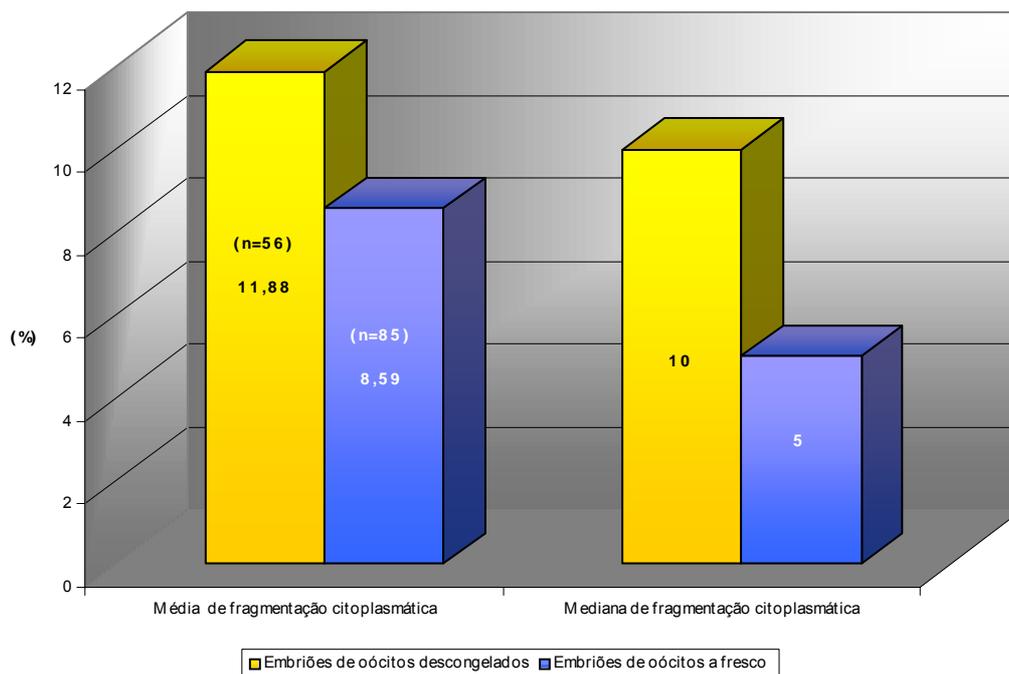


Figura 18. Média e mediana de fragmentação citoplasmática entre embriões oriundos de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial

Resultados discordantes foram observados quando se avaliou a velocidade das clivagens dos embriões durante a evolução laboratorial. Os embriões originados do GOc tiveram uma velocidade de clivagem significativamente menor do que aqueles oriundos do GOf ($\chi^2=9,33$; gl=1; $p=0,002$). Dos 56 embriões procedentes do GOc, 25 deles (44,6%) tiveram suas divisões celulares adequadas para o segundo dia de evolução, ao passo que 61 embriões (71,8%) dos 85 originados do GOf apresentaram a mesma evolução.

Todos os embriões com velocidade de clivagem inadequada, procedentes de oócitos descongelados, tiveram apenas dois blastômeros. Considerando a magnitude do efeito pelo risco relativo, observa-se que os embriões oriundos

de oócitos descongelados possuem um risco praticamente dobrado de terem uma evolução inadequada nas suas divisões celulares, enquanto permanecem no ambiente de cultivo em laboratório (RR=1,96;IC95%=1,30–2,96). A análise gráfica da velocidade de clivagem adequada pode ser vista na Figura 19.

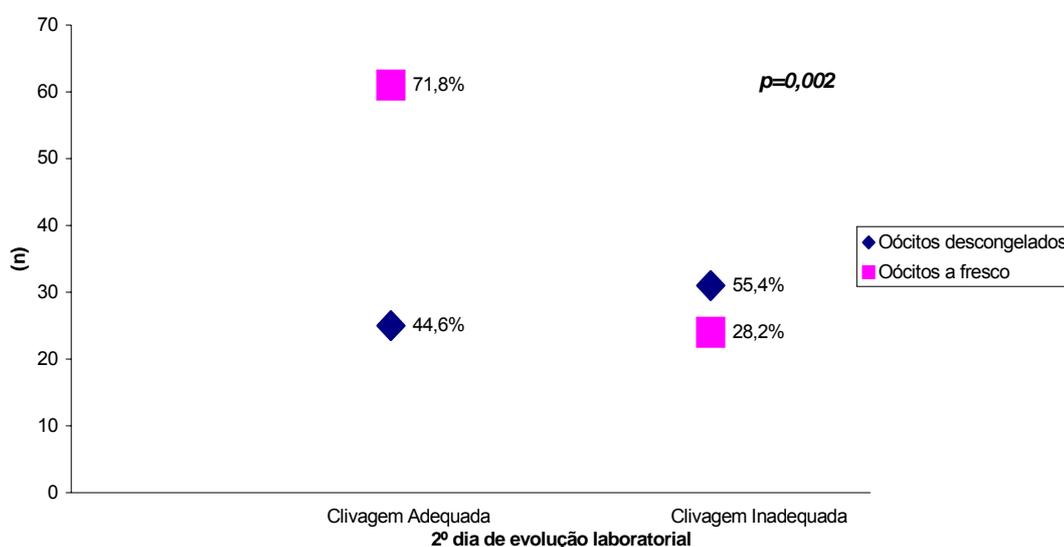


Figura 19. Comparação gráfica da velocidade das clivagens dos embriões oriundos de oócitos descongelados e a fresco no segundo dia de evolução laboratorial

Associada a outras variáveis, a avaliação morfológica é empregada como principal parâmetro na definição dos embriões a serem transferidos para o útero visando a maior potencialidade de implantação e gravidez.⁽⁹⁰⁾ A qualificação a ser estipulada é baseada no número de células, fragmentação citoplasmática, regularidade dos blastômeros e consistência do citoplasma,⁽⁹¹⁾ dentre essas, a fragmentação é um dos aspectos morfológicos de maior

relevância. Sistemas de graduação da qualidade embrionária baseada na percentagem de fragmentação foram propostos por vários autores.⁽⁹²⁻⁹⁶⁾ No presente estudo, o grau morfológico utilizado para avaliar a qualidade embrionária foi baseado nos critérios da REDLARA, modificado pelo grupo da Clínica Fertilitat, que utiliza, além da simetria de blastômeros, o percentual de fragmentação citoplasmática.⁽⁷⁷⁾

Com o propósito de comparar a freqüência de embriões de boa qualidade entre os grupos, agruparam-se os embriões de graus I e II no segundo dia de evolução laboratorial e estabeleceu-se o comparativo. O produto desse confronto demonstrou semelhança nos resultados ($p=0,21$); os oócitos que sobreviveram ao descongelamento apresentaram resultados similares na capacidade de formar bons embriões quando comparados aos oócitos a fresco. Isso indica que, superado o possível efeito nocivo do congelamento e descongelamento sobre os estágios controlados do citoesqueleto, os oócitos adquirem a autonomia originária e seguem o padrão evolutivo *in vitro* da espécie humana.

Considerando que a fragmentação citoplasmática é fator decisivo nas chances de sucesso de gestação e implantação embrionária, a análise individualizada deste item, no segundo dia de evolução laboratorial, também não se apresentou significativamente diferente entre os grupos quanto à freqüência de aparecimento, muito embora, em uma análise pormenorizada, os oócitos procedentes do descongelamento manifestaram quase o dobro do risco de apresentarem mais de 20% de fragmentação citoplasmática (RR=1,86). Não há alusão razoável para justificar tal fato; porém, fragmentos de blastômeros

inviáveis, resultantes do descongelamento, poderiam formar detritos celulares que se interporiam entre as células normais e tornariam o embrião morfológicamente de pior qualidade.⁽⁹⁷⁾ Nesse ínterim, a pesquisa não detalhou a disposição espacial da fragmentação, tampouco as suas dimensões; tal postura faria pormenorizações pouco contributivas para os objetivos propostos pelo estudo.

A presença de fragmentação citoplasmática é comum em embriões humanos submetidos aos programas de RA. Ela pode ocorrer por influência tanto do espermatozóide quanto do oócito. O espermatozóide estaria implicado na causa da fragmentação devido a dano do DNA, ocorrido antes da fertilização, e ao óvulo, em função de prováveis distúrbios metabólicos.⁽⁹⁸⁾

Os fragmentos interblastômeros estão isentos de material genético e podem interferir com as interações celulares do embrião. Eles se dispõem nas zonas de contato entre os blastômeros, interferindo no processo de compactação embrionária e, conseqüentemente, de blastulação.⁽⁹⁹⁾

A presença de fragmentos nucleares é usualmente uma indicação de que o embrião é cromossomicamente anormal. Por sua vez, embriões com pequeno grau de fragmentação citoplasmática freqüentemente têm um potencial de desenvolvimento similar aos que não o possuem.^(100,101) Estudos mostram redução nas taxas de implantação quando o índice de fragmentação citoplasmática está acima de 10%.^(95,101-104)

Alikani *et al.*⁽¹⁰²⁾ relataram que a retirada dos fragmentos pode restaurar a relação espacial das células do embrião e prevenir a degeneração secundária, enquanto que Dozortsev *et al.*⁽⁹⁸⁾ afirmaram que a fragmentação celular, antes

e após a aquisição da habilidade para compactação, é de pouca significância, e a sua remoção não promove benefícios adicionais para o desenvolvimento embrionário.

Fragmentações superiores a 10%, já no segundo dia de desenvolvimento, condicionam progressivamente menores taxas de implantação embrionária.⁽¹⁰⁵⁾ Nem toda fragmentação é prejudicial ao embrião, mas tal processo vai depender da sua origem. Grandes fragmentações, que podem estar relacionadas com a quantidade de mitocôndrias ou com o metabolismo endógeno das proteínas, parecem ser mais prejudiciais ao desenvolvimento embrionário do que pequenos fragmentos relacionados à citocinese incompleta.^(93,106) Não obstante, embriões com moderada quantidade de fragmentação têm comportamento semelhante aos não-fragmentados no que tange à implantação uterina.⁽¹⁰⁷⁾

É oportuno enfatizar com contumácia que, nesta pesquisa, as fragmentações citoplasmáticas foram comparadas no segundo dia de evolução laboratorial. Isso possibilita alterar se os embriões oriundos de oócitos congelados teriam a mesma performance de fragmentação que aqueles a fresco, quando avaliados em estágio superior de desenvolvimento.

Outro fator deliberativo para qualificação embrionária diz respeito à velocidade das clivagens. A taxa de clivagem deve observar sincronismo com o tempo de desenvolvimento embrionário. Há relação nítida entre a divisão embrionária precoce e a qualidade dos embriões resultantes; embriões com dois blastômeros entre 25 e 27 horas após a inseminação de espermatozóides

parecem ter melhor qualidade quando comparados àqueles com divisões mais tardias.⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾

No presente estudo, quando foi comparada a melhor velocidade de clivagem entre os grupos no segundo dia de evolução laboratorial, observaram-se resultados discordantes. Os embriões originados de oócitos descongelados tiveram velocidade de clivagem significativamente menor do que aqueles oriundos de oócitos a fresco ($p=0,002$), enquanto destes últimos 71,8% dos embriões tiveram divisões celulares adequadas, e somente 44,6% daqueles provenientes de oócitos descongelados tiveram o mesmo fado. O significativo retardo no desenvolvimento temporal da divisão celular do embrião oriundo do processo de criopreservação é especulativo; por isso, estudos adicionais são necessários para elucidação deste fato. A verdade é que, mesmo retardando a velocidade de clivagem inicial, a implantação embrionária e a chance de gravidez são mantidas, como foi visto no presente trabalho ao se comparar os resultados entre oócitos a fresco e descongelados. Não se tem a convicção se esta evolução temporal mais lenta é mantida em estágios mais avançados da evolução laboratorial do embrião, visto que a transferência de embriões oriundos de oócitos descongelados tem ocorrido invariavelmente no segundo dia de desenvolvimento.

Outro fato que requer análises futuras, mesmo não tendo sido objetivo da pesquisa, é a presença de significativo desalinhamento de nucléolos nos oócitos fertilizados a partir do processo de descongelamento. A aparente alteração da citoarquitetura pode alterar discussões a respeito de conceitos fundamentais da embriogênese.

Hsu *et al.*⁽¹¹²⁾ ao estudarem 1737 embriões transferidos encontraram na clivagem embrionária a melhor forma para prever a gravidez, e na clivagem associada à idade, para prever a implantação; os autores consideraram embriões com boa velocidade de clivagem aqueles com oito ou mais blastômeros no terceiro dia de evolução, e com baixa velocidade aqueles com quatro ou menos células. Giorgetti *et al.*⁽¹⁰⁵⁾ observaram que embriões com quatro células, no segundo dia de evolução, apresentavam significativa melhor taxa de gravidez (15,6%) do que embriões com duas, três, cinco ou mais células (7,4%).

Lundin *et al.*⁽¹¹³⁾ também consideraram embriões de boa qualidade aqueles que tiveram clivagem precoce entre 25 e 27 horas e que se apresentavam com quatro a seis células no segundo dia. Embriões que apresentavam até três células no segundo dia após a fertilização eram considerados de clivagem lenta. A taxa de gravidez observada com embriões de clivagem precoce e tardia foi de 41% e 31%, respectivamente.

O motivo pelo qual os embriões resultantes de uma divisão mitótica precoce apresentam melhor qualidade não está perfeitamente elucidado; provavelmente, exista melhor sincronia entre citoplasma e núcleo no que se refere à competência ou à disponibilidade de ATP, mRNA, mitocôndrias, e a outros componentes celulares. Além de menor percentual de implantação, embriões com velocidade lenta de divisão também podem apresentar maiores taxas de anomalias cromossômicas,^(114,115) A participação do espermatozoide nesse contexto pode ter fundamento, visto que a divisão mitótica do embrião é

controlada pelo centríolo espermático; assim, a baixa qualidade espermática pode ser um fator adicional negativo na divisão embrionária.^(110,116,117)

Ao transportar para a presente pesquisa a conjectura de possíveis anomalias cromossômicas estarem relacionadas ao retardo na evolução temporal do embrião, pode-se amenizar o fato, visto que todos os nascimentos, até hoje, apresentam desenvolvimento físico e mental normal; o mesmo não se pode comentar sobre aqueles que não implantaram ou abortaram.

Convém ressaltar que, na presente investigação, o grupo oócito não obteve gestação quando da inseminação dos oócitos a fresco (GO_f); além disso, mais adiante, quando fizeram a inseminação dos oócitos descongelados (GO_c), obteve-se gestação (taxa de gravidez clínica de 25%), mesmo tendo sua velocidade de clivagem retardada. Dessa maneira, torna-se um tanto difícil interpretar esses acontecimentos, a julgar pelo exposto acima. Terão a pequena amostra ou o rigor na sua organização interferência sobre esses eventos?

4.2. Análise do Grupo de Mulheres que Congelaram Óvulos (GO_c) ou Embriões (GE): Comparação das Taxas de Sobrevivência de Ambos após o Descongelamento e das Taxas de Gravidez e Implantação Embrionária entre os Embriões Oriundos dos Diferentes Grupos

4.2.1. Comparação Quanto às Taxas de Sobrevivência

Na comparação das taxas de sobrevivência dos oócitos e embriões após o descongelamento, observou-se diferença significativa entre os grupos. No GOc, 59 oócitos apresentaram-se inviáveis após o descongelamento com uma frequência de 37,3%, enquanto que no GE, os 26 embriões inviáveis corresponderam a 22,4% ($\chi^2=6,10$; $gl=1$; $p=0,01$). Nessa apreciação, usando-se o risco relativo, observou-se que os óvulos tiveram um risco de inviabilidade 64% maior quando comparados aos embriões ($RR=1,64$; $IC95\%=1,11-2,41$); os resultados estão representados na Figura 20.

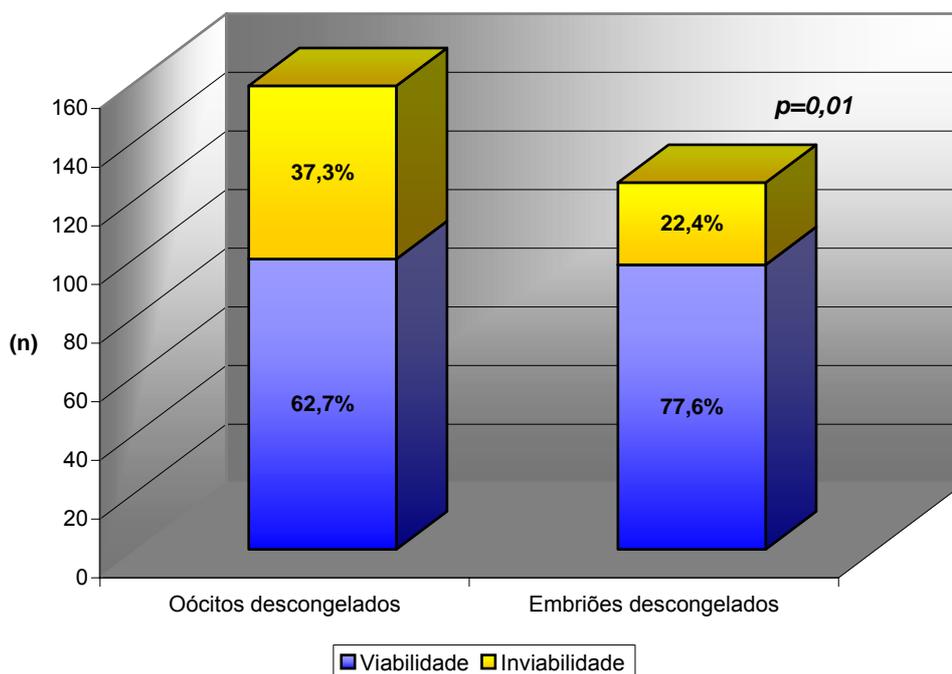


Figura 20. Representação gráfica da viabilidade oocito-embrionária após descongelamento

Fonte com análises conjuntas sobre o índice de sobrevivência de embriões e oócitos humanos não têm provimento na literatura médica; porém, considerações individuais são publicadas em proporções crescentes por centros especializados.

Na análise comparativa entre a sobrevivência do embrião e do oócito, deve-se considerar que nesse último é preciso eficácia absoluta no seu descongelamento. Não poderá haver dano algum sobre essa única célula em questão; a inviabilidade celular impede o seguimento do processo de RA. Em contrário, quando se trata de embrião, a perda de até 50% dos blastômeros não inviabiliza o seguimento das divisões celulares.⁽¹¹⁸⁾

Os índices de sobrevivência oocitária estão na dependência direta da experiência técnica de cada centro. Tucker *et al.*⁽¹⁷⁾ sugeriram que seria improvável uma taxa de sobrevivência maior que 70% quando se utilizam oócitos criopreservados, e que poderia ser melhor no caso de oócitos de alta qualidade serem preliminarmente selecionados. Considerando que a seleção prévia de bons embriões para o congelamento permite melhores taxas de sobrevivência quando do descongelamento, o mesmo fato poderia ocorrer na criopreservação de oócitos. Esses autores também sugeriam que a criopreservação de oócitos imaturos poderia proporcionar uma melhor taxa de sobrevivência do que oócitos maduros.

Na presente pesquisa, houve seleção dos oócitos em estágio MII para o congelamento, evitando-se aqueles imaturos. Quando se cotejaram os índices de sobrevivência, foi observado que 62,7% dos oócitos resistiram ao descongelamento de forma intacta, ao passo que os embriões tiveram

sobrevivência significativamente maior, na ordem de 77,6% ($p=0,01$). Isso expressa, se interpretado através do risco relativo, que os oócitos tiveram um risco de inviabilidade 64% maior quando comparados aos embriões ($RR=1,64$). Essa análise ganha peso significativo quando aplicada à prática clínica: antes mesmo de a mulher ter a definição do sucesso do programa de RA em que está envolvida, ela deve dar preferência por uma ou outra opção de congelamento.

Mesmo não sendo objetivo específico do trabalho, ao considerar que os embriões têm a chance de perder um ou mais blastômeros e seguir o seu desenvolvimento sem prejuízo adicional – fato que não se aplica aos oócitos – pode-se fazer uma interpretação singular, tentando comparar a sobrevivência oocitária com aqueles embriões que não tiveram nenhuma perda celular pelo descongelamento, o que tornaria a comparação mais concludente, isto é, expressaria a real capacidade de resistência celular aos efeitos criogênicos. Nesse sentido, observou-se que apenas 45,3% dos embriões sobreviveram intactos sem nenhuma perda celular. Por essa análise, observa-se que os oócitos apresentam melhor performance.

Acareando-se com dados da literatura, pode-se observar que os índices de sobrevivência embrionária ao descongelamento aqui apresentados são comparáveis aos obtidos no trabalho experimental de Bongso *et al.*,⁽¹¹⁹⁾ quando obtiveram 77,8% de sobrevivência em embriões de camundongo. Quando o congelamento era feito a partir de zigotos, Testart *et al.*⁽¹²⁰⁾ obtiveram índices de 83,9%, confirmados com taxas ainda maiores pelo experimento de Fugger

et al.,⁽¹²¹⁾ que alcançaram 92%. Toner *et al.*⁽²⁹⁾ apresentaram percentagens de 70% de sobrevivência.

A presença de simetria dos blastômeros associada à ausência ou à mínima fragmentação citoplasmática permite taxas expressivas de sobrevivência ao descongelamento.^(12,122) Quando previamente biopsiados para estudo genético pré-implantacional, a taxa de sobrevivência embrionária cai significativamente.⁽¹²³⁾

Veeck⁽¹¹⁸⁾ demonstrou que o estágio de desenvolvimento em que o embrião é congelado não interfere na taxa de sobrevivência; a autora alcançou índices de 78,6% e 77,2%, respectivamente, para embriões clivados e em estágio de blastocisto. Uma década antes, Veeck *et al.*⁽¹⁴⁾ já demonstravam sobrevivência de 68% para oócitos em estágio de pronúcleo. Hartshorne *et al.*,⁽¹²⁴⁾ há pouco mais de uma década antes de Veeck⁽¹¹⁸⁾, conseguiram cifras de sobrevivência na ordem de 55% para blastocistos. Outros autores,^(74,86,88,125,126) da mesma forma, assemelharam-se aos índices aqui apresentados. Foram relatadas taxas de 63% por Quintans *et al.*⁽⁸⁰⁾ e de 74,4% por Boldt *et al.*⁽⁸⁴⁾ quando utilizados os mesmos meios de laboratório desta pesquisa. O uso da vitrificação como método de criopreservação de oócitos humanos também se apresenta com índices muitas vezes discordantes.^(127,128)

4.2.2. Comparação quanto às Taxas de Gravidez Clínica e Implantação Embrionária

Na avaliação das taxas de gravidez e implantação embrionária entre os embriões oriundos do GOc e do GE, não houve entre os grupos diferença significativa nesses eventos. A taxa de implantação no GOc foi de 11,3%, ao passo que no GE foi de 2,8% ($p=0,06$). Um quarto das mulheres pertencentes ao GOc teve gravidez clínica, ao passo que 9,4% das do GE tiveram a mesma sorte ($p=0,20$). Os dados encontram-se disponibilizados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação das taxas de gravidez clínica e implantação embrionária entre mulheres com embriões procedentes de descongelamento oocitário ou embrionário.

Taxas	Grupo	n	%	p
Taxa de gravidez clínica	GOc	4	25	0,20
	GE	3	9,4	
Taxa de implantação embrionária	GOc	6	11,3	0,06
	GE	3	2,8	

GOc= Grupo oócito congelado; GE= Grupo embrião; n= Tamanho da amostra; %= Percentual; p= Nível de significância utilizando teste exato de Fisher.

Considerando a importância clínica deste desfecho, a análise desses resultados com base no risco relativo revelou que os embriões das mulheres do GE implantaram-se 76% menos que os do GOc ($RR=0,24$; $IC95\%=0,06-0,93$),

e que a possibilidade de gravidez também foi menor em 62% (RR=0,38; IC95%=0,10–1,48).

Embora as taxas de implantação não sejam estatisticamente diferentes entre os grupos, observou-se uma tendência à significância ($p=0,06$) em favor ao GOc. Justificar tal efeito é obscuro; porém, pode-se conjecturar que o tamanho reduzido da amostra e a rigidez no pareamento dos grupos podem ter sido decisivos para justificar esses achados. Além disso, o fato de um dos casos de gravidez, dentre os quatro observados no GOc, ter obtido gestação trigemelar fez com que a taxa de implantação fosse elevada a um nível bem superior; fato não observado nos três casos de gestação do grupo GE, em que todos foram gestação única.

Os resultados relacionados à gestação clínica igualmente não tiveram diferença significativa entre os grupos, embora uma análise utilizando-se o risco relativo possa denotar importância clínica ao interpretar tais diferenças. As razões para tais resultados novamente presumem a limitação numérica da amostra e a rigidez nas equivalências entre os grupos.

A estimativa global de sucesso da criopreservação aponta uma redução no potencial para gravidez na ordem de 30%, o que pode frustrar uma expectativa preliminarmente estabelecida.⁽¹²⁹⁾ Ao analisar o conjunto de dados deste trabalho, observou-se que eles não são demasiadamente sobejados ou discordantes da literatura. Chen *et al.*⁽¹³⁰⁾ relataram taxas de gravidez e implantação semelhantes, quando compararam oócitos e embriões congelados; um índice de 33% de gestação foi alcançado com o descongelamento de oócitos. Relatos de Yang *et al.*,⁽¹³¹⁾ Fosas *et al.*⁽¹³²⁾ e

Porcu *et al.*⁽¹²⁵⁾ mostraram taxas semelhantes de gravidez, na ordem de 50%, com embriões a partir de oócitos a fresco ou congelados. Embora Trounson,⁽⁵⁸⁾ na década de 80, considerasse muito improvável que os resultados comparativos entre embriões provenientes das técnicas de criopreservação fossem semelhantes àqueles oriundos a fresco, o progresso nas técnicas e seus resultados contrapuseram-se ao declarado.^(84,133,134) A eficácia clínica da criopreservação de oócitos tem-se tornado cada vez mais atrativa dada a sua segurança em relação aos nascimentos até hoje relatados.^(130,135)

O potencial de implantação embrionária vai depender da sobrevivência embrionária pós-descongelamento e da sua capacidade de reassumir as mitoses. O estado pré-congelamento assume importância deliberativa. Tal fato foi eloqüentemente considerado por Camus *et al.*,⁽¹²²⁾ ao afirmarem a necessidade da simetria de blastômeros e a ausência de fragmentação citoplasmática como fatores decisivos para a implantação embrionária; aqueles embriões com menos de 50% de sobrevivência e com mais de 20% de fragmentação perdem a capacidade de fixação.^(12,122)

Entretantes, também causa hesitação o fato do GOc, apesar do justificado, demonstrar índices de implantação notavelmente superiores aos embriões congelados, mesmo com um risco relativo de 1,86 de apresentar maus embriões devido à fragmentação citoplasmática superior a 20%.

A taxa de implantação de 2,6% para embriões congelados aqui referida assemelha-se à publicada por Testart *et al.*,⁽¹³⁶⁾ Machtinger *et al.*⁽¹³⁷⁾ e Seeling *et al.*⁽¹³⁸⁾ Contudo, grande parte das publicações referem índices superiores, independente do estágio de desenvolvimento do embrião no momento do

congelamento, fortalecendo a idéia da importância da qualidade pré-congelamento.^(29,124,139-141)

A implantação embrionária conseguida a partir de oócitos congelados assemelha-se a muitas publicações com resultados de congelamento embrionário, demonstrando a alta eficácia do congelamento oocitário a partir do protocolo de criopreservação aqui apresentado.

Se de um lado existe o contentamento pelos resultados conseguidos com oócitos congelados, de outro fica a preocupação ou o questionamento por aqueles resultados conseguidos com os embriões criopreservados. Novamente, acredita-se que a rigidez metodológica associada à pequena amostra influenciou os números finais; também, como lenitivo, esse nosso mesmo serviço, em uma avaliação sem seleção amostral, conseguiu índices de implantação de 11,4% no ano de 2004. Uma amostragem ampla poderá apontar novos números e permitir que taxas equiparadas aos da literatura sejam obtidas.

Até o momento, é cada vez mais refutado^(21,63,70,117,142-144) o receio do possível efeito negativo do congelamento e dos meios crioprotetores na indução de lesões sobre o fuso meiótico, lesões cromossômicas ou outras anomalias.

Contrapondo a tendência de transferir um número cada vez menor de embriões com a sobra de oócitos maduros nas estimulações e a hesitação em congelar embriões, esta tecnologia vem acalantar o contexto e favorecer condutas sensatas.

Com base nos dados expostos e nos nascimentos oriundos do produto desta pesquisa, ou mesmo da literatura,^(118,125) pode-se apontar para uma aceitável segurança e aplicabilidade clínica da técnica.

Os resultados aqui apresentados põem em evidência o progressivo domínio sobre a técnica da criopreservação de oócitos e suscita a necessidade que ela não se resigne a recônditos centros de reprodução assistida. Combinar harmoniosamente os anseios do paciente à real necessidade percebida pelo médico deve resultar numa atitude eticamente apropriada; pelo que, oferecer este recurso tecnológico com eficácia é dever.

Embora estes resultados estejam baseados em um limitado número de ciclos, a presente pesquisa não pretende estabelecer condutas, mas quer, de certa forma, ser ousada em sugerir a criopreservação de oócitos como alternativa ao congelamento e a estocagem de embriões humanos. O prosseguimento do estudo, somado aos dados da literatura, servirá para fortificar esta recomendação.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

No presente estudo, em que foi comparado o desempenho reprodutivo de mulheres submetidas às técnicas de RA utilizando oócitos congelados ou a fresco, pode-se concluir o que segue:

5.1. Quanto às Taxas de Fertilização, Clivagem e Qualidade Embrionária

As taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária foram semelhantes quando comparados embriões oriundos de oócitos congelados e a fresco. Na análise específica das velocidades de clivagens adequadas, os embriões oriundos de oócitos congelados tiveram a velocidade significativamente menor que aqueles a fresco.

5.2. Quanto às Taxas de Sobrevivência ao Descongelamento

As taxas de sobrevivência ao descongelamento foram significativamente inferiores para os oócitos do que para os embriões.

5.3. Quanto às Taxas de Gravidez e Implantação

As taxas de gravidez e implantação foram semelhantes entre embriões descongelados e embriões originados a partir de oócitos descongelados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, *et al.* High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8(7):1061-6.
2. Tiitinen A, Halttunen M, Harkki P, Vuoristo P, Hyden-Granskog C. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16(6):1140-4.
3. Queenan JT, Jr. Embryo freezing to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1-2):79-83
4. Normas éticas para utilização das técnicas de reprodução assistida. In: Medicina CFd, editor. 19/11/1992 ed: Diário Oficial; 1992. p. 16053.
5. Lei nº. 11.105. In: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm.
6. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Registro Latinoamericana de Reproducción Asistida. Chile: Red; 2002/2003.
7. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1(8486):884-6.

8. Oktay K, Buyuk E, Davis O, Yermakova I, Veeck L, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen. *Hum Reprod* 2003;18(1):90-5.
9. Wilmut I. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J Reprod Fertil* 1972;31(3):513-4.
10. Willadsen SM TL, Rowson C, Polge C, Newcomb, R. Preservation of cow embryos in vitro. In: 8th Int Cong on Anim; 1976: *Reprod A I*; 1976. p. 329-331.
11. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305(5936):707-9.
12. Kondo I, Suganuma N, Ando T, Asada Y, Furuhashi M, Tomoda Y. Clinical factors for successful cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1996;13(3):201-6.
13. Troup SA, Matson PL, Critchlow JD, Morroll DR, Lieberman BA, Burslem RW. Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;38(2):133-9.

14. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, *et al.* Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993;59(6):1202-7.
15. Van der Elst J, Van den Abbel E, Vitrier S, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. Selective transfer of cryopreserved embryos with further cleavage after thawing increases delivery and implantation rates. *Human Reprod* 1997:1513-1521.
16. van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987;1(8535):752-3.
17. Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL, Massey JB. Clinical application of human egg cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13(11):3156-9.
18. Coticchio G, Bonu MA, Borini A, Flamigni C. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115 Suppl 1:S2-7.
19. Gook DA, Edgar DH. Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Hum Reprod* 1999;14(12):2938-40.

20. Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update* 2000;6(5):449-56.
21. Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod* 1994;9(4):684-91.
22. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, De Cesare R, Giunchi S. Obstetric, perinatal outcome and follow up of children conceived from cryopreserved oocytes. In: Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine; 2000; San Diego-CA: Fert Steril; 2000. p. S48.
23. Johnson MH, Pickering SJ, George MA. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988;3(3):383-7.
24. Mandelbaum J, Junca AM, Tibi C, Plachot M, Alnot MO, Rim H, *et al.* Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:550-61.
25. Porcu E, Fabbri R, Ciotti, P.M., Frau, F., De Cesare, R. and Venturoli, S. Oocyte or embryo storage? *Fertil Steril* 2002;78(Suppl):S15.

26. Yang DS, Winslow, K. L., Blohm, P.L., Brown, S.E., Ngyyen, K., Brubaker, C. Oocyte donation using cryopreserved donor oocytes. *Fertil Steril* 2002;78(Suppl 1):S14.
27. Stachecki J, Cohen J, Willadsen S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biol Reprod* 1998;59:396-400.
28. Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Van Maele G, Dhont M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000;74(3):487-94.
29. Toner JP, Brzyski RG, Oehninger S, Veeck LL, Simonetti S, Muasher SJ. Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on IVF outcome. *Hum Reprod* 1991;6(2):284-9.
30. Szell A, Shelton JN, Szell K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 1989;26(3):297-301.
31. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J Reprod Fertil* 1977;50(2):373-5.
32. Miyamoto H. Factors affecting the survival of mouse embryos during freezing and thawing. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986;3(1):15-9.

33. Leibo SP. Techniques for preservation of mammalian germ plasma. *Anim Biotech* 1992;3:139-153.
34. Voekel S. A. HYX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992;37:687-697.
35. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fertil* 1980;59(1):51-6.
36. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1981;63(1):175-80.
37. Trounson AO, Brand A, Aarts MH. Non-surgical transfer of deep-frozen bovine embryos. *Theriogenology* 1978;10(1):111-5.
38. Bouyssou B CD. Two-Step freezing of cattle blastocysts in french-straws. *Theriogenology* 1982;17:80.
39. Kennedy L G. BMP, Gordon I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology* 1983;19:823-832.

40. Chupin D PR. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology* 1984;21:230.
41. Lehn-Jensen H. Survival of cow blastocysts using cooling rates of 1°C/min to 25°C before plunging. *Theriogenology* 1983;19:138.
42. Jackowski S, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Exp Zool* 1980;212(3):329-41.
43. Leibo SP, Manzur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: *Methods in Mammalian Reproduction*. New York: Academic Press; 1978. p. 179-201.
44. Merry D. A. ARL, Krag K., Wright R. W. Sucrose dilution of frozen mouse embryos: Interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology* 1983;20:325-345.
45. Rall WF, Reid DS, Polge C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology* 1984;21(1):106-21.
46. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972;178(59):411-4.

47. Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C. *J Reprod Fertil* 1979;56(1):11-21.
48. Trounson AO. Cryopreservation. *Br Med Bull* 1990;46(3):695-708.
49. Takeda T. Equipment and techniques for thawing embryos. In: Jr GES, editor. *Techniques for freezing mammalian embryos*. Colorado; 1988. p. 46-50.
50. Fahning ML, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992;29(1):1-18.
51. Tao J, Craig RH, Johnson M, Williams B, Lewis W, White J, *et al.* Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertil Steril* 2004;82(1):108-18.
52. Hartshorne GM, Wick K, Elder K, Dyson H. Effect of cell number at freezing upon survival and viability of cleaving embryos generated from stimulated IVF cycles. *Hum Reprod* 1990;5(7):857-61.
53. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril* 1993;59(5):1070-4.

54. Edgar DH, Bourne H, Jericho H, McBain JC. The developmental potential of cryopreserved human embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1-2):69-72.
55. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, *et al.* Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003;18(9):1890-5.
56. Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P, Germond M. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* 2000;74(5):946-52.
57. Wang JX, Yap YY, Matthews CD. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum Reprod* 2001;16(11):2316-9.
58. Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1986;46(1):1-12.
59. Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf Rev Reprod Biol* 1992;14:73-100.
60. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987;2(3):207-16.

61. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;54(1):102-8.
62. Carrol J. WGM, Matthews C. D. Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod Fertil* 1989;85:489-494.
63. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2(8):695-700.
64. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res* 1987;16(4):343-54.
65. Sathananthan AH, Trounson A, Freemann L, Brady T. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988;3(8):968-77.
66. Van Blerkom J, Davis PW. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc Res Tech* 1994;27(2):165-93.
67. Johnson MH. The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethyl sulfoxide: an optimal protocol. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989;6(3):168-75.

68. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 1987;100(2):313-24.
69. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil* 1990;89(1):253-9.
70. Gook DA, Osborn SM, Johnston WI. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8(7):1101-9.
71. Ashwood-Smith MJ, Morris, G.W., Fowler, R. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 1988;3:795-802.
72. Vincent C, Turner K, Pickering SJ, Johnson MH. Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Mol Reprod Dev* 1991;28(4):394-404.
73. Schroeder AC, Schultz RM, Kopf GS, Taylor FR, Becker RB, Eppig JJ. Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. *Biol Reprod* 1990;43(5):891-7.

74. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001;16(3):411-6.
75. Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J Anim Sci* 1990;68(9):2803-10.
76. Lim JM, Fukui, Y., Ono, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 1991;35:1225-1235.
77. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida: Manual de procedimientos laboratorio de reproducción asistida. In. Chile; 1998. p. 67.
78. Edwards RG. The pronucleate egg and syngamy. In: Edwards RG, editor. *Conception in the human female*. London: Academic Press; 1980. p. 617.
79. Kazem R TLA, Srikantharajah A, Laing M A, Hamilton M P, Templeton A. Cryopreservation of human oocyte and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;Oct 10(10):2650-4.

80. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS. Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Hum Reprod* 2002;17(12):3149-52.
81. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16(12):2658-61.
82. Qublan HS, Malkawi HY, Tahat YA, Areidah S, Nusair B, Khreisat BM, *et al.* In-vitro fertilisation treatment: factors affecting its results and outcome. *J Obstet Gynaecol* 2005;25(7):689-93.
83. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med* 2002;47(7):540-4.
84. Boldt J, Cline D, McLaughlin D. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2003;18(6):1250-5.
85. Porcu E. Oocyte cryopreservation. In: Gardner D K WA, Howles C M and Shoham Z, editor. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. London: Martin Dunitz Ltda; 2001.

86. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Seracchioli R, Ciotti PM, *et al.* Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl 4:98-108.
87. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68(4):724-6.
88. Notrica J, Divita A, Neuspiller F, Arenas G, de Fried EP. Healthy girl born after cryopreservation of gametes and ICSI in a patient with seminoma. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):620-2.
89. Azambuja R, Stachecki J, Badalotti M, Michelon J, Petracco A. Nascimento de feto a termo após congelamento de oócitos. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2002;6(3):119-121.
90. Boiso I, Veiga A, Edwards RG. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online* 2002;5(3):328-50.
91. Van Royen E. Characterization of a top quality embryo, a step toward single embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14:2345-2349.
92. Veeck L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veeck L, editor. *An atlas of human gametes and conceptuses*. London: Parthenon Publishing; 1999. p. 46-51.

93. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999;71(5):836-42.
94. Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999;14(10):2581-7.
95. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12(7):1545-9.
96. Volpes A, Sammartano F, Coffaro F, Mistretta V, Scaglione P, Allegra A. Number of good quality embryos on day 3 is predictive for both pregnancy and implantation rates in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004;82(5):1330-6.
97. Guerif F BR, Cadoret V, Couet M L, Lansac J, Royere D. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Hum Reprod* 2002;17(5):1321-6.

98. Dozortsev D EA, El-Mowafi D M, Diamond M. The impact of cellular fragmentation induced experimentally at different stages of mouse preimplantation development. *Hum Reprod* 1998;13(5):1307-11.
99. Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev* 1997;68(1-2):3-25.
100. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996;2(2):93-8.
101. Staessen C, Nagy ZP, Liu J, Janssenswillen C, Camus M, Devroey P, *et al.* One year's experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection programmes. *Hum Reprod* 1995;10(12):3305-12.
102. Alikani M, Olivennes F, Cohen J. Microsurgical correction of partially degenerate mouse embryos promotes hatching and restores their viability. *Hum Reprod* 1993;8(10):1723-8.
103. A L. When oocytes grow old. *Orgyn* 1999;10(3):8-11.
104. Michelon J, Boeno, A., Azambuja, R., Badalotti, M., Badalotti, F., Petracco, A. Does the inclusion of low quality embryos at the moment of transfer interfere in vitro fertilization results? *Fertil Steril* 2003;80(Supl. 3):158-9.

105. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, *et al.* Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995;10(9):2427-31.
106. Alikani M, Schimmel T, Willadsen SM. Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder. *Mol Hum Reprod* 2005;11(5):335-44.
107. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999;14(2):429-47.
108. Brezinova J, Svobodova M, Krskova M, Fingerova H, Machac S. [Effect of early cleavage of embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into oocytes on results of fertilization in vitro (IVF) and embryo transfer (ET)]. *Ceska Gynekol* 2004;69(1):37-42.
109. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1(2):91-148.
110. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic

- sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;13(1):182-7.
111. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12(7):1531-6.
112. Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, *et al.* Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril* 1999;72(4):679-85.
113. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16(12):2652-7.
114. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001;16(2):313-8.
115. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64(2):382-91.

116. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15(8):1717-22.
117. Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998;15(3):129-39.
118. Veeck LL. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reprod Biomed Online* 2003;6(3):367-74.
119. Bongso A, Chye NS, Sathananthan H, Mui-Nee L, Mok H, Wong PC, *et al.* Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid methods using two different cryoprotectants. *Fertil Steril* 1988;49(5):908-12.
120. Testart J, Lassalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, *et al.* Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987;48(1):107-12.
121. Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfmann AD, Bender SD, Schulman JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988;50(2):273-8.

122. Camus M, Van den Abbeel E, Van Waesberghe L, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC. Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril* 1989;51(3):460-5.
123. Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munne S. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* 1999;14(3):770-3.
124. Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991;6(1):136-41.
125. Porcu E, Fabbri R, Petracchi S, Ciotti PM, Flamigni C. Ongoing pregnancy after intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(4):1044-5.
126. Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2005; 21(2): 370-5.
127. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3):300-8.

128. Chen SU, Lien YR, Chao K, Lu HF, Ho HN, Yang YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 2000;74(4):804-8.
129. Edgar DH, Archer J, Bourne H. The application and impact of cryopreservation of early cleavage stage embryos in assisted reproduction. *Hum Fertil (Camb)* 2005;8(4):225-30.
130. Chen SU, Lien Y.R., Chen, H.F., Chang, L.J., Tsai, Y.Y., Yang, Y.S. Birth of a healthy baby after transfer of blastocysts derived from cryopreserved human oocytes fertilized with frozen spermatozoa. *Fertil Steril* 2005;83(5):1547-9.
131. Yang DS, Blohm, P.L., Kramer, I., Ngyyen, K., Zhao, Y.L., Winslow, K. L. A successful human oocyte cryopreservation regime: survival, implantation, and pregnancy rates are comparable to that of cryopreserved embryos generated from sibling oocytes. *Fertil Steril* 1999;72(Suppl 1):S86.
132. Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, *et al.* The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Hum Reprod* 2003;18(7):1417-21.

133. Winslow KL, Yang, D., Blohm, P.L., Brown, S.E., Jossim, P., Nguyen, K. Oocyte cryopreservagion-a three year follow up of sixteen births. *Fertil Steril* 2001;76(Suppl):S120.
134. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, *et al.* Clinical experieence and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1-2):33-7.
135. Coticchio G, Bonu MA, Bianchi V, Flamigni C, Borini A. Criteria to assess human oocyte quality after cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2005;11(4):421-7.
136. Testart J, Volante, M., Lassalle, B., Gazengel, A., Belaisch-Allart, J., Hazout, A., De Ziegler, D., Frydman, R. Comparision of cryoprotectants and stages of human embryo. In: Maschiach S, Ben-Rafael, Z., Laufer, N., Schencker, J.G, editor. *Advances in Assisted Reproductive Technologies: Plenum*; 1990. p. 573-585.
137. Machtinger R, Dor J, Levron J, Mashiach S, Levran D, Seidman DS. The effect of prolonged cryopreservation on embryo survival. *Gynecol Endocrinol* 2002;16(4):293-8.
138. Seelig AS, Al-Hasani S, Katalinic A, Schopper B, Sturm R, Diedrich K, *et al.* Comparison of cryopreservation outcome with gonadotropin-releasing

- hormone agonists or antagonists in the collecting cycle. *Fertil Steril* 2002;77(3):472-5.
139. Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, *et al.* High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertil Steril* 2004;82(5):1418-27.
140. Konc J, Kanyo K, Cseh S. Clinical experiences of ICSI-ET thawing cycles with embryos cryopreserved at different developmental stages. *J Assist Reprod Genet* 2005;22(5):185-90.
141. Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, Wirthner D, Germond M. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2006;21(1):234-9.
142. Cobo A, Rubio, C., Gerli, S., Ruiz, A., Pellicer, A., Remohi, J. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001;75(2):354-60.
143. Gook DA, Schiewe MC, Osborn SM, Asch RH, Jansen RP, Johnston WI. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995;10(10):2637-41.

144. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002;78(3):449-54.

7. APÊNDICES

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de compromisso utilizado no estudo para utilização de dados em prontuários de pacientes e bases de dados em estudos retrospectivos.

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS EM PRONTUÁRIOS DE PACIENTES E BASES DE DADOS EM ESTUDOS RETROSPECTIVOS

<p>Título do Estudo</p> <p>EFICÁCIA DO CONGELAMENTO DE OÓCITOS HUMANOS EM PROGRAMA DE FERTILIZAÇÃO ASSISTIDA</p>

Os autores do presente estudo se comprometem a manter o sigilo dos dados coletados em prontuários e bases de dados referentes a pacientes atendidas na Clínica Fertilitat. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Dr. Álvaro Petracco – Pesquisador

Prof. Dr. Antonio Helio Oliani – Orientador

Apêndice 2. Protocolos de estudo.

PROTOCOLO DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* (FIV)

Estimulação ovariana

O uso dos análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (a-GnRH) é iniciado na metade da segunda fase do ciclo menstrual que antecede a FIV (down regulation) por administração seqüencial até conseguir o completo bloqueio hipofisário, comprovado pela dosagem sérica de estradiol abaixo de 40pg/ml, e mantido de forma contínua até que a injeção de gonadotrofina coriônica humana (hCG) seja usada para provocar a maturação oocitária e planejar a foliculo-aspiração. A partir da dessensibilização hipofisária associam-se as gonadotrofinas com o propósito de estimular o desenvolvimento folicular. As drogas usadas para este fim variaram entre o uso de gonadotrofina menopáusica humana (HMG); hormônio foliculo estimulante recombinante (r-FSH) ou a associação entre ambos. As gonadotrofinas são mantidas até o momento em que os folículos atingem o tamanho de 18 a 20mm, quando administra-se a gonadotrofina coriônica humana (HCG) para determinar o final do processo maturacional do oócito incluindo a expansão do complexo de células cúmulus-corona. Passadas 33 a 36 horas da aplicação do HCG realiza-se a foliculo-aspiração.

Fase laboratorial

Os oócitos recuperados são transferidos para meio Human Tubal Fluid (HTF) a 37°C e 5% de CO₂. Passadas duas horas é realizada a desnudação dos oócitos por meio de pipetagens, depois de permanecerem em solução de

hialuronidase por 30 segundos e transferidos ao meio flushing [HTF Hepes 10% de Solução Serum substitute supplement – Irvine scientific (SSS)]. Segue-se com a avaliação dos oócitos quanto a sua maturidade; aqueles em estágio de metáfase II são inseminados com espermatozóides, previamente coletado pelo companheiro sexual. Os oócitos são distribuídos em gotas de 5µl de meio de micromanipulação (HTF Hepes 20%de SSS) e o sêmen em gotas de Polivinilpirarolidona (PVP). No procedimento de injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI), a agulha de injeção contendo o espermatozóide é introduzida às 3 horas no oócito com o corpúsculo polar posicionado às 6 ou 12 horas evitando, desta forma, alguma alteração mecânica no oócito, uma vez que o fuso meiótico do oócito em metáfase II se localiza nas proximidades do corpúsculo polar. Os oócitos inseminados, previamente lavados em HTF com 7,5% de SSS, são transferidos para gotas de HTF 7,5% de SSS e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A ocorrência de fertilização é verificada 18 a 20 horas após a inseminação, pela observação dos dois pronúcleos e dos dois corpúsculos polares.

Os zigotos originados são transferidos para gotas de cultivo (HTF com 15% de SS) e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até o momento de sua transferência ou congelamento. O acompanhamento do desenvolvimento embrionário é feito diariamente.

Transferência embrionária

A transferência embrionária para o útero é realizada no segundo ou terceiro dia após a foliculo-aspiração. Em posição ginecológica e sem nenhum

tipo de sedação, a transferência é realizada sob visão ultra-sonográfica e com a bexiga cheia a um centímetro do fundo da cavidade uterina.

Fase lútea

O suporte de fase lútea é feito com Progesterona tópica vaginal (Crinone 8% - Laboratório Serono) desde o dia da foliculo-aspiração até a comprovação da gestação por teste sanguíneo de β HCG; em caso de gestação é mantido até 12 semanas de evolução.

PROTOCOLO DE PREPARO ENDOMETRIAL PARA TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA EM CICLO DE FIV SEM ESTIMULAÇÃO OVARIANA

Naqueles ciclos de transferência embrionária a partir do descongelamento de oócitos ou embriões o preparo endometrial é realizado com o uso de a-GnRH na metade da segunda fase do ciclo menstrual que antecede a transferência e mantido por administração seqüencial até o dia de início da progesterona. Quando o bloqueio hipofisário é atingido, comprovado pela dosagem sérica de estradiol abaixo de 40pg/ml, inicia-se o uso de 17 β estradiol [Estrofem 2mg (Medley S. A. – Brasil)] em doses crescentes. Considerando o primeiro dia do ciclo quando o 17 β estradiol passa a ser administrado, inicia-se o uso com 2mg ao dia por três dias, depois, passa-se para 4mg ao dia por mais três dias, depois, 6mg ao dia mais três dias e, na seqüência, pode-se chegar à dose máxima de 10mg ao dia até que o endométrio atinja a espessura mínima de 9mm, onde se estabiliza e mantém a dose do estradiol e inicia-se o uso diário de Progesterona tópica vaginal (Crinone 8% - Laboratório Serono). A

transferência ocorre no quarto dia de início da progesterona. A associação do Estradiol e a Progesterona é mantida até a comprovação da gestação por teste sanguíneo de β HCG; em caso de gestação é mantido até 12 semanas de evolução.

Quando o ciclo é preparado para transferência de embriões a partir de oócitos congelados, estes são descongelados e inseminados no segundo dia de uso da progesterona. Quando a transferência é de embriões congelados, estes são descongelados e transferidos no quarto dia de uso da progesterona.

Apêndice 3. Formulário de dados utilizado como banco de dados que inclui informações a partir da evolução oócito-embrionária, até o desfecho clínico de gravidez.

Caso	FrescDesc	NumOO	SobrevDesc	ObsSobrev	DestDesc	Insem	Fert	NumPN	ObsFert	Dest	Clivagem	NumCel2°	Simetr2°	%Fragm2°	Grau2°	Obs2°	Dest2°	NumCel3°	Simetr3°	%Fragm3°	Grau3°	Obs3°	Dest3°
LEGENDA:																							
FrescDesc: 0=Oócito descongelado 1=Oócito à fresco																							
NumOO: Número do oócito																							
SobrevDesc: 0=viável 1=inviable																							
ObsSobrev: Observações referentes ao oócito descongelado																							
DestDesc: 0=Segue desenvolvimento 1=Inviabilidade																							
Insem: 0=Sim 1=Não																							
Fert: 0=Sim 1=Não																							
NumPN: 0=2PN 1=1PN 2=3PN																							
Dest: 0=Segue desenvolvimento 1=Inviabilidade 2=Transferido 3=Congelado																							
Clivagem: 0=Sim 1=Não																							
NumCel2°: Número de células do embrião no segundo dia de evolução																							
Simetr2°: 0=Sim 1=Não																							
%Fragm2°: Percentual de fragmentação citoplasmática no 2° dia de evolução																							
Grau 2°: Grau morfológico do embrião no segundo dia de evolução																							
Obs2°: Observações referentes aos embriões																							

Apêndice 5. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 003/2006-CEP

Porto Alegre, 03 janeiro de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Eficácia do congelamento de oócitos humanos utilizando-se a colina como crioprotetor".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Caio Coelho Marques
COORDENADOR EM EXERCÍCIO

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Álvaro Petracco
N/Universidade

Apêndice 6. Modelo de relatório a ser encaminhado semestralmente ao Comitê de
Ética em Pesquisa.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATOLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



RELATÓRIO DE ACOMPANHAMENTO DE PESQUISA

Senhor(a) Pesquisador(a):

É dever do CEP acompanhar e zelar pela realização da pesquisa da forma como foi aprovada, solicitando relatórios aos pesquisadores. De acordo com o item VII.13.d., da Resolução CNS 196/96, tais relatórios deverão ser anuais (parciais ou finais, em função da duração da pesquisa). Nos trabalhos sobre "Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos ou não registrados no país" (área temática especial número 03), os relatórios deverão ser semestrais (Resolução CNS 251/97, item V.1.c). Portanto, solicitamos a Vossa Senhoria encaminhar ao CEP, relatório de sua pesquisa conforme situação da pesquisa acima discriminada.

Titulo do Projeto:	
"Eficácia do congelamento de oócitos humanos utilizando-se a colina como crioprotetor"	
Pesquisador: Álvaro Petracco	
Aprovação CEP: 03/01/2006	Aprovação CONEP: data:
Relatórios Entregues: 03/07/2006	
Relatório(s) do pesquisador responsável previsto(s) para:	
Data: _____ data: _____	
Relatório 1: data: _____	Relatório 3: data: _____
Relatório 2: data: _____	Relatório 4: data: _____
Tipo de Pesquisa:	
SIM NÃO	
Residente: <input type="checkbox"/>	Projeto multicêntrico: <input type="checkbox"/> Fase: <input type="checkbox"/>
Doutorado: <input type="checkbox"/>	Nacional: <input type="checkbox"/>
Mestrado: <input type="checkbox"/>	Internacional: <input type="checkbox"/> Trabalho conclusão: <input type="checkbox"/>
1. Situação atual do projeto	2. Nº de pessoas pesquisadas:
Não iniciado <input type="checkbox"/>	Pessoas Previstas:
retirado data: _____	Pessoas incluídas:
Em execução: <input type="checkbox"/> Data início: _____	Pessoas em outras Instituições:
_____ Data término: _____	3. Nº de participantes excluídos:
Interrompido temporariamente data: _____	4. Eventos adversos graves:
Encerrado data: _____	No centro: <input type="checkbox"/> em outros centros: <input type="checkbox"/>
5. Recursos financeiros necessários:	
Ainda não disponíveis <input type="checkbox"/>	Já disponíveis <input type="checkbox"/> Insuficientes <input type="checkbox"/>
6. Resultado total (local)	
7. Observações:	
8. Parecer CEP:	

Obs: Confira e atualize os dados acima, referentes ao seu Projeto de Pesquisa, e encaminhe nesta mesma folha para o CEP.

Ass. Pesquisador

Coordenador do CEP