CLÁUDIA MESSIAS GOMES

Influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas e de mulheres maturados *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
Co-orientador: Prof. Dr. Péricles Hassun Filho

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Cláudia Messias
Influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas e de mulheres maturados *in vitro* / Cláudia Messias Gomes. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.
Co-orientador: Péricles Hassun Filho.

Descritores: 1.Oócitos 2.Meiose 3.Criopreservação 4.Vitrificação 5.Microscopia de luz polarizada 6.Imunocitoquímica

USP/FM/DBD-081/11

Dedicatória

Ao meu pai, Dalton Scarpin Gomes, exemplo de médico e ser humano e à minha mãe Àurea Regina Messias Gomes, exemplo de carinho e dedicação. Vocês são os responsáveis pela pessoa que sou e pela felicidade e satisfação que sinto neste momento. Muito obrigada por tudo.

Ao Rubens Aiello Padilla, obrigada pela compreensão, companheirismo e principalmente pelo carinho e amor da nossa convivência diária. Sinto-me privilegiada e feliz por ter você ao meu lado. Te amo muito.

Às minhas irmãs Caroline e Renata, meus avós Sady, Judith, Vilma e Jairo e a toda minha família. Vocês são muito importantes na minha vida.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat, mestre da ciência médica e da arte de ensinar. Obrigada pelo incentivo e confiança de sempre.

.

Aos Professores Doutores Paulo Cesar Serafini e Eduardo Leme Alves da Motta, modelos de profissionalismo e dedicação pela medicina, pela ciência e pela paciente. Obrigada pelos ensinamentos diários e.por disponibilizar o seu tempo e trabalho para realização deste estudo.

Ao Professor Doutor Gary Daniel Smith, pelo constante incentivo e apoio científico. Obrigada pelo carinho e respeito com que me recebeu na Universidade de Michigan.

Aos Professores Doutores Péricles Assad Hassun Filho e André Monteiro da Rocha. Minha eterna gratidão pelo suporte científico e humano em todos os momentos.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Doutores Thais Domingues, Paula Feetback, Paulo Bianchi, e Edward Carrilho. Muito obrigada pelo ajuda e companheirismo de todos os dias.

Aos meus amigos e colegas de trabalho José Roberto Alegretti, Mariana Ribeiro, Thelma Santos Criscuolo, Rachel di Falco Cossielo, Ana Luiza Sgarbi Rossi e toda equipe de embriologistas da Clínica Huntington. Obrigada pela disposição de seu tempo e pela excelência técnica que foram fundamentais para a realização deste estudo.

À equipe da Gênesis Genetics, especialmente à Doutora Tânia Freitas Vulcani. Obrigada pelas sugestões, pelo cuidado e seriedade com que contribuíram para este estudo.

Aos meus colegas do Centro de Reprodução Humana Mário Covas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Muito obrigada pelo profissionalismo e pela compreensão da minha ausência em diversos momentos dedicados a este estudo.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ix
LISTA DE GRÁFICOS x
LISTA DE FIGURAS xi
RESUMO xiv
SUMMARY xvi

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA 1

1.2 O FUSO MEIÓTICO DOS OÓCITOS 5
1.2.1 MÉTODOS PARA ESTUDO DO FUSO MEIÓTICO 9

1.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O FUSO MEIÓTICO OOCITÁRIO 12

1.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS 20

1.5 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO 24
1.5.1 CONGELAÇÃO LENTA 24
1.5.1.1 CONCEITO 24
1.5.1.2 HISTÓRICO 24
1.5.1.3 RESULTADOS CLÍNICOS 26
1.5.2 VITRIFICAÇÃO 28
1.5.2.1 CONCEITO 28
1.5.2.2 HISTÓRICO 29
1.5.2.3 RESULTADOS CLÍNICOS 30

1.6 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS 34

2 OBJETIVOS 40

2.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS 40

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS 40

3 MÉTODOS 42

3.1 EXPERIMENTO 1 42
3.1.1 CASUÍSTICA 42
3.1.2 MÉTODOS 42
3.1.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS 42
3.1.2.2 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* 43
3.1.2.3 ANÁLISE DO FUSO MEIÓTICO 44
3.1.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 45

3.2 EXPERIMENTO 2 45
3.2.1 CASUÍSTICA 45
3.2.1.1 PACIENTES 45
3.2.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 46
3.2.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 46
3.2.1.4 CONSENTIMENTO E FINANCIAMENTO 46
3.2.2 MÉTODOS 47
3.2.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS 47
3.2.2.2 PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO/ AQUECIMENTO 48
3.2.2.2.1 CONGELAÇÃO LENTA 48
3.2.2.2.2 VITRIFICAÇÃO 50
3.2.2.3 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* 52
3.2.2.4 ANÁLISE DO FUSO MEIÓTICO 53
3.2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 53

4 RESULTADOS 55

4.1 EXPERIMENTO 1 55

4.2 EXPERIMENTO 2 60

5 DISCUSSÃO 65

5.1 EXPERIMENTO 1 65

5.2 EXPERIMENTO 2 71

6 CONCLUSÕES 81

6.1 EXPERIMENTO 1 81

6.2 EXPERIMENTO 2 82

7 REFERÊNCIAS 83

APÊNDICES 95

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Sobrevivência e gestação clínica após criopreservação de óocitos humanos pela técnica de congelação lenta 32

Tabela 2 - Sobrevivência e gestação clínica após criopreservação de óocitos humanos pela técnica de vitrificação 33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de MI nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC) 57

Gráfico 2 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de MII nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC) 58

Gráfico 3 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de TI nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC) 59

Gráfico 4 – Porcentagem de sobrevivência dos oócitos criopreservados em estágio de GV pela técnica de congelação lenta (cinza) e pela técnica de vitrificação (preto) imediatamente após o descongelamento/ aquecimento (T0) e após 24 horas em cultura (T24) 62

Gráfico 5 – Porcentagem de oócitos de acordo com o estágio de maturação da divisão meiótica nos grupos A, B e C, após procedimento de maturação *in vitro*. Porcentagem de oócitos que permaneceram em estágio de GV (em branco), porcentagem de oócitos que evoluíram para estágio de MI (em cinza) e porcentagem de oócitos que maturaram até o estágio de MII (em preto) 63

Gráfico 6 – Porcentagem de fusos meióticos polimerizados de oócitos em estágio de MII nos grupos A, B e C 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático representando a divisão meiótica dos oócitos humanos. GV: vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II; CP: corpúsculo polar; 2n: célula diplóide; n: célula haplóide 2

Figura 2 – Oócitos humanos em estágio de vesícula germinativa (GV) derivados de ovários estimulados (a) e não estimulados (b) por gonadotrofinas exógenas. (Adaptado de Cha & Chian, 1998) 4

Figura 3 – Figura esquemática demonstrando os eventos da maturação oócitária relacionados ao fuso meiótico. No estágio de quebra da vesícula germinativa (GVBD) e reinício da meiose (representado na primeira linha), os microtúbulos (em verde) estão polimerizados radialmente ao redor da massa de cromossomos (círculo menor ao centro em azul) e se organizam progressivamente na estrutura bipolar do fuso meiótico. No final da metáfase I (MI) (segunda linha) o fuso meiótico bipolar migra em direção ao córtex oocitário. A migração do fuso meiótico induz a uma reorganização local do córtex oocitário (em rosa e vermelho). O primeiro corpúsculo polar é extruído seguindo o eixo do fuso meiótico. Durante a evolução para metáfase (MII) (terceira linha) o fuso meiótico metafisário encontra-se ancorado à membrana plasmática. A reorganização do córtex é mantida próxima ao fuso meiótico. A fertilização ou ativação experimental do oócito desencadeia a rotação de 90° do fuso meiótico e a extrusão do segundo corpúsculo polar. (Adaptado de Brunet & Maro, 2005) 7

Figura 4 – Corte seriado de um oócito humano criopreservado em estágio de GV e maturado *in vitro* corado com hematoxicilina – eosina. A configuração do fuso meiótico e dos cromossomos encontra-se completamente preservada (modificado de Mandelbaum *et al.*, 2004) 9

Figura 5 – Imagens representativas da visualização do fuso meiótico (destaque no quadro menor presente na porção inferior das figuras) de oócitos humanos por meio de microscopia confocal e imunocitoquímica (A) e por meio de microscópio com luz polarizada (B) (Modificado de Coticchio *et al.*, 2009) 10

Figura 6 – Imagens obtidas por meio de microscópio de luz polarizada (Polscope) durante vitrificação de oócitos humanos em magnificação de 200 X. Visualização do fuso meiótico durante a incubação dos oócitos nas soluções de vitrificação (WS: solução de lavagem; ES1, ES2, ES3: soluções de equilíbrio 1,2 e 3; VS: solução de vitrificação) (Modificado de Ciotti *et al*., 2009)..... 15

Figura 7 – Fotomicrografias do fuso meiótico oocitário após processo de criopreservação obtidas por meio de microscopia confocal. O fuso meiótico é representado em verde e os cromossomos em vermelho. A: fuso meiótico normal com os cromossomos alinhados na placa equatorial; B: fuso meiótico alongado com cromossomos desalinhados; C: desarranjo do fuso meiótico com alinhamento dos cromossomos; D: completo desarranjo tanto do fuso meiótico quanto dos cromossomos; D(i): fuso meiótico com aparência semelhante ao D, porém com mínima quantidade de microtúbulos (modificado de Bromfield *et al*., 2009)..... 16

Figura 8 – Imagens obtidas de microscópio fluorescente Leica DMR com magnificação de 400 X. Os oócitos foram fixados e foi realizada análise do fuso meiótico por imunocitoquímica. Com duas horas após aquecimento não houve diferença quanto às características do fuso meiótico entre o grupo vitrificado (Vitr) e o grupo exposto isoladamente aos crioprotetores (Sol. Exp). PB: corpúsculo polar (Modificado de Gomes *et al.*, 2008) 18

Figura 9 – Visualização dos oócitos em telófase I (A) e metáfase II (B) em microscópio de luz invertida com aumento de 400X (Leica DMIRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha, equipado com Hoffman Modulation Contrast)..... 43

Figura 10 – Sistema de armazenamento para oócitos vitrificados denominado Cryotip. A: Destaque para o tamanho e espessura da palheta de armazenamento. Para fins de comparação, uma moeda de um centavo de dólar é colocada juntamente na fotografia (Modificado de Gomes *et al*., 2008) 51

Figura 11 – Imagens obtidas de estereomicroscópio (Nikon SMZ645) mostrando oócito em estágio de GV sobrevivente (à esquerda) e não sobrevivente (à direita)..... 52

Figura 12 – Fotomicrografias dos oócitos de camundongas mostrando o fuso meiótico polimerizado e despolimerizado. As fotomicrografias coloridas demonstram a visualização do fuso meiótico polimerizado e despolimerizado pela técnica de imunocitoquímica (IC) (A1 e A3 respectivamente – oócito em metáfase I , B1 e B3 respectivamente- oócito em telófase I, C1 e C3 respectivamente- oócito em metáfase II). As fotomicrografias em preto e branco demonstram a visualização do fuso meiótico polimerizado e despolimerizado pela técnica de microscopia com luz polarizada (MLP) (A2 e A4 respectivamente – oócito em metáfase I , B2 e B4 respectivamente - oócito em telófase I, C2 e C4 respectivamente- oócito em metáfase II). CP- corpúsculo polar 55

Figura 13 – Fotomicrografia demonstrando oócito humano em estágio de MII analisado por microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 (aumento de 20X) equipado com uma câmera analógica de vídeo e um sistema de imagens que combina luz polarizada em cristal líquido denominado ICSI Guard (Octax™). À esquerda: fuso meiótico polimerizado (destacado pela seta branca). À direita: fuso meiótico despolimerizado, isto é, não detectado 64

RESUMO

Gomes CM. *Influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas e de mulheres maturados in vitro* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 94p.

Introdução: O fuso meiótico dos oócitos de mamíferos pode se despolimerizar quando exposto a pequenas variações de temperatura. Este fato já está bem estabelecido e estudado em oócitos maduros em metáfase II (MII). No entanto, pouco se sabe a respeito da influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico dos oócitos imaturos. Desse modo, este estudo tem como objetivos: 1) avaliar a influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas maturados *in vitro* e 2) avaliar o fuso meiótico em oócitos humanos maturados *in vitro* submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta ou por vitrificação quando em estágio de vesícula germinativa. **Métodos:** Realizaram-se dois experimentos, denominados 1 e 2, sendo o primeiro em oócitos de camundongas e o segundo em oócitos humanos. No experimento 1 oócitos imaturos de camundongas nos estágios de metáfase I (MI), telófase I(TI) e MII foram cultivados nas seguintes temperaturas: 37º C (controle), temperatura ambiente (22°C) e 4º C por 0, 10, 30 e 60 minutos. Após este período de tempo o fuso meiótico oocitário foi avaliado por meio de microscopia de luz polarizada (MLP) (LC-Polscope-Oosight™ image software) e imunocitoquímica (IC). No experimento 2 oócitos em estágio de vesícula germinativa (GV) coletados de pacientes submetidas à indução da ovulação e fertilização *in vitro*, foram divididos de forma randômica em três grupos: oócitos a fresco (A), oócitos congelados pela técnica de congelação lenta (B) e oócitos congelados pela técnica de vitrificação (C). Os oócitos a fresco, os descongelados e os aquecidos foram maturados *in vitro* até estágio de (MII). A análise do fuso meiótico foi realizada por microscópio invertido equipado com uma câmera de vídeo analógica e um sistema de imagens que combina luz polarizada em cristal líquido (ICSI Guard Octax™). **Resultados:** Experimento 1: No tempo 0 e à 37º C, todos os oócitos apresentavam o fuso meiótico visível tanto pela MLP quanto pela IC. À 4º C, o número de oócitos em MI com fuso meiótico visível por meio da MLP foi menor do que com a IC, e descresceu com o tempo, fato que também ocorreu, em menor proporção, com os oócitos em TI. No entanto, a 4º C, o reconhecimento do fuso meiótico dos oócitos em TI foi semelhante tanto para MLP como para IC. Quando os oócitos MII foram expostos à 4º C, a detecção do fuso meiótico teve descréscimo diretamente proporcional ao tempo de cultura quando foi utilizada a MLP, sendo que o mesmo ocorreu para a IC, porém de forma menos pronunciada. À temperatura ambiente houve um pequeno descéscimo na visualização do fuso meiótico tanto por MLP quanto por IC, porém este não foi estatisticamente significativo para os oócitos em

TI. Experimento 2: A taxa de sobrevivência imediatamente após o descongelamento/ aquecimento foi de 44,6% para o grupo B e de 79% para o grupo C. Após 24 horas em cultura , estas taxas passaram para 29,2% e 69%, respectivamente. A mediana de tempo para maturação foi de 26 horas para os grupos A e C, e de 27 horas para o grupo B. Ao final da maturação *in vitro* a porcentagem de oócitos em MII foi menor no grupo B e semelhante nos grupos A e C. Assim como para a detecção do fuso meiótico que foi menor no grupo B e similar nos grupos A e C. **Conclusões:** Houve diferença na porcentagem de despolimerização do fuso meiótico em resposta à baixa temperatura entre os oócitos de camundongas nos diferentes estágios da divisão meiótica, sendo menor nos oócitos em TI. A porcentagem de despolimerização do fuso meiótico foi diretamente proporcional ao tempo de cultivo, à exceção dos oócitos em TI à temperatura ambiente. Os oócitos hmanos em GV vitrificados apresentaram melhores taxas de sobrevivência quando comparados com oócitos humanos em GV criopreservados pelo congelamento lento. Os oócitos humanos em GV vitrificados apresentaram taxas semelhantes de maturação *in vitro* e detecção do fuso meiótico polimerizado quando comparados a oócitos a fresco.

Descritores: 1.Oócito 2.Meiose 3.Criopreservação 4.Vitrificação 5.Microscopia de luz polarizada 6.Imunocitoquímica

SUMMARY

Gomes CM. *Low temperature influence on meiotic oocyte spindle of mice and humans after maturation in vitro* [Thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 94p.

Introduction: The meiotic spindle of most mammals is sensitive to cooling and depolymerizes even after a slight reduction in temperature. This is well described and studied on matured oocytes at metaphase II (MII). However, little is known about the influence of low temperatures under meiotic spindle of imature oocytes. In this way, we sougth to evaluate: 1) the influence of low temperatures on mice oocyte meiotic spindle matured *in vitro* e 2) the oocyte meiotic spindle from human oocytes matured *in vitro* and cryopreserved by slow-rate freezing or vitrification at GV stage. **Methods:** Two experiments were done: the first one on mice and the second one on women.At experiment 1, immature mice oocytes at metaphase I (MI), telophase I (TI) and MII were cultured at 37º C (control), room temperature (22°C) and 4º C for 0, 10, 30 and 60 minutes and then spindle analysis was made with polarized light microscopy (PLM) (LC-Polscope-Oosight™ image software) or immunocytochemistry (ICC). At experiment 2, GV oocytes retrieved from women submitted to ovulation induction and *in vitro* fertilization were randomly divided in three groups: fresh oocytes (A), cryopreserved by slow-freezing (B) and cryopreserved by vitrification (C). Fresh, thawed and warmed oocytes were matured *in vitro* to metaphase II oocytes (MII). A meiotic spindle analysis was done by polarized light microscopy (ICSI Guard Octax™). **Results:** Experiment 1: At time 0 min and 37º C, all oocytes had polymerized spindles both at PLM or ICC. At 4º C, the number of MI oocytes with detectable spindles at PLM was smaller than those analysed by ICC, and it decreased with time, which had also occured with TI oocytes at a smaller proportion. However, at 4º C, TI meiotic spindle recognition with polarized light microscopy and ICC was comparable. When MII oocytes were cultured at 4º C, the spindle visualization decreased proportionally in correlation with culture time at PLM, and the same happened with ICC in a less pronounced manner. At room temperature there was a little descrease regarding visualization of meiotic spindle, both at PLM and ICC, altought it was not significant for TI oocytes. Experiment 2: Oocyte survival immediately after thawing/warming were 44.6% for group B and 79% for group C. After 24 hours of culture, oocyte survival was 29.2% and 69%, respectively. The median time for maturation was 26 hours for groups A and C, and 27 hours for group B. The percentage of MII after maturation *in vitro* were smaller in group B and similar between groups A and C. The same oocured for spindle visualization which were lower in group B and similar between groups A and C. **Conclusions:** There was a difference on the percentages of meiotic spindle depolymerization in response to cooling in mice oocytes at different stages of

meiotic division. Spindle depolymerization was lower in TI. Also, meiotic spindle depolimerization was proportional to culture time, except for TI oocytes at room temperature.Vitrified GV oocytes had a better survival when warmed, compared to slow-rate frozen oocytes. Vitrified GV oocytes had similar maturation *in vitro* rates and polymerized spindles detection when compared to fresh oocytes.

Descriptors: 1.Oocyte 2.Meiosis 3.Cryopreservation 4.Vitrification 5.Polarized light microscopy 6.Immunocytochemistry

1 INTRODUÇÃO

1.1 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

Os oócitos de mamíferos, incluindo os humanos, demonstram modificações progressivas em sua estrutura durante o processo de oogênese e maturação, os quais somente findam com a ovulação e a fertilização. Mudanças também ocorrem concomitantemente na relação do oócitos com as células foliculares que o circundam, as quais suportam e nutrem o oócito durante o seu crescimento e maturação até a ovulação. Nos humanos, a maioria dos oócitos, aproximadamente sete milhões, é perdida e sofre atresia ao longo da vida da mulher desde o período fetal até a maturidade sexual. Somente 400 a 500 oócitos ovulam desde a puberdade até a menopausa (Sathananthan *et al.*, 2006).

Nos ovários, durante o período fetal, as oogonias são semelhantes microscopicamente às células germinativas primordiais, as quais se originam da parede dorsal do saco vitelínico, próximo ao alantóide, durante a terceira semana de vida intra-útero e então migram para a crista genital na quinta semana, onde irão se diferenciar em testículos ou ovários. Durante a nona semana (Motta *et al*., 2003) ao oogonias começam a se diferenciar e então iniciam a sua divisão meiótica por volta da décima terceira semana quando algumas oogonias se diferenciam em oócitos (Gondos *et al*., 1986). Os oócitos primordiais iniciam a sua divisão meiótica nesta fase de vida fetal e permanecem no estágio de prófase I da primeira divisão meiótica

até receberem um estímulo hormonal que desencadeia o processo de maturação e diferenciação, fato que acontecerá no período do menacme e poderá demorar até mais de 40 anos (Sathananthan *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento e o processo de maturação *in vivo* ou *in vitro*, o oócito humano passa do estágio de vesícula germinativa (GV) quando se encontra em prófase da primeira divisão meiótica, para o estágio de metáfase da meiose I(MI), sendo ambos considerados imaturos para fertilização. Evolui então para estágio de metáfase da meiose II(MII), após a extrusão do primeiro corpúsculo polar, quando são considerados maduros e completos para fertilização. É somente após a entrada do espermatozóide no oócito que a meiose II se encerra com a extrusão do segundo corpúsculo polar (Cha & Chian, 1998) (Figura 1).

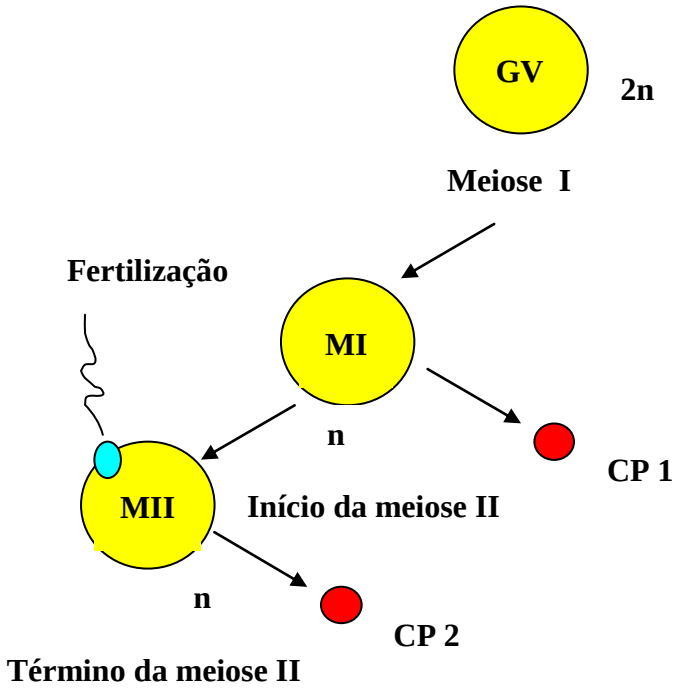


Figura 1 – Desenho esquemático representando a divisão meiótica dos oócitos humanos. GV: vesícula germinativa; MI: metáfase I; MII: metáfase II; CP: corpúsculo polar; 2n: célula diplóide; n: célula haplóide

Os oócitos em GV respondem ao estímulo com gonadotrofinas de forma diversa durante o processo de hiperestimulação hormonal para procedimentos de reprodução assistida. Quando os oócitos são aspirados para fertilização *in vitro* podem estar em diferentes estágios de maturação dependendo do tempo decorrente do início de desencadeamento do pico hormonal ovulatório, neste caso com a administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG), e do potencial de maturação de cada oócito. Então, após a punção aspirativa folicular guiada por ultra-som e a cultura *in vitro* do material aspirado de aproximadamente quatro a seis horas, os oócitos isolados deste material são analisados quanto ao seu grau de maturação, sendo os maduros (MII) fertilizados e os imaturos (MI e GV) habitualmente descartados (Cha & Chian, 1998).

Em média, 85% a 90% dos oócitos derivados de ciclos menstruais hormonalmente estimulados são coletados em estágio de MII, porém 10 a 15% deles permanecem imaturos. Visto que o procedimento de fertilização *in vitro* tem alto custo e prováveis efeitos colaterais decorrentes dos processos necessários para a sua realização e da estimulação ovariana, a possível utilização clínica destes oócitos imaturos, rotineiramente descartados, tem o potencial de beneficiar as mulheres na medida em que melhora o custo-benefício do tratamento (Cha & Chian, 1998). Para tal uso, é necessário o procedimento de maturação oocitária *in vitro* que pode ocorrer com oócitos coletados de ovários hormonalmente hiperestimulados ou com oócitos coletados de ovários em ciclo hormonal natural (Figura 2).

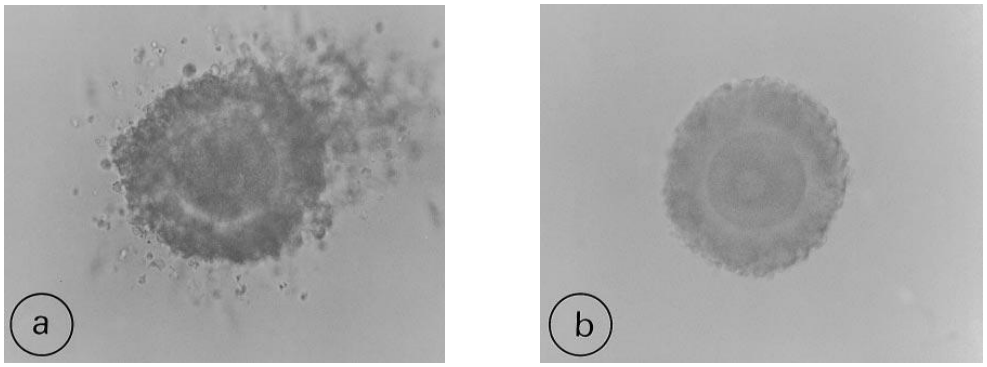


Figura 2 – Oócitos humanos em estágio de vesícula germinativa (GV) derivados de ovários estimulados (a) e não estimulados (b) por gonadotrofinas exógenas. (Adaptado de Cha & Chian, 1998)

No entanto, apesar de haver relatos de gestações obtidas com oócitos imaturos maturados *in vitro* provenientes de ovários estimulados (Nagy *et al*., 1996; Liu *et al*., 1997; Jaroudi *et al*., 1997; Cha & Chian, 1998) e não estimulados (Chian *et al*., 2004; Piquette *et al.*, 2006) a eficiência do processo em termos de taxa de fertilização e principalmente implantação embrionária e gestação é bastante inferior quando comparada com a de oócitos maturados *in vivo*, sendo estes até o dia de hoje preferencialmente utilizados para o processo de fertilização *in vitro*. A principal justificativa para tal fato é a dificuldade de mimetizar com precisão o ambiente folicular em laboratório (Piquette *et al.*, 2006). Para a maturação oocitária de boa qualidade são necessários além hormônios, também fatores de crescimento e angiogênicos dentro outras citocinas presentes no fluido folicular. Todas estas substâncias devem agir em sincronia para que tanto a maturação oocitária nuclear como a citoplasmática ocorra de forma correta. Pois, caso o ambiente de maturação oocitária não seja apropriado, podem ocorrer alterações tanto nucleares quanto citoplasmáticas que resultam em anormalidades de organelas responsáveis pela divisão celular e arranjo cromossômico levando à falha de fertilização, falta de desenvolvimento embrionário e insucesso na

obtenção de gestação (Piquette *et al.*, 2006). Desta forma, a ocorrência de anormalidades de fuso meiótico em oócitos maturados *in vitro* é debatida e controversa na literatura e será mais detalhadamente exposta no decorrer deste texto.

1.2 O FUSO MEIÓTICO DOS OÓCITOS

O fuso meiótico é uma estrutura temporária que se constitui de microtúbulos contendo tubulina associada a proteínas estruturais. O fuso meiótico dos oócitos humanos é simétrico e possui formato em barril, sendo que o pólo adjacente à membrana citoplasmática é menor do que o que se direciona para o centro da célula. A sua localização é periférica e radialmente orientada em direção à membrana citoplasmática (Figura 3). O tamanho do fuso meiótico de oócitos humanos é diversamente descrito na literatura variando de 11 a 21μm(Mandelbaum *et al*., 2004; Bromfield *et al*., 2009). Já o fuso meiótico dos camundongos apesar de localização celular e formato semelhante ao dos humanos, possui tamanho superior, cerca de 32 μm (Gomes *et al.*, 2008).

Os microtúbulos que constituem o fuso meiótico são resultantes da polimerização de dímeros de tubulina α e tubulina β compostos de 13 protofilamentos que se dispões lado a lado para constituir um formato cilíndrico. Originalmente a tubulina encontra-se dispersa no citoplasma. Os microtúbulos podem fisiologicamente se polimerizar e despolimerizar durante os vários estágios de crescimento e divisão celular (Li *et al.*, 2006; Chen *et al*., 2009). Dois tipos de microtúbulos são observados: os que se estendem de um pólo ao outro do fuso meiótico e que passam entre os cromossomos e aqueles ligados aos cinetócoros dos cromossomos (Chen *et al*., 2004; Mandelbaum *et al*., 2004). Existem também proteínas que se associam aos microtúbulos,

para regular a sua formação e desintegração (polimerização e despolimerizacao respectivamente) e que também participam das interações entre os microtúbulos e outros componentes celulares, dentre as principais estão a actina e aurora quinase (Sun *et al.*, 2006; Bezanilla *et al*., 2008; Swain *et al*., 2008). Estas proteínas também podem se fixar aos cinetócoros dos cromossomos e participar do controle e checagem de erros de condensação ou divisão cromossômica que potencialmente possam ocorrer (Steuerwald *et al*., 2005). A tubulina polimerizada encontra-se habitualmente em equilíbrio com a tubulina livre presente no ooplasma. No entanto, os microtúbulos são extremamente sensíveis a qualquer mudança física (alteração de temperatura e pH ou exposição a crioprotetores) ou fisiológica (idade do oócito), que pode causar a sua despolimerização e conseqüente desarranjo (Chen *et al*., 2003).

No estágio do paquíteno da prófase I da primeira divisão meiótica do oócito, os centríolos, organelas citoplasmáticas que participam do processo de divisão celular, desaparecem e em seu lugar restam filamentos de material pericentriolar que contêm os centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). As principais proteínas formadoras dos MTOCs incluem a γ-tubulina e a pericentrina (Combelles *et al*., 2001). Quando a meiose do oócito é reiniciada, a polimerização de tubulina se inicia já após a primeira quebra da membrana nuclear dos oócitos em GV. Após a completa desintegração da membrana nuclear dos oócitos em GV, microtúbulos são produzidos a partir dos MTOCs e destes saem para se unir aos cinetócoros dos cromossomos condensados. Conforme os microtúbulos vão sendo polimerizados, os MTOCs migram para formar os pólos do fuso meiótico, sendo este deslocamento responsável pela arquitetura do fuso meiótico. O comportamento detalhado dos MTOCs durante a anáfase I, telófase I e início da prófase II não é ainda bem compreendido, mas eles estão presentes em ambos os pólos do fuso meiótico da segunda divisão meiótica. Já, em oócitos maduros que se encontram em estágio de

metáfase da segunda divisão meiótica (MII), o fuso meiótico é bem definido e estabelecido, localizado adjacente ao córtex celular e a sua rede de microfilamentos subcorticais e com os cromossomos a ele acoplados equatorialmente. Os microtúbulos podem alongar-se e encurtar-se, quando subunidades de tubulina são acrescentadas ou subtraídas respectivamente. (Breed *et al.*, 1994; Swain *et al.*, 2008).

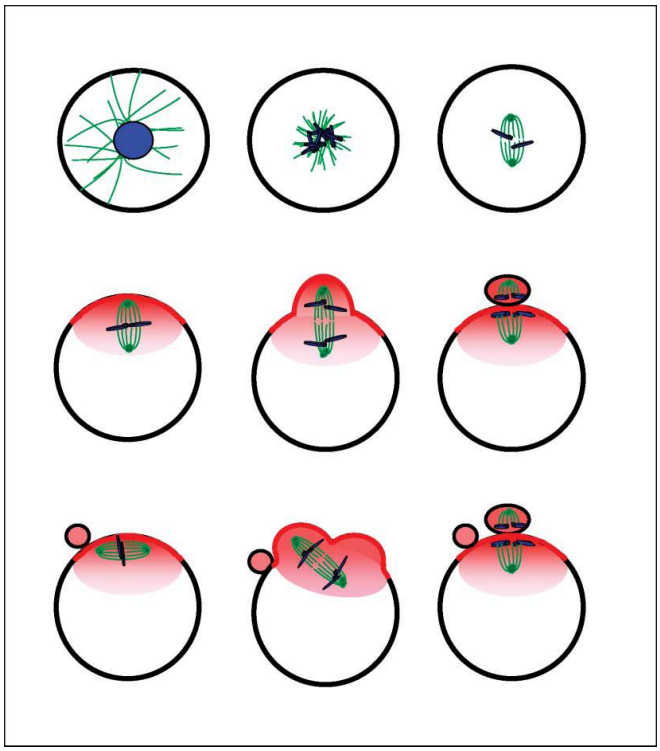


Figura 3 – Figura esquemática demonstrando os eventos da maturação oócitária relacionados ao fuso meiótico. No estágio de quebra da vesícula germinativa (GVBD) e reinício da meiose (representado na primeira linha), os microtúbulos (em verde) estão polimerizados radialmente ao redor da massa de cromossomos (círculo menor ao centro em azul) e se organizam progressivamente na estrutura bipolar do fuso meiótico. No final da metáfase I (MI) (segunda linha) o fuso meiótico bipolar migra em direção ao córtex oocitário. A migração do fuso meiótico induz a uma reorganização local do córtex oocitário (em rosa e vermelho). O primeiro corpúsculo polar é extruído seguindo o eixo do fuso meiótico. Durante a evolução para metáfase (MII) (terceira linha) o fuso meiótico metafisário encontra-se ancorado à membrana plasmática. A reorganização do córtex é mantida próxima ao fuso meiótico. A fertilização ou ativação experimental do oócito desencadeia a rotação de 90º do fuso meiótico e a extrusão do segundo corpúsculo polar. (Adaptado de Brunet & Maro, 2005)

O fuso meiótico participa da coordenação da citocinese e da cariocinese, eventos celulares da divisão e maturação oocitária que são fundamentais para a segregação cromossômica normal. Já é bem estabelecido que a organização adequada dos microtúbulos do fuso meiótico é essencial para o correto alinhamento cromossômico. Há relatos demonstrando que a exposição oocitária ao frio (Aman *et al*., 1994; Pickering *et al*., 1988; Liu *et al*., 2003), a crioprotetores (Pickering *et al*., 1988; Vincent *et al*., 1989) ou ao processo de criopreservação (Aigner *et al*., 1992; Gomes *et al*., 2008) por si só podem causar a despolimerização e desorganização dos microtúbulos do fuso meiótico, promovendo desprendimento cromossômico da placa metafisária com conseqüente desenvolvimento de aneuploidia. Além disso, a presença de fuso meiótico morfologicamente normal em oócitos humanos já foi positivamente correlacionada com taxas de fertilização, de desenvolvimento e qualidade embrionária, assim como de implantação e gestação (Madashi *et al*., 2008). No entanto, estes achados ainda são motivos de controvérsia. A ausência do fuso meiótico, atribuída à incapacidade oocitária em atingir a maturidade, pode ser conferida a distúrbios de substâncias sinalizadoras e controladoras da divisão celular, falta de complexos protéicos que auxiliam na formação do fuso meiótico e baixo suplemento energético celular (Cohen *et al*., 2004).

Igualmente, a participação do fuso meiótico em eventos pós-fertilização já é bem demonstrada podendo-se citar a rotação do fuso meiótico, a formação do corpúsculo polar, a migração dos pro-núcleos e a citocinese ou clivagem inicial (Fabbri *et al*., 2006). Portanto, é evidente pensar que qualquer injúria que cause desorganização do fuso meiótico possa acarretar em última análise em anormalidades cromossômicas, além de falha de fertilização e clivagem embrionária.

1.2.1 MÉTODOS PARA ESTUDO DO FUSO MEIÓTICO

Muitos dos conhecimentos a respeito da estrutura do fuso meiótico foram obtidos por meio da análise de oócitos fixados em imagens seriadas de cortes celulares classicamente corados (Figura 4), por imunocitoquímica ou por microscopia confocal após imunocorantes de tubulina e cromatina. Porém, essas técnicas possibilitam imagens estáticas que não permitem o estudo do comportamento dinâmico do fuso meiótico de oócitos (Wang *et al*., 2001).

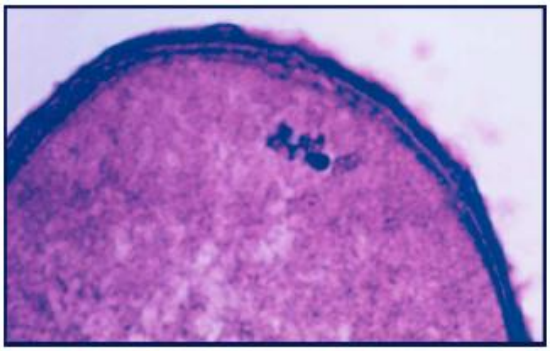


Figura 4 – Corte seriado de um oócito humano criopreservado em estágio de GV e maturado *in vitro* corado com hematoxicilina – eosina. A configuração do fuso meiótico e dos cromossomos encontra-se completamente preservada (modificado de Mandelbaum *et al.*, 2004)

A criação de um microscópio de luz polarizada possibilitou a visualização não invasiva da densidade e arquitetura do fuso meiótico por meio da birrefringência dos microtúbulos em de oócitos vivos (Figura 5) (Wang *et al*., 2001).

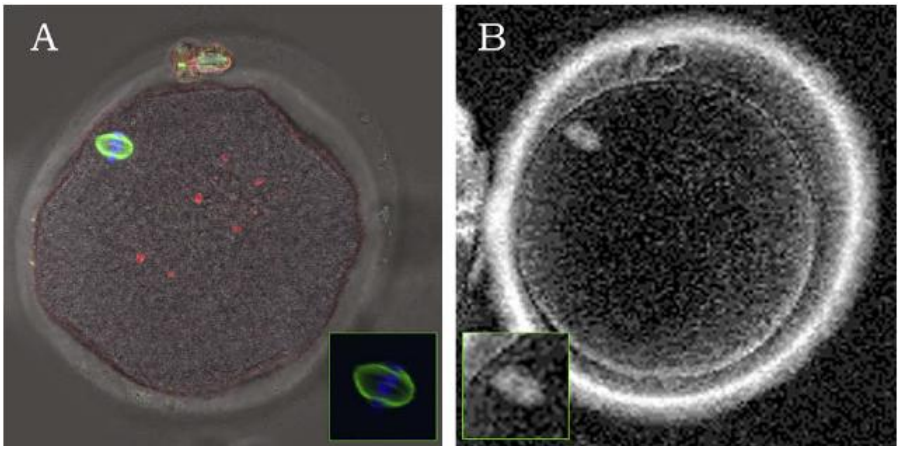


Figura 5 – Imagens representativas da visualização do fuso meiótico (destaque no quadro menor presente na porção inferior das figuras) de oócitos humanos por meio de microscopia confocal e imunocitoquímica (A) e por meio de microscópio com luz polarizada (B) (Modificado de Coticchio *et al*., 2009)

Desde 1937, a microscopia com luz polarizada vem sendo utilizada para a análise do fuso tanto durante a meiose quanto durante a mitose de diversos tipos celulares (Wang *et al*., 2001).. Recentemente, esta tecnologia tem sido aplicada especificamente para oócitos de mamíferos, principalmente após o desenvolvimento de uma versão comercialmente disponível deste tipo de microscopia Em 2001, Wang e colaboradores (2001) publicaram o primeiro estudo com o uso da microscopia de luz polarizada para avaliação de oócitos humanos e nesta época já relataram associação positiva entre a presença do fuso meiótico e a taxa de fertilização oocitária após a ICSI. Concomitantemente, o mesmo grupo realizou um outro estudo sugerindo que oócitos cujos fusos meióticos eram visualizados com microscopia de luz polarizada apresentavam maior tendência de formar embriões com desenvolvimento *in vitro* até mórula e blastocisto (Wang *et al*., 2001). Então, após estes resultados, que apontavam para a relevante participação do fuso meiótico na correta maturação oocitária, fertilização e clivagem embrionária, a presença do fuso

meiótico passou a ser considerada como um marcador de qualidade celular e, portanto a utilização do microscópio de luz polarizada passaria a ter fundamental importância na seleção dos oócitos para o tratamento de fertilização *in vitro* (Wang *et al*., 2002; Frang *et al*., 2007; Braga *et al.*, 2008).

No entanto, com a realização de estudos posteriores, verificou-se que somente a presença do fuso meiótico apresentava na realidade valor preditivo positivo baixo para qualidade oocitária de oócitos frescos, pois 90% deles possuem fuso meiótico quando visualizados por meio da microscopia de luz polarizada (Coticchio *et al*., 2009). E então, a sua importância clínica nesta particular situação passou a ser questionada. Porém, a possibilidade da observação repetitiva do fuso meiótico permitindo desta forma a análise em tempo real da despolimerização e repolimerização dos microtúbulos durante a micromanipulação *in vitro* dos oócitos vivos, fez com que este tipo de microscopia tivesse então relevante aplicabilidade científica para estudo das potenciais alterações ocorridas no fuso meiótico de oócitos criopreservados, que de certa forma poderiam prever a habilidade de desenvolvimento do oócito (Mandelbaum *et al.*, 2004; Coticchio *et al*., 2009).

Contudo, há algumas limitações técnicas da microscopia de luz polarizada. Por exemplo, devido à qualidade de imagem proporcionada, propriedades relevantes que são associadas ao fuso meiótico, como posicionamento cromossômico, não podem ser detectadas, colocando em dúvida o real valor diagnóstico e prognóstico desta técnica (Chen *et al*., 2004). Por outro lado, a microscopia confocal associada à imunocitoquímica possibilita excelentes imagens do alinhamento cromossômico associado ao fuso meiótico, mas a sua aplicabilidade clínica é nula devido à necessidade de fixação dos oócitos para sua observação (Coticchio *et al.*, 2009).

1.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O FUSO MEIÓTICO OOCITÁRIO

A despolimerização dos microtúbulos do fuso meiótico devido a fatores promotores de dano celular como alterações de temperatura e pH, ocorrida habitualmente no procedimento de micromanipulação de gametas em laboratório e durante o processo criopreservação , tem o potencial de dificultar a correta separação das cromátides que estão presas aos microtúbulos da placa metáfisária durante o processo de maturação celular e fertilização (Wang *et al*., 2002). Dessa forma, poderiam ocorrer aneuploidias ou poliploidias após a fertilização oocitária. Se o desarranjo do fuso meiótico for completo, sem a extrusão do segundo corpúsculo polar após a fertilização, poderá haver a formação de um embrião poliplóide na presença de um pró-núcleo feminino e outro masculino. Além disso, a digenia com dois pró-núcleos femininos e um masculino indica que provavelmente existiu alguma segregação cromossômica materna, que, porém não foi completa possivelmente devido à alteração do fuso meiótico. Além disso, danos menores aos microtúbulos do fuso meiótico podem acarretar em aneuploidias ou formação de micronúcleo. Portanto, minimizar a injúria ao fuso meiótico parece ser de grande relevância para os resultados obtidos com as técnicas de reprodução assistida e criopreservação de oócitos (Chen *et al.*, 2003).

O oócito maduro apresenta grande fragilidade quando exposto à baixa temperatura sendo que os microtúbulos que compõe o fuso meiótico oocitário podem sofrer rápida despolimerização até mesmo quando exposto à temperatura poucos graus abaixo da fisiológica (Wang *et al*., 2002; Chen *et al.*, 2003; Rienzi *et al*., 2004; Larman *et al.*, 2007; Ciotti *et al*., 2009). Os primeiros autores a descreverem a

despolimerização do fuso meiótico de oócitos maduros de camundongos devido ao resfriamento de 37°C para 4°C foram Pickering e Johnson em 1987. Desde então há estudos demonstrando a influência da temperatura sobre o fuso meiótico oocitário (Aigner *et al*., 1992; Aman *et al.*, 1994; Gomes *et al*., 2008).

Além dessas evidências, em experimentos enfocando a criopreservação de oócitos em MII de diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos, as taxas de fertilização e gestação foram inferiores quando comparadas com técnicas que utilizaram oócitos a fresco ou embriões congelados. A primeira descrição de gestação obtida a partir de oócito humano congelado em MII ocorreu em 1986 (Chen *et al*., 1986). Porém, devido à baixa eficácia e inconsistência do método, esta técnica foi temporariamente abandonada. No final da década de 90, as taxas de gestação eram tão baixas quanto 1-2% (Tao *et al*., 2009). Portanto, estudos experimentais, na sua maioria em camundongas, analisando alterações microestruturais e moleculares decorrentes da criopreservação foram sendo realizados, buscando um melhor entendimento da baixa eficiência da congelação de oócitos. Esses estudos constataram que potenciais defeitos decorrentes da criopreservação podem envolver a zona pelúcida, grânulos corticais, fuso meiótico e demais organelas citoplasmáticas, assim como induzir o oócito ao fenômeno de partenogênese (Liebermann *et al*., 2002; Tucker *et al*., 2004).

Entre os principais receios a respeito da criopreservação de oócitos está o desarranjo da arquitetura do fuso meiótico, fato que pode ocasionar anormalidades cromossômicas e da citocinese e justificar a menor eficiência do método quando comparado com a criopreservação de embriões e espermatozóides. Dessa forma, estudos a respeito da influência do processo de criopreservação especificamente sobre o fuso meiótico vêm sendo realizados.

Gook e colaboradores (1993) estudaram oócitos humanos maduros criopreservados pela técnica de congelação lenta com propanediol (PROH) como crioprotetor, e demonstraram que a configuração do fuso meiótico e dos cromossomos a ele atrelados era normal em 60% dos oócitos que sobreviviam ao processo de descongelação. Já em outros relatos, oócitos maduros analisados imediatamente após o seu descongelamento ou aquecimento mostraram severa desorganização ou desaparecimento do fuso meiótico utilizando tanto a técnica de congelação lenta quanto a de vitrificação (Chen *et al.*, 2009). A incubação destes oócitos por uma a três horas à temperatura de 37°C, resultou em recuperação do fuso meiótico em diversos níveis dependendo do intervalo de tempo entre o congelamento e o descongelamento (Chen *et al*., 2009), achado este concordante com estudos experimentais em camundongas (Chen *et al*., 2004, Gomes *et al.*, 2008). Importante observar que os oócitos humanos maduros não apresentaram qualquer alteração de fuso meiótico quando analisados em tempo real por microscópio de luz polarizada durante toda a etapa de resfriamento da congelação lenta, em estudo realizado por Rienzi e colaboradores (Rienzi *et al*., 2004). Neste estudo, imediatamente após o descongelamento, os fusos meióticos foram visíveis em 35,7% dos oócitos, sendo que esta porcentagem foi nula durante os passos da descongelação realizados subsequentemente. Após três horas em incubação em temperatura de 37°C, os fusos meióticos foram novamente visualizados em 100% dos oócitos.

Esses dados corroboram com os achados de Ciotti e colaboradores (2009) que acompanharam toda a despolimerização e repolimerização do fuso meiótico de oócitos humanos em estágio de MII submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta e de vitrificação. Esses autores concluíram que durante a etapa de resfriamento

tanto da congelação lenta quanto da vitrificação o fuso meiótico foi detectado em todos os oócitos, enquanto que a despolimerização dos microtúbulos foi verificada em ambos os grupos durante o processo de descongelação e aquecimento. Observaram ainda que os oócitos vitrificados tiveram repolimerização mais rápida do que os congelados pela técnica lenta, apesar de após 24 horas em cultura os oócitos de ambos os grupos apresentarem a visualização do fuso meiótico em 100% dos casos (Figura 6). Portanto, este estudo sugere que é o processo de descongelação ou aquecimento que potencialmente afeta a polimerização do fuso meiótico e não a sua exposição inicial ao frio. No entanto, não temos acesso ao estudo do fuso meiótico quando os oócitos se encontram dentro dos dispositivos de armazenamento já em programa de congelação ou diretamente em nitrogênio líquido, e, assim sendo esta também poderia ser uma etapa com potencial de dano ao fuso meiótico durante o procedimento de criopreservação.

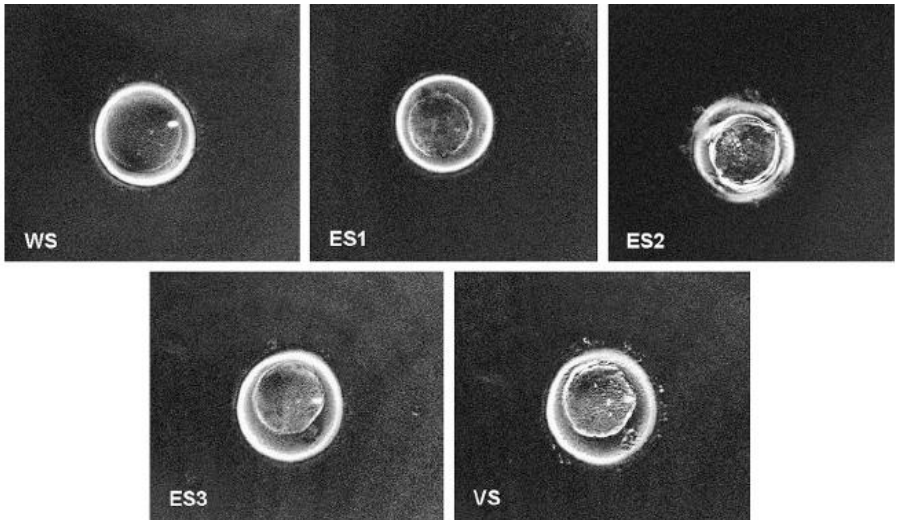


Figura 6 – Imagens obtidas por meio de microscópio de luz polarizada (Polscope) durante vitrificação de oócitos humanos em magnificação de 200 X. Visualização do fuso meiótico durante a incubação dos oócitos nas soluções de vitrificação (WS: solução de lavagem; ES1, ES2, ES3: soluções de equilíbrio 1,2 e 3; VS: solução de vitrificação) (Modificado de Ciotti *et al*., 2009)

De maneira semelhante, Bromfield e colaboradores (2009) em estudo com oócitos humanos maduros criopreservados pela técnica de congelação lenta mostraram que a ocorrência de fuso meiótico normal é máxima (85,7%) após uma hora do processo de descongelação. Porém, os autores salientam que apesar da capacidade de repolimerização dos microtúbulos, estes podem apresentar alteração da sua conformação após a repolimerização tornando assim o fuso meiótico mais alongado e com diminuição da quantidade de tubulina, com conseqüente enfraquecimento e possibilidade de despreendimento cromossômico da placa metafisária (Figura 7). Uma provável explicação para casos nos quais a despolimerização do fuso meiótico é permanente após a criopreservação é a de que este processo consumiria toda a energia disponível para o metabolismo celular. Para embasamento desta teoria, há relato de perda da integridade das mitocôndrias associada a defeitos do metabolismo do cálcio em oócitos de camundongas e mulheres após processo de criopreservação (Bromfield *et al*., 2009).

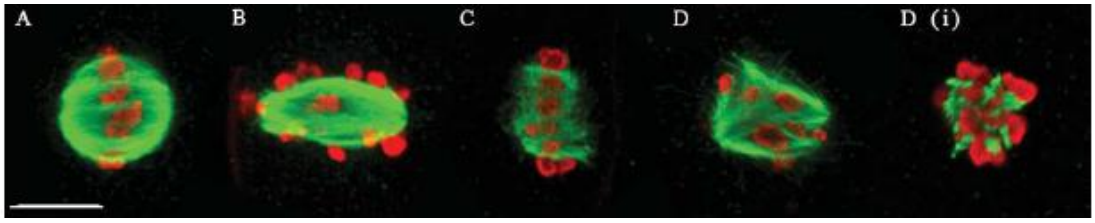


Figura 7 – Fotomicrografias do fuso meiótico oocitário após processo de criopreservação obtidas por meio de microscopia confocal. O fuso meiótico é representado em verde e os cromossomos em vermelho. A: fuso meiótico normal com os cromossomos alinhados na placa equatorial; B: fuso meiótico alongado com cromossomos desalinhados; C: desarranjo do fuso meiótico com alinhamento dos cromossomos; D: completo desarranjo tanto do fuso meiótico quanto dos cromossomos; D(i): fuso meiótico com aparência semelhante ao D, porém com mínima quantidade de microtúbulos (modificado de Bromfield *et al*., 2009)

Contudo, é interessante observar também que há referências na literatura a respeito da exposição isolada dos oócitos a crioprotetores em diferentes concentrações podendo resultar em despolimerização dos microtúbulos do fuso meiótico (Chen *et al*., 2003). Com o intuito de estudar não só o efeito da temperatura, mas também o efeito independente dos crioprotetores sobre o fuso meiótico oocitário, Gomes e colaboradores (2008) avaliaram as modificações do fuso meiótico de oócitos maduros de camundongas quando submetidos à vitrificação e quando expostos somente às soluções crioprotetoras. As técnicas para avaliação do fuso meiótico foram a imunocitoquímica e o microscópio com luz polarizada. Imediatamente após o aquecimento, o grupo de oócitos vitrificados demonstrou menor número de fusos meióticos detectados pela análise imunocitoquímica quando comparado com o grupo de oócitos somente expostos às soluções crioprotetoras. Após duas horas de incubação à temperatura de 37°C, a presença, morfologia e tamanho do fuso meiótico, assim como a incidência de alinhamento cromossômico aberrante não diferiu entre os grupos (Figura 8). Os achados do estudo imunocitoquímico foram completamente validados pela avaliação em tempo real de oócitos vivos possibilitada pela microscopia com luz polarizada. Portanto, estes dados sugerem que as soluções crioprotetoras *per si* não causam dano ao fuso meiótico. Deste modo estes relatos sugerem que parece ser a variação de temperatura, a qual pode ocorrer durante o processo de micromanipulação laboratorial de gametas, congelamento e vitrificação , assim como durante o descongelamento e aquecimento dos oócitos, a responsável pela alteração do fuso meiótico oocitário quando estes se encontram em estágio de MII da meiose.

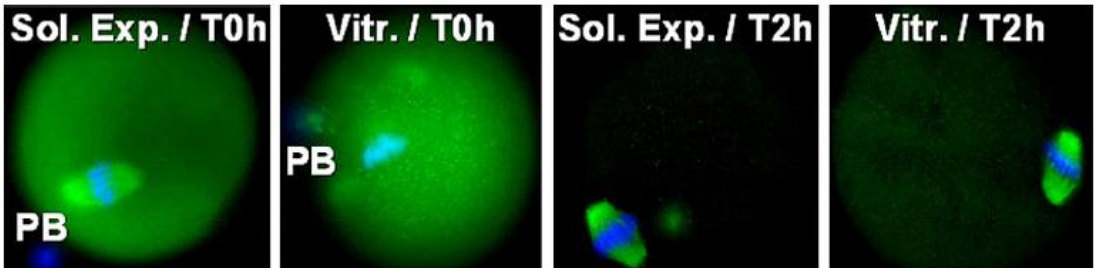


Figura 8 – Imagens obtidas de microscópio fluorescente Leica DMR com magnificação de 400 X. Os oócitos foram fixados e foi realizada análise do fuso meiótico por imunocitoquímica. Com duas horas após aquecimento não houve diferença quanto às características do fuso meiótico entre o grupo vitrificado (Vitr) e o grupo exposto isoladamente aos crioprotetores (Sol. Exp). PB: corpúsculo polar (Modificado de Gomes *et al.*, 2008)

Também, as modificações do fuso meiótico ocorridas durante o processo de criopreservação estão potencialmente relacionadas não só a fatores ambientais como temperatura e meio de cultura, mas também aos aspectos funcionais do oócito, como o tempo ideal disponível para a fertilização. Após a fertilização, com a entrada do espermatozóide dentro do oócito, ocorre aumento do conteúdo de cálcio intracelular e diminuição de fatores citostáticos. O oócito completa a segunda divisão meiótica e a extrusão do segundo corpúsculo polar. O oócito maduro deve ser fertilizado dentro de um intervalo de tempo adequado, caso contrário se inicia um processo de apoptose. O atraso na fertilização de oócitos maduros pode resultar em comprometimento da qualidade embrionária. Eroglu e colaboradores (1998) observaram que oócitos maduros de camundongas criopreservados pela técnica de congelação lenta inseminados imediatamente após o descongelamento exibiram disfunção da rotação do fuso meiótico, da formação do segundo corpúsculo polar e aumento nas taxas de disgenia. Ainda, Chen e colaboradores (2009) demonstraram que a porcentagem de fertilização e formação de blastocistos em oócitos maduros de camundongas que foram vitrificados e inseminados imediatamente ou uma hora após

o aquecimento foi menor do que a encontrada para oócitos frescos, e melhorou quando os oócitos foram incubados por duas a três horas após o aquecimento e só então inseminados, tempo este necessário para a repolimerização dos microtúbulos do fuso meiótico após o aquecimento oocitário, conforme já exposto anteriormente. Portanto, para a escolha do tempo ideal de fertilização e consequentemente para obtenção de resultados satisfatórios na criopreservação de oócitos, deve-se considerar os aspectos de repolimerização do fuso meiótico.

Além disso, a idade do oócito está diretamente correlacionada com a presença de anormalidades do fuso meiótico. A ocorrência de aneuploidia consequente a não disjunção cromossômica é mais freqüente em mulheres com mais de 35 anos (Mandelbaum *et al.*, 2004; Frang *et al*., 2007; Bromfield *et al.* 2009; Coticchio *et al.* 2009). Battaglia e colaboradores (1996) referem que, frequentemente, o fuso meiótico de mulheres entre 40 e 45 anos encontra-se alterado. Em seu estudo, 79% dos oócitos de mulheres nesta faixa etária, exibiram conformações anormais de tubulina e cromossomos dispersos no citoplasma. Por outro lado, 83% dos oócitos de mulheres entre 20 e 25 anos apresentaram fuso meiótico normal com completo alinhamento cromossômico.

Por conseguinte, os distúrbios da integridade do fuso meiótico de oócitos maduros com possível repercussão sobre a normalidade dos cromossomos a ele atrelados, podem ocorrer como conseqüência da variação de temperatura, composição e concentração dos meios de cultura e propriedades biológicas individuais de cada célula. Assim sendo, dentre os principais fatores promotores de dano ao fuso meiótico está a exposição a baixas temperaturas, fenômeno relevante durante o processo de criopreservação do gameta feminino que possui ampla aplicabilidade na prática clínica em medicina reprodutiva.

1.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

A possibilidade da congelação de oócitos de forma rotineira traz benefícios para a prática clínica em Medicina Reprodutiva. Os oócitos criopreservados podem ser utilizados com vários propósitos: aumentar a eficácia da fertilização *in vitro*; como alternativa à criopreservação de embriões principalmente para casais com restrições éticas ou religiosas a esse método; programa de doação com banco de oócitos e principalmente para preservação da fertilidade em mulheres com necessidade de ooforectomia, radioterapia ou quimioterapia ou naquelas que desejam postergar a maternidade. Portanto, a criopreservação de oócitos tem o potencial de se constituir em importante ferramenta de auxílio às técnicas de reprodução assistida (Borini *et al*., 2008; Porcu *et al*., 2008; Grifo & Noyes, 2010).

Porém, apesar da criopreservação de embriões e sêmen ser técnica bem fundamentada na prática clínica dos centros de reprodução assistida, a eficácia da criopreservação de oócitos humanos no que se diz respeito às chances de implantação embrionária e gestação evolutiva ainda não está inteiramente fundamentada (Ciotti *et al*., 2009; Porcu *et al*., 2009; Tao *et al*., 2009). Fatores morfológicos e biofísicos particulares de cada tipo celular e de cada técnica empregada para criopreservação são relacionados com a sobrevivência e qualidade oocitárias após esse processo. Entre os fatores morfológicos particularmente importantes estão características do oócito como qualidade, tamanho celular e estágio de maturidade (Fabbri *et al*., 2006; Borini *et al*., 2008; Tao *et al.*, 2009).

A influência da qualidade do material biológico no prognóstico de um procedimento médico ou biológico é de extrema relevância. Como exemplo, para a

escolha do embrião a ser congelado, leva-se em consideração a sua qualidade por meio de avaliação morfológica de número e simetria celular, além da velocidade de clivagem, sendo estas características correlacionadas com chance de implantação e gestação. Em relação à criopreservação de oócitos, critérios de seleção para avaliar qual material deve ser criopreservado são mais difíceis de serem estabelecidos (Cohen *et al*., 2004; Madashi *et al*., 2008). Também é importante enfatizar que, habitualmente os oócitos de melhor qualidade são utilizados a fresco e os excedentes, frequentemente de pior qualidade são congelados (Fabbri *et al*., 2006; Tao *et al*., 2009). Ainda, os oócitos humanos demonstram grande variabilidade na distribuição e organização de organelas citoplasmáticas, assim como na permeabilidade da membrana celular , fato que pode afetar a qualidade do oócito e influenciar o resultado da criopreservação. Além de manifestações grosseiras como o dismorfismo, critérios de heterogeneidades morfológicas oocitárias não são bem definidos e estabelecidos, e tão pouco possuem associação definitiva com seu potencial de desenvolvimento. A hipótese de que algumas variações morfológicas como espessamento da zona pelúcida, nível de granularidade citoplasmática, volume do espaço perivitelínico e fragmentação do corpúsculo polar possam predizer a habilidade de desenvolvimento oocitário, ainda permanece controversa (Borini *et al*., 2008). A única característica morfológica que parece prenunciar o comprometimento de desempenho do oócito é a presença de um corpúsculo polar gigante, mas a sua ocorrência é tão rara que não possui muita importância na prática clínica. Portanto, a inabilidade de se aplicar alguma forma efetiva de seleção de oócitos tanto para utilização a fresco como para congelação, leva ao desequilíbrio quando comparamos a eficácia da criopreservação de oócitos com a de embriões em clivagem ou blastocistos (Borini *et al*., 2008).

Outro fator que influencia o processo de criopreservação é a razão da área de superfície com o volume celular, ou simplesmente o tamanho da célula. Quanto maior é a célula, mais sensível à temperatura. Um oócito humano com 130μm de diâmetro requer um longo tempo para atingir o equilíbrio osmótico com os crioprotetores, ao contrário do espermatozóide que possui 1: 80 do tamanho do oócito e demanda um período de tempo menor com consequentes melhores resultados de sobrevivência à criopreservação (Fabbri *et al*., 2006).

Ainda, o estágio de maturação oocitária pode também interferir sobre as taxas de sobrevivência celular após o processo de criopreservação. Atualmente, o estágio de maturação oocitário de escolha e tido como padrão para criopreservação é o de metáfase II. Sabe-se, porém, que a sensibilidade diferenciada ao processo de congelação é relacionada à fase da divisão meiótica na qual o oócito se encontra (Tao *et al*., 2009). Os MII são extremamente frágeis devido ao grande tamanho celular, componente aquoso abundante e arranjo cromossômico característico. Nos oócitos maduros, os cromossomos metafisários estão alinhados pelo fuso meiótico ao longo de uma placa ou linha equatorial. O aumento de aberrações cromossômicas descritas em oócitos maduros observado durante a criopreservação é atribuído a anormalidades do fuso meiótico. Já é bem documentado que o fuso meiótico pode ser lesado pela formação de cristais de gelo no ooplasma a qual ocorre tanto durante a congelação, quanto durante a descongelação (Tao *et al*., 2009).

Atualmente, após algumas das constatações acima descritas e consequentes modificações da técnica original, a congelação de oócitos humanos ressurgiu como técnica promissora devido à melhora dos resultados clínicos apresentada nos últimos três anos. Apesar disso, sua reprodutibilidade ainda permanecer duvidosa para definir seu emprego como prática rotineira em técnicas de reprodução assistida (Jain *et al*., 2006; Lornage *et al*., 2007; Porcu *et al*., 2009).

Os princípios de uma criopreservação eficiente incluem evitar a formação intracelular de cristais de gelo, reduzir os efeitos de troca de altas concentrações de eletrólitos e impedir o choque osmótico que pode decorrer do aquecimento (Kuleshova *et al.*, 2002). Todas as técnicas de criopreservação empregam crioprotetores. Os crioprotetores diminuem o ponto de congelação celular devido ao seu efeito osmótico transmembrana que lentamente causa a substituição do conteúdo de água intracelular pelos crioprotetores. Existe então um balanço fino entre a taxa de saída de líquido da célula e a formação de cristais de gelo extracelular, a qual não repercute em lesão celular. Pois, caso ocorra excessiva desidratação celular, as concentrações intracitoplasmáticas de crioprotetores podem aumentar a nível citotóxico. Já, se a desidratação não for satisfatória haverá a formação de cristais de gelo intracelulares sabidamente danosos ao oócito (Loutradi *et al*., 2007). Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os permeáveis que atravessam a membrana plasmática (PROH), dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol e etileno-glicol (EG)) e os não permeáveis que não atravessam a membrana citoplasmática (sucrose, glicose, amido e proteínas). A sua ação protetora é complexa e atuante por diversos mecanismos. Os crioprotetores permeáveis agem baixando o ponto de congelamento da solução, interagindo com modificações da membrana plasmática durante a passagem do seu estado fluido para sólido e prevenindo a exposição oocitária a grandes concentrações de eletrólitos dentro e fora da célula, pois se ligam aos eletrólitos substituindo parcialmente a água. Já, os crioprotetores não permeáveis são representados por moléculas grandes que não atravessam a membrana celular e criam um gradiente osmótico extracelular que auxilia para desidratação oocitária durante a congelação, diminuindo a formação intracelular de cristais de gelo (Loutradi *et al*., 2007).

Os métodos atualmente utilizados para a criopreservação são o de congelação lenta e o de vitrificação (Loutradi *et al*., 2007; Borini *et al*., 2008; Porcu *et al*., 2008).

1.5 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

1.5.1 CONGELAÇÃO LENTA

1.5.1.1 CONCEITO

A técnica de congelação lenta utiliza um sistema de resfriamento que age de forma gradual e constante por período aproximado de três horas para atingir a temperatura de congelação do nitrogênio líquido (-196 ^{o}C). Este processo necessita de baixas concentrações de crioprotetores, as quais estão associadas a menor toxicidade celular. À -6 ^{o}C de temperatura, cristais de gelo intracitoplasmáticos começam gradualmente a se desenvolver. A temperatura então é reduzida gradualmente para -196 ^{o}C dentro de um dispositivo específico que controla a velocidade de resfriamento. Durante o processo de aquecimento, a transição rápida de temperatura é ideal para prevenir a recristalização da água e dessa forma evitar dano celular (Porcu *et al*., 2009).

1.5.1.2 HISTÓRICO

Em 1986, Chen e colaboradores (1986) relataram a primeira gestação após a criopreservação de oócitos humanos. Este autor utilizou uma técnica envolvendo a adição do crioprotetor DMSO e o congelamento lento. O aquecimento dos oócitos foi realizado de forma rápida em banho de água à 37°C, seguido pela diluição do crioprotetor em um único passo. Já em 1987, Van Uem e colaboradores (1987) publicaram o segundo nascimento após criopreservação de óvulos também utilizando a técnica de congelação lenta e o DMSO como crioprotetor. Em 1988, Chen e

colaboradores (1988) publicaram outro nascimento de uma menina saudável utilizando a mesma técnica de criopreservação de oócitos. Quando analisados em conjunto, os resultados de Chen e colaboradores mostraram 76% de sobrevivência oocitária, 71% de fertilização, 85% de clivagem, 28% de gestação por transferência e 4% de nascimentos por oócito congelado.

Desde estas primeiras experiências, vários autores estudaram e testaram diferentes protocolos de congelação, sempre enfrentando alguns problemas técnicos e a possibilidade de dano celular associado tanto aos crioprotetores quanto ao processo de congelação e descongelação, os quais justificavam a baixa eficácia inicial da técnica. Desde o surgimento da técnica, dentre os fenômenos adversos associados ao processo de criopreservação está o espessamento da zona pelúcida (Fabbri *et al*., 2006). A falha de fertilização ocorrida comumente em oócitos humanos congelados e também em outras espécies animais é decorrente da extrusão prematura dos grânulos corticais levando ao enrijecimento precoce da zona pelúcida que ocorre durante o processo de criopreservação (Fabbri *et al*., 2006; Porcu *et al*., 2008). Na tentativa de melhorar as taxas de fertilização de oócitos criopreservados, alguns autores começaram a utilizar a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) após a sua descrição em 1992 (Van Steirteghem *et al*., 1992). Um dos primeiros estudos foi realizado por Tucker e colaboradores (Tucker *et al*., 1996) com o objetivo de determinar se a ICSI realmente melhorava as taxas de fertilização de oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta. Estes autores obtiveram três gestações de cinco embriões transferidos, apesar de nenhuma delas ter evoluído com sucesso até o termo. A melhora da taxa de fertilização oocitária e clivagem ocorrida após a utilização da ICSI foi comprovada em estudos subsequentes e fez com que a criopreservação de oócitos voltasse a ser encarada e

estudada como promessa de aplicabilidade clínica. O primeiro nascimento ocorrido após a utilização da ICSI em oócitos congelados foi descrito por Porcu e colaboradores em 1997 (Porcu et al., 1997). Este relato também foi o do primeiro nascimento utilizando oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta com o uso de sucrose e PROH como crioprotetores.

Além da utilização da ICSI, outras modificações da metodologia inicialmente descrita foram então sendo propostas como a adição ou substituição de diferentes crioprotetores ou componentes de meio de cultura, todas elas na tentativa de melhorar a eficácia da técnica. Estes estudos constataram que concentrações de sucrose de 0,3 mol/mL, o emprego de PROH como crioprotetor, o aumento da velocidade de congelação e descongelação e a diminuição do conteúdo de sódio nos meios de cultura estão associados a melhores taxas de sobrevivência oocitária e implantação embrionária (Porcu *et al*., 2008). Recentemente, outra modificação foi proposta para melhora do protocolo de congelação lenta tradicional, considerando o intervalo de tempo ideal para congelação após a coleta dos oócitos. A criopreservação é tradicionalmente realizada entre uma a cinco horas após a coleta dos óvulos. Parmegiani e colaboradores (2008) analisaram retrospectivamente 437 oócitos criopreservados e demonstraram que as taxas de gestação e implantação embrionária eram maiores quando o processo de congelação lenta ocorreu duas horas após a coleta dos oócitos.

1.5.1.3 RESULTADOS CLÍNICOS

As alterações técnicas ocorridas ao longo dos anos possibilitaram a ampliação da utilização clínica da criopreservação de oócitos e consequentemente seu melhor aproveitamento. La Sala e colaboradores (2006) publicaram os resultados de tratamentos

de reprodução assistida com 518 oócitos criopreservados de forma rotineira. Os oócitos excedentes coletados durante o tratamento de fertilização *in vitro* foram congelados pela técnica de congelação lenta. Houve 29 gestações, com taxa total de implantação de 6,3%. Já, outro estudo com 2900 oócitos criopreservados utilizando PROH, sucrose 0,3 mol/mL e descongelamento rápido obteve 12,4% de taxa de gestação por transferência, com o nascimento de 13 crianças e taxa de aborto de 33,3% (Levi Setti *et al*., 2006). Em trabalho interessante, Chamayou e colaboradores (2006) compararam o prognóstico da fertilização *in vitro* com oócitos frescos e congelados por técnica de congelação lenta. Estes autores demonstraram que não houve diferença entre os grupos quanto às taxas de fertilização quando se utiliza a ICSI, porém a taxa de clivagem e a qualidade embrionária foram estatisticamente superiores no grupo de oócitos a fresco. Da mesma forma, recente meta-análise relatou melhora significativa das taxas de gestação por oócito descongelado e das taxas de gestação clínica por transferência (4,1% e 37,8% respectivamente no período de 2003 a 2005 contra 2,4% e 27,1% respectivamente após 2005) ocorrida com o aprimoramento da técnica de congelação lenta ao longo dos anos, porém ainda inferiores aos resultados obtidos com oócitos a fresco (Oktay *et al*., 2006). Outro estudo que avaliou o prognóstico clínico da criopreservação de oócitos foi o de Borini e colaboradores (2007) que incluiu 749 tratamentos de fertilização *in vitro* realizados entre 2004 e 2006. Nestes tratamentos não mais do que três oócitos coletados eram inseminados em acordo com a legislação italiana. Os oócitos maduros excedentes foram então congelados pela técnica de congelação lenta. Um total de 510 pacientes foram submetidas a pelo menos uma transferência de embriões derivados de oócitos congelados. A taxa de sobrevivência oocitária foi de 68,1%, a fertilização normal ocorreu em 76,1% dos oócitos e a taxa de gestação foi de 14,1%.

Estes mesmos autores, também analisaram o prognóstico obstétrico e a incidência de anomalias e malformações congênitas em 105 crianças nascidas após procedimento de fertilização *in vitro* utilizando oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta. Das gestações analisadas, 73 eram únicas e 32 gemelares. A idade gestacional média ao nascimento e o peso médio dos recém-nascidos foi de 38,9 semanas e de 3,3 kg para os recém-nascidos únicos e 2,6 kg para os gemelares. A incidência de malformações foi semelhante a da população geral (Borini *et al*., 2007).

1.5.2 VITRIFICAÇÃO

1.5.2.1 CONCEITO

A vitrificação é definida como uma solidificação citoplasmática ocorrida em baixas temperaturas que se caracteriza por resultar em aparência celular, ao microscópio, semelhante a vidro moído e pela ausência de cristais de gelo intracitoplasmáticos devido à alta velocidade de congelação (15.000 a 30.000 ^{o}C por minuto) (Smith e Fioravanti, 2006). Os protocolos de vitrificação são tecnicamente simples e consistem em colocar os oócitos em contato direto com crioprotetores e armazená-los em um dispositivo colocando-os diretamente em nitrogênio líquido (-196°C). A técnica de vitrificação utiliza altas concentrações de crioprotetores e para minimizar a chance de toxicidade a eles relacionada, usualmente é preferida uma combinação destes, sendo a mais comumente utilizada composta pelo EG, DMSO e sucrose (Smith e Fioravanti, 2006). Além da composição das soluções de vitrificação, outro fator que altera a eficácia desta técnica é o tipo de dispositivo no qual o oócito será armazenado. A depender do tamanho e formato do dispositivo, a velocidade de

congelação pode ser variada sendo que quanto maior ela for melhor é o resultado da vitrificação (Smith e Fioravanti, 2006). Estes dispositivos podem ser classificados em sistemas abertos e fechados. A desvantagem dos sistemas abertos seria a de que potencialmente poderia haver contaminação entre os oócitos das palhetas contidas no mesmo tanque de nitrogênio devido ao seu contato direto com o nitrogênio líquido, e a sua vantagem a maior velocidade de congelação (Tao *et al*., 2009).

1.5.2.2 HISTÓRICO

Retrospectivamente, o fenômeno da vitrificação foi primeiramente investigado e descrito em meados do século XIX. Como fundador da criobiologia, Luyet reconheceu o potencial de se atingir a criopreservação sem a formação de gelo há mais de 70 anos atrás e o relatou em seus estudos clássicos (Luyet, 1937). No entanto, durante estes primeiros estudos não foi possível estabelecer um protocolo eficaz para uso clínico. A vitrificação requer velocidade extremamente rápida de resfriamento e, ao mesmo tempo proteção contra a alta concentração de crioprotetores potencialmente tóxicos. Como estas questões não foram resolvidas neste primeiro momento, optou-se por um protocolo de criopreservação em etapas (congelação lenta) como o padrão para congelação de células e tecidos sendo a vitrificação proscrita para uso clínico e restrita ao meio acadêmico (Kuleshova *et al.,* 2002). Durante este período de estudos experimentais, destaca-se o de Rall e Fahy que descrevem a vitrificação em embriões de camundongo em 1985 (Rall e Fahy, 1985).

Mais recentemente, nas últimas duas décadas, novas propostas de protocolos de vitrificação surgiram com a combinação de diversos crioprotetores, o uso de crioprotetores não permeáveis e a confecção de dispositivos que permitem um

resfriamento rápido. Estas inovações possibilitaram a aplicação clínica da vitricação e então Kuleshova e colaboradores (1999) relataram a primeira gestação em humanos proveniente de oócitos vitrificados no final da década de 90.

Apesar da maioria dos relatos de gestações decorrentes da criopreservação de oócitos utilizarem a técnica de congelação lenta, alguns estudos que empregaram a vitrificação mostraram melhores taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação (Kuleshova *et al*., 2002; Porcu *et al*., 2008, Smith *et al.,* 2010). Oócitos humanos em MII (Kuwayama *et al* 2005; Borini *et al*., 2008; Porcu *et al*., 2008;), zigotos (Isachenko *et al*., 2005), embriões e blastocistos (Liebermann *et al*., 2002; Lane *et al*., 1999; Mukaida *et al*., 2003; Loutradi *et al.,* 2008) são atualmente vitrificados com sucesso e segurança.

1.5.2.3 RESULTADOS CLÍNICOS

Em geral os resultados clínicos da vitrificação de oócitos humanos e de diversas outras espécies animais como bovinos, ovinos e camundongas, são encorajadores. A criopreservação de oócitos pela técnica de vitrificação apresenta resultados promissores com relatos de altos índices de sobrevivência oocitária, fertilização e taxas de gestação. Katayama e colaboradores (2003) relataram 94% de taxa de sobrevivência oocitária, 91% de fertilização e 90% de clivagem após a vitrificação de oócitos humanos. Estudos adicionais relataram índices de sucesso similares. Cobo e colaboradores (2008) demonstraram excelente prognóstico clínico para a vitrificação de oócitos humanos utilizando dispositivo aberto de armazenamento celular para vitrificação. Estes autores estudaram mulheres que receberam oócitos doados e compararam os resultados de tratamentos com oócitos

frescos e vitrificados. Eles constataram que não houve diferença estatisticamente significante quanto ao índice de fertilização (76,3% X 82,2%), taxa de clivagem e formação de blastocistos (48,7% X 47,5%) entre os oócitos vitrificados e os frescos, respectivamente. Igualmente, Tao e colaboradores (Tao *et al*., 2009) reportaram taxas de fertilização e clivagem semelhantes quando comparados oócitos frescos e vitrificados provenientes do mesmo ciclo menstrual hormonalmente induzido.

Há uma tendência natural para se comparar uma técnica relativamente recente com a tradicional, e isto também é aplicado para a criopreservação. A quantificação de metabolomas e proteomas de oócitos vitrificados revelou que, enquanto a técnica de congelação lenta interfere dramaticamente na fisiologia oocitária, a vitrificação influencia minimamente o metabolismo celular, igualando-se aos efeitos do uso isolado de crioprotetores quando a estes a baixa temperatura não é adicionada. Portanto, os parâmetros físicos das soluções crioprotetoras utilizadas para vitrificação, como viscosidade, volume e velocidade de resfriamento/aquecimento devem ser considerados para que o dano relacionado à vitrificação ou aquecimento seja minimizado (Lornage *et al*., 2007). Em recente estudo, Smith e colaboradores (2010) compararam a sobrevida e parâmetros reprodutivos de oócitos humanos maduros criopreservados pela técnica de congelação lenta e por vitrificação. No total 587 oócitos foram analisados, sendo 238 congelados pela técnica de congelação lenta e 349 vitrificados. A sobrevida dos oócitos vitrificados foi superior assim como a taxa de fertilização (81% X 67% e 84% X 71%, respectivamente para oócitos vitrificados e congelados). A taxa de gestação também foi superior no grupo de oócitos vitrificados (38%) quando comparado com oócitos congelados (13%).

Desta forma, estima-se que para a ocorrência de um nascimento são necessários 50 oócitos em MII se estes forem criopreservados pela técnica de congelação lenta, enquanto que o mesmo resultado é atingido com 25 oócitos em MII quando vitrificados. Apesar da eficiência da vitrificação ser superior ao da congelação lenta, ainda é menor do que o emprego de oócitos frescos que requer em média 10 oócitos para o acontecimento de um nascimento (Tao *et al*., 2009). Portanto, apesar da maioria das publicações sobre gestações obtidas por meio de criopreservação de oócitos serem relacionadas à técnica de congelação lenta, a ótima efetividade e maior simplicidade, fazem com que haja uma tendência para que a vitrificação seja o método de escolha para a prática clínica atual no campo da criopreservação (Tao *et al*., 2009; Smith *et al*., 2010) (Tabela 1 e 2).

Tabela1 – Sobrevivência e gestação clínica após criopreservação de óocitos humanos pela técnica de congelação lenta

Sobrevivência	**Taxa de gestação**	**Autores**
119/159 (75)	7/21 (33)	Chen *et al., 2005*
73/81 (90)	7/15 (47)	Li *et al., 2005*
687/927 (74)	18/201 (9)	Borini *et al., 2006*
68/79 (86)	3/4 (75)	Barritt *et al., 2007*
328/437 (75)	16/83 (19)	Parmegiani *et al., 2008*
155/238 (65)	4/30 (13)	Smith *et al*., 2010

Os dados são apresentados em n(%).

Modificado de Chen *et al*.,2009.

Tabela 2 – Sobrevivência e gestação clínica após criopreservação de óocitos humanos pela técnica de vitrificação

Sobrevivência	Taxa de gestação	Autores
58/64 (90)	12/29 (41)	Kuwayama *et al., 2005*
169/180 (94)	7/15 (47)	Chian *et al., 2005*
120/143 (84)	13/23 (57)	Lucena *et al., 2006*
328/330 (99)	39/120 (33)	Antinori *et al., 2007*
224/231 (97)	11/23 (48)	Cobo *et al., 2008*
260/349 (75)	18/48 (38)	Smith *et al*., 2010

Os dados são apresentados em n(%).
Modificado de Chen *et al*., 2009.

Para avaliação da segurança da técnica de vitrificação, a análise de 165 gestações e de 200 crianças concebidas com oócitos vitrificados foi realizada por Chian e colaboradores (2008). Estes autores verificaram as complicações obstétricas, o número de gestações múltiplas, a via de parto, a idade gestacional ao nascimento, o peso ao nascimento, os escores de Apgar e a incidência de anomalias congênitas. Os resultados mostraram que a taxa de gestação múltipla foi de 17%, a idade gestacional média ao nascimento foi de 37 semanas e um dia, sendo a incidência de partos entre 34 e 37 semanas de gestação de 30% e de partos abaixo de 34 semanas de gestação de 6%. O peso médio ao nascimento foi de 2,9 kg para recém-nascidos únicos e de 2,2 kg para múltiplos. A incidência de anomalias congênitas foi de 2,5%, sendo similar a da população geral.

Entretanto, apesar da melhora progressiva das taxas de sucesso na criopreservação de oócitos humanos e dos relatos de segurança quanto à incidência de malformações e complicações obstétricas, o estabelecimento definitivo da superioridade de uma técnica sobre a outra (congelação lenta versus vitrificação) ainda não pode ser afirmado. Assim como, a questão das possíveis alterações microestruturais induzidas por ambas as técnicas como o dano celular provocado pela formação de gelo intracitoplasmático ou pela toxicidade dos crioprotetores e suas possíveis repercussões, ainda é controversa na literatura e não está completamente solucionada (Ciotti *et al*., 2009).

1.6 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS

Uma alternativa ao congelamento de oócitos em estágio de MII seria a criopreservação de oócitos imaturos em estágio de GV (Boiso *et al*., 2002). As indicações da criopreservação de oócitos em GV incluem pacientes com restrições ao estímulo hormonal ovariano ou crianças que necessitem preservar a fertilidade. Atualmente, há limitação do uso dos oócitos humanos coletados em GV, pois estes necessitam terminar a divisão meiótica *in vitro* para só então serem fertilizados e, portanto a sua capacidade de desenvolvimento nesta fase ainda não pode ser estabelecida da forma como é possível com oócitos já maduros, fato este que provavelmente afeta os resultados reprodutivos e da criopreservação de oócitos em GV. Além diso, a técnica de maturação *in vitro* necessária para o uso clínico dos oócitos em GV, não está ainda completamente elucidada e possui desfechos

reprodutivos muito inferiores quando comparados com a utilização de oócitos maturados *in vivo*, isto é, já coletados em estágio de MII. Essa limitação provavelmente ocorre devido à falta de sincronia entre a maturação oocitária nuclear e a citoplasmática, sendo os mecanismos da maturação nuclear bem compreendidos e manipulados, e os da maturação citoplasmática ainda não elucidados e controlados (Chian *et al*., 2004; Li *et al*., 2006; Grondahl *et al*., 2008). Portanto, a melhora da eficiência da técnica de maturação *in vitro,* atualmente ainda não estabelecida, também é de fundamental importância para a evolução e aplicabilidade da criopreservação de oócitos em GV (Tao *et al*., 2009) Desse modo, os oócitos imaturos coletados durante a punção ovariana necessária para o tratamento de fertilização *in vitro* não são utilizados rotineiramente na prática clínica, e acabam sendo, portanto, descartados.

Entretanto, há estudos demonstrando que os oócitos em GV sobrevivem melhor ao processo de congelamento do que oócitos em MII e possuem menor probabilidade de apresentarem anormalidades cromossômicas. Este fato ocorre porque, nesta fase da divisão meiótica, o oócito não possui a organização dos microtúbulos em fuso meiótico, a qual sabidamente é sensível a baixas temperaturas, os cromossomos encontram-se envoltos pela membrana nuclear e os grânulos corticais não estão prontos para serem extruídos (Baka *et al*., 1995; Kuleshova *et al.*, 2002; Lornage *et al*., 2007). Paradoxalmente, outros autores publicaram dados controversos, havendo evidências de que os oócitos em GV seriam mais sensíveis à criopreservação com resultados insatisfatórios em relação aos oócitos MII, provavelmente devido a menor estabilidade e maior permeabilidade da membrana celular e formação particular do seu citoesqueleto (Hong *et al*., 1999; Goud *et al*.,

2000; Tucker *et al*., 2004). Essa sensibilidade também pode ser decorrente de dano ou interrupção das projeções das células do *cúmulus*, as quais controlam a comunicação intercelular entre o oócito e as células da granulosa durante o processo de maturação oocitária. Além disso, a exposição prévia a gonadotrofinas pode influenciar a resposta do oócito em GV frente à criopreservação, pois o fato de oócitos expostos *in vivo* à gonadotrofina coriônica humana ou ao pico endógeno de hormônio luteinizante não amadurecerem, já pode denotar baixa qualidade e competência celular. (Tucker *et al*., 2004; Braga *et al*., 2008).

As modificações ocorridas no fuso meiótico de oócitos criopreservados em estágio de GV ou maturados *in vitro* são referidas na literatura. Em estudo comparando o efeito da vitrificação sobre oócitos de camundongas maturados *in vitro* e *in vivo*, Huang e colaboradores (2008) publicaram que a taxa de sobrevivência (94,7% X 91,8%, respectivamente), a taxa de normalidade do fuso meiótico (88,2% X 86%, respectivamente) e a incidência de aneuploidia (11,5% X 9,3%, respectivamente) foi semelhante entre os dois grupos. No entanto, a ocorrência de clivagem (60% X 84%, respectivamente) e de progressão para blastocisto (5,4% X 30,5%, respectivamente) foi inferior no grupo de oócitos de camundongas maturados *in vitro*. Os autores relataram que uma possível explicação seria a falta de sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática em oócitos maturados *in vitro*, a qual é muito debatida e mal compreendida pelos estudiosos do assunto. Ainda referem os autores que o menor desenvolvimento embrionário ocorrido em oócitos maturados *in vitro* pode ser relacionado à presença de maior fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) do oócito. Este fenômeno provavelmente ocorre pela maior porcentagem de oxigênio (20%) existente durante a cultura *in vitro* quando

comparada com a do ambiente tubário (5%). Então, a exposição oocitária a níveis suprafisiológicos de oxigênio ocasionaria a maior formação de radicais livres com consequente presença de estresse oxidativo que sabidamente resulta em fragmentação de DNA, diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário, e indução de apoptose celular.

No entanto, é importante ressaltar que a influência isolada da maturação *in vitro* sobre a despolimerização e repolimerização do fuso meiótico é também tema controverso na literatura. Mandelbaum e colaboradores (Mandelbaum *et al.*, 2004) analisaram a presença de anormalidades cromossômicas em oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta quando em estágio de GV e quando em estágio de MII após maturação *in vitro*. Após a fixação somente 32% dos oócitos puderam ser analisados, devido às particulares limitações técnicas desta metodologia. Os oócitos criopreservados em estágio de GV exibiram configuração cromossômica normal em 86% dos casos contra 29% dos oócitos criopreservados em estágio de MII após maturação *in vitro*. Dessa forma, neste particular estudo, as alterações de fuso meiótico que foram encontradas poderiam ser atribuídas especificamente às condições de cultura celular *in vitro* (Mandelbaum *et al.*, 2004). Além disso, há estudos demonstrando que oócitos humanos maturados *in vitro* apresentam maior incidência de anormalidades de fuso meiótico e de cromossomos quando comparados a oócitos maturados *in vivo* mesmo quando ambos não são criopreservados (Wang *et al*., 2002; Trounson *et al*., 2005; Li *et al.*, 2006; Frang *et al*., 2007). Contrariamente, existem relatos de que não há diferença entre a incidência de anormalidades de fuso meiótico e de cromossomos quando se comparam oócitos frescos maturados *in vitro* e *in vivo*, apesar do número de embriões de melhor qualidade ser menor no primeiro

grupo. Sugere-se então que outras organelas citoplasmáticas que não o fuso meiótico, seriam as responsáveis pela baixa eficácia da maturação *in vitro* (Braga *et al.*, 2008).

Para a análise isolada da influência do processo de criopreservação sobre oócitos em GV maturados *in vitro*, Boiso e colaboradores (2002) estudaram, por meio de microscopia confocal, três grupos distintos de oócitos nas seguintes fases da divisão meiótica: MII a fresco maturado *in vitro*, GV criopreservado pela técnica de congelação lenta e maturado *in vitro* e MII maturado *in vitro* e depois criopreservado pela mesma técnica. A taxa de maturação *in vitro* não diferiu entre os grupos e foi de 72,7%, concluindo-se então que a criopreservação não afetou o potencial de maturação. A incidência de anormalidades de fuso meiótico e de alinhamento cromossômico foi semelhante entre os oócitos criopreservados em GV ou em MII após procedimento de maturação in *vitro*, mas esta por sua vez foi maior do que a encontrada entre os oócitos em GV a fresco e que foram maturados *in vitro*. Neste estudo, somente 5,2% dos oócitos criopreservados em GV apresentaram fuso meiótico e alinhamento cromossômico normais após a maturação *in vitro*, comparado com 71, 6% dos oócitos em GV a fresco. Estes dados sugerem, portanto, que a criopreservação foi a responsável pela alta taxa de anormalidades de fuso meiótico, a despeito do processo de maturação *in vitro*. Estes autores atestaram então que, durante a congelação e descongelação devem ocorrer mudanças irreversíveis da organização nuclear e citoplasmática, apesar da aparente normalidade da progressão da meiose evidenciada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar (Boiso *et al*., 2002).

Diante do exposto, a possibilidade de preservação e utilização de oócitos imaturos, que são atualmente desprezados, é de grande relevância uma vez que trará benefícios para a prática clínica em reprodução assistida, principalmente para as

pacientes que necessitem deste procedimento para preservação da fertilidade ainda na infância e para pacientes com contra-indicação ao uso de hormônios indutores da ovulação e maturação oocitária *in vivo*. Além disso, devido à dificuldade de obtenção e também pela fragilidade do gameta feminino, o melhor aproveitamento dos oócitos coletados durante a fertilização *in vitro* pode melhor o custo-benefício do tratamento. Dessa forma, o melhor entendimento das alterações intracelulares que podem ocorrer durante a exposição dos oócitos a baixas temperaturas, tal qual acontece no processo de criopreservação, possibilitará a aquisição de novos conhecimentos para aperfeiçoar a eficácia e a segurança desta técnica, as quais são quesitos indispensáveis para o seu emprego rotineiro no tratamento de pacientes com necessidade de preservar a fertilidade ou em outras técnicas de reprodução assistida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS PRIMÁRIOS

a) Avaliar a influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas maturados *in vitro*;

b) Avaliar as modificações do fuso meiótico em oócitos humanos em estágio de vesícula germinativa submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta ou por vitrificação.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

a) Analisar a incidência de despolimerização do fuso meiótico de oócitos de camundongas quando expostos a baixa temperatura e em estágios diversos de maturação oocitária: telófase I, metáfase I e metáfase II;

b) Verificar se há diferença entre a detecção do fuso meiótico por meio das técnicas de microscopia de luz polarizada e imunocitoquímica empregadas em oócitos de camundongas em diversos estágios de maturação oócitária: telófase I, metáfase I e metáfase II;

c) Verificar a porcentagem e o tempo de evolução para os estágios de metáfase I(MI) e II(MII) dos oócitos humanos em estágio de vesícula

germinativa (GV) após terem sido submetidos ao processo de criopreservação pela técnica de congelação lenta ou por vitrificação;

d) Verificar a taxa de sobrevivência de oócitos humanos em estágio de vesícula germinativa (GV) quando submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta ou por vitrificação;

e) Verificar a presença de despolimerização do fuso meiótico durante o estágio de metáfase II em oócitos humanos maturados *in vitro* submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta ou por vitrificação quando em estágio de GV.

3 MÉTODOS

Para o estudo da influência da diminuição da temperatura sobre o fuso meiótico realizaram-se dois experimentos, denominados 1 e 2, sendo o primeiro em oócitos de camundongas e o segundo em oócitos humanos.

3.1 EXPERIMENTO 1

3.1.1 CASUÍSTICA

Foram utilizadas camundongas da espécie CF1 provenientes do biotério de Harlan em Indianápolis nos Estados Unidos. Quando do momento do experimento as camundongas tinham cinco semanas de vida e foram manipuladas em laboratório da Universidade de Michigan sendo obedecidas as regras de ética e pesquisa em animais da mesma universidade.

3.1.2 MÉTODOS

3.1.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS

O estímulo ovariano das camundongas foi realizado com 5UI de gonadotrofina de éguas grávidas (PMSG). As camundongas foram submetidas à ooforectomia e os

oócitos imaturos contendo as células do *cúmulus* foram coletados dos ovários 48 horas após a injeção de PMSG. Após a coleta dos oócitos imaturos, estes foram colocados em meio de cultura apropiado (Hepes-buffered Human Tubal Fluid medium – H-HTF; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) contendo 10% de albumina sérica bovina (BSA). Então, as células do *cumulus* foram removidas com pipeta em meio de cultura H-HTF contendo 80UI/mL de hialuronidase (Gomes *et al*., 2008).

3.1.2.2 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os oócitos em estágio de GV já denudados foram incubados em meio de cultura H-HTF contendo 10% de BSA, a temperatura de 37° C com 8% CO_2 e 100% de umidade até que evoluíssem para os estágios de MI, TI e MII, os quais foram definidos por meio de microscópio de luz invertida com aumento de 400X (Leica DMIRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha, equipado com Hoffman Modulation Contrast) (Figure 9).

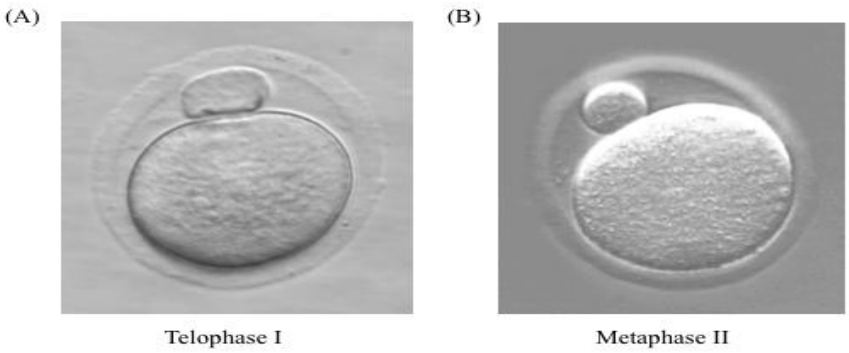


Figura 9 – Visualização dos oócitos em telófase I (A) e metáfase II (B) em microscópio de luz invertida com aumento de 400X (Leica DMIRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha, equipado com Hoffman Modulation Contrast)

Cada grupo de oócitos em MI, TI e MII foi dividido em três subgrupos de forma randomizada e colocados em cultivo em gotas de H-TFH em temperaturas diferentes: 37° C (controle), temperatura ambiente, em média de 22° C e 4° C.

3.1.2.3 ANÁLISE DO FUSO MEIÓTICO

O fuso meiótico dos três subgrupos de oócitos foi avaliado em quatro momentos diferentes: com 0, 10, 30 e 60 minutos de cultura, por meio de microscópio de luz polarizada e imunocitoquímica.

No primeiro método de análise do fuso meiótico, os oócitos foram colocados em microscópio (Olympus I X 81; Olympus America, Inc., Melville, NY) equipado com uma câmera analógica de vídeo e acoplado a um sistema de imagem que combina luz polarizada em cristal líquido denominado LC-PolScope (Cambridge Research and Instrumentation, Woburn, MA) . A aquisição e análise de dados foram feitas por um software que mensura a birrefringência, uma propriedade óptica inerente a moléculas altamente ordenadas como são os microtúbulos do fuso meiótico em oócitos.

No segundo método de análise do fuso meiótico, após exposição a 37 °C, 22 °C ou a 4 °C, os subgrupos de oócitos em MI, TI e MII foram transferidos para lâminas de poli-lisina cobertos com lâminula e fixados em solução de 2% (w/v) de paraformaldeído com 0.05% (v/v) de Triton X-100 em solução salina tamponada (PBS) (pH=7.3) por 30 minutos. Então a interação com proteínas inespecíficas foi bloqueada com a exposição dos oócitos durante toda a madrugada a uma solução de 2% (w/v) de BSA, 0.1 M glycine, e 5% (w/v) de leite em pó em PBS a temperatura de 4 °C. Após este período, os oócitos foram incubados com anticorpo anti- β-tubulina (Sigma, 1:200) por uma hora a 37° C em uma câmera úmida. As lâminas foram

coradas com Alexa Fluor 488 para camundongo (Molecular Probes, Eugene, OR; diluted 1:750) e 10 mg/mL de Hoescht 33342 (azul) ou Propidium Iodado (Sigma; vermelho). A fluorescência foi avaliada com microscópio fluorescente Leica DMR com aumento de 400–1000 vezes, e as imagens capturadas e processadas com uma câmera digital e software SPOT RT (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI).

3.1.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado com base em estudo prévio realizado pelo mesmo grupo (Gomes *et al.*, 2008). Para análise estatística dos dados foi empregado teste do Qui-quadrado, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

3.2 EXPERIMENTO 2

3.2.1 CASUÍSTICA

3.2.1.1 PACIENTES

Foram selecionadas pacientes com indicação de tratamento de fertilização *in vitro* realizado no Huntington Centro de Medicina Reprodutiva. Das pacientes incluídas no estudo, obtiveram-se oócitos em estágio de GV, sendo excluídos os degenerados. Estes oócitos foram provenientes de coleta realizada por punção transvaginal guiada por ultrassonografia que se constitui em etapa fundamental e

rotineira para o processo de fertilização *in vitro*. Os oócitos em GV selecionados para o estudo seriam descartados e não utilizados durante o tratamento. Não foram analisados os oócitos coletados em estágio de metáfase I e II.

3.2.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

a) Idade entre 18-38 anos;

b) Pacientes em tratamento para fertilização *in vitro* e que foram submetidas à coleta de oócitos devido à indicação a este tratamento;

c) Estar de acordo com o projeto e assinar o Termo de consentimento livre e esclarecido do protocolo de pesquisa, aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HCFMUSP;

d) Ter resultado normal em exame de cariótipo obtido em leucócitos periféricos.

3.2.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

a) Idade acima de 38 anos;

b) Antecedentes de aneuploidias ou abortamentos de repetição;

c) Antecedente de três ou mais falhas de tratamento com fertilização *in vitro*;

d) Diagnóstico de endometriose;

e) Diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos.

3.2.1.4 CONSENTIMENTO E FINANCIAMENTO

Todas as pacientes receberam informação pormenorizada sobre o estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido pós-informado (Anexo 1).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica (CAPPesq) do HCFMUSP (Protocolo de pesquisa nº 1229/07) (Anexo 2) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº 417/2008) (Anexo 3).

O projeto recebeu auxílio à pesquisa regular (processo 2008/54945-8) e bolsa para aluno de doutorado direto (processo 08/55746-9) pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

3.2.2 MÉTODOS

3.2.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS

A indução da ovulação foi realizada com uso de agonista de hormônio regulador das gonadotrofinas (GnRH) (Acetato de Leuprolide 0.5mg subcutâneo ao dia com início no 21º dia do ciclo menstrual e com diminuição da dose para 0.25mg ao dia após início do estímulo ovariano) ou de antagonista de GnRH (Acetato de Cetrorelix 0,25 mg subcutâneo após os folículos ovarianos atingirem 13-14mm), para prevenção do pico endógeno de hormônio luteinizante (LH). Para estimulação ovariana foram prescritos o hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) ou as gonadotrofinas derivadas de urina de mulheres menopausadas (HMG) (via subcutânea com dose variando de 150U-300U de acordo com a necessidade da paciente) (Serafini *et al.*, 2006). Durante a indução da ovulação as pacientes realizaram exames seriados de ultrassonografia transvaginal para o acompanhamento do crescimento folicular. A gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG)

foi administrada quando pelo menos dois folículos apresentaram-se com 18mm de diâmetro folicular médio ao ultra-som. A remoção do *cumulus* e *corona radiata* foi realizada de duas a seis horas após a coleta dos oócitos em meio de cultura tamponado denominado G-MOPS (Vitrolife, Gothenburg, Suécia) contendo 100µL de hialuronidase diluída em 900 µL de G - MOPS (Vitrolife, Gothenburg, Suécia) e com auxílio de pipeta para denudação dos oócitos. Os oócitos denudados foram avaliados quanto ao grau de maturação nuclear com auxílio de microscópio invertido Nikon Eclipse TE300. Somente oócitos imaturos em estágio de GV e com morfologia inalterada foram incluídos no estudo.

Imediatamente após essa avaliação, os oócitos imaturos foram divididos de maneira randomizada em três grupos: A) controle a fresco; B) criopreservados por técnica de congelação lenta e C) criopreservados por técnica de vitrificação.

3.2.2.2 PROTOCOLOS DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO/ AQUECIMENTO

3.2.2.2.1 CONGELAÇÃO LENTA

Os oócitos foram inicialmente colocados em placa de cultura (Falcon 60X15mm com poço central de 20mm) com salina tamponada com fosfato (PBS – PAA Laboratories GmbH, Áustria) suplementada com 0,9mL de fonte protéica (SSS- serum substitute suplement Irvine Scientific Califormia, USA) com o intuito de lavagem. Então, os oócitos foram transferidos para o meio de congelação 1 (150µL SSS + 1.5M de 1,2- propanediol(PROH – Fluka Chemika Suíça) por 10 minutos. Depois, os oócitos foram transferidos para o meio de congelação 2 (carregamento - 150µL SSS + 1.5M de PROH+ 0.3M de sacarose) onde permaneceram

por cinco minutos. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente. Durante os últimos cinco minutos, os oócitos foram armazenados em palhetas em número de dois a três, contendo na seguinte ordem: 2 cm de meio de congelação 2; 0,5cm de ar; 1 cm de meio de congelação 2 contendo os oócitos; 0,5cm de ar e o restante foi preenchido com meio de congelação 2. Após esse procedimento, as palhetas foram seladas com calor (sistema fechado) e colocadas em equipamento de criopreservação programável previamente estabilizado a 20°C. A temperatura diminuiu progressivamente à velocidade de 2 ^{o}C/min. Ao atingir temperatura aproximada de -7 ^{o}C foi realizado o *seeding*, isto é, com o auxílio de uma pinça previamente imersa em nitrogênio líquido, toca-se externamente a palheta, para formação do primeiro cristal de gelo extracelular. O protocolo de diminuição progressiva de temperatura previamente programado continuou até que a temperatura chegasse a - 150 °C, quando então as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 ^{o}C).

Para descongelação, as palhetas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 segundos. Então, foram submersas em banho com água a 30°C por 40 segundos. As palhetas foram então removidas e secas com gaze estéril. Com o auxílio de uma tesoura as extremidades da palheta foram cortadas e os oócitos depositados em meio de descongelação 1, contendo 1M PROH + 0,3M de sacarose por cinco minutos, mesmo período de tempo no qual permaneceram após transferência para o meio de descongelação 2, contendo 0.5M de PROH + 0,3M de sacarose. Os oócitos foram então transferidos para o meio de descongelação 3, contendo somente sucrose 0,3M onde permaneceram por mais 10 minutos. Posteriormente, os oócitos foram transferidos para meio de descongelação 4 , que contém 350 μL de PBS e 150 μL de SSS. Até este momento todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente.

Finalmente, os oócitos foram incubados em meio de descongelação 4 a 37°C e 8% CO_2. A micromanipulação dos oócitos foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ645).

3.2.2.2.2 VITRIFICAÇÃO

Os oócitos foram colocados em microgotas contendo 20µl de meio de cultura contendo de M-199 HEPES + 0,4% SSS (Irvine Scientific Califórnia USA) durante 1 minuto, após essa gota foi unida com microgota adjacente de 20µl contendo solução para equilíbrio (SE: 7.5% de etileno glicol (EG) + 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO) + 20% de SSS). Após 2 minutos, os oócitos foram deslocados para uma segunda microgota de 20µl de solução SE. Dois minutos depois, os oócitos foram removidos por pipeta para nova microgota de 20µl com SE onde permaneceram por três minutos. Os oócitos foram então subsequentemente movidos por pipeta entre quatro microgotas separadas contendo 20µl de solução de vitrificação (SV: 15% de EG + 15% de DMSO + 0.5M/mL sucrose + 20% de SSS) progressivamente permanecendo nestas microgotas por cinco segundos, cinco segundos, 10 segundos e 70 segundos. Todo o procedimento envolvendo a SV foi realizado à temperatura ambiente e em tempo máximo de 90 segundos. Durante os últimos segundos, os oócitos vitrificados foram armazenados em palhetas com SV, selados com calor em ambas as extremidades e submersos em nitrogênio líquido (sistema fechado denominado Cryotip) (Figura 10). Foram armazenados de um a três oócitos por palheta.

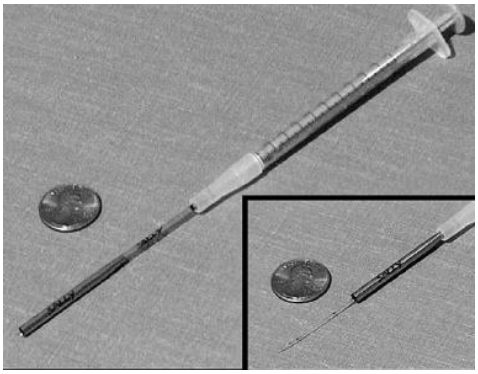


Figura 10 – Sistema de armazenamento para oócitos vitrificados denominado Cryotip. A: Destaque para o tamanho e espessura da palheta de armazenamento. Para fins de comparação, uma moeda de um centavo de dólar é colocada juntamente na fotografia (Modificado de Gomes *et al*., 2008)

Para descongelação as palhetas foram rapidamente transferidas do nitrogênio líquido para água a 37°C por três segundos. Após este procedimnto, as palhetas foram secas com gaze estéril, abertas e seu conteúdo expelido em gota de aproximadamente 1µl. As palhetas foram primeiramente lavadas com 1µl de solução para aquecimento (SA: 1.0M de sucrose + 20% de SSS), e então a SA foi expelida como microgota e emersa com o conteúdo inicial do canudo por um minuto. Os oócitos foram então transferidos para gotas de 20µl com SA por mais um minuto e depois movimentados para duas microgotas de 20µl com solução de diluição (SD: 0.5M de sucrose + 20% de SSS) por dois minutos em cada uma e finalmente foram removidos para três microgotas de 20µl com solução de lavagem (SL: 20% de SSS) onde permaneceram por 2 minutos em cada gota. Finalmente, os oócitos foram cultivados em meio contendo M-199 HEPES + 0.4% de SSS e incubados a 8% CO_2 e 37°C. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente. Tanto os meios utilizados para vitrificação quanto para o aquecimento foram da Irvine Scientific Califórnia USA. A micromanipulação dos oócitos foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon SMZ645).

3.2.2.3 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO *IN VITRO*

Após a descongelação e aquecimento, a recuperação e morfologia oocitária foram avaliadas por estereomicroscópio(Nikon SMZ645). Os oócitos foram considerados sobreviventes se a zona pelúcida e a membrana plasmática estivessem intactas e o citoplasma fosse homogêneo e refrativo (Figura 11).

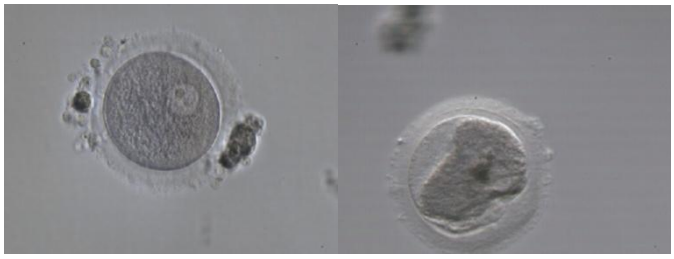


Figura 11 – Imagens obtidas de estereomicroscópio (Nikon SMZ645) mostrando oócito em estágio de GV sobrevivente (à esquerda) e não sobrevivente (à direita)

Posteriormente à constatação da sobrevivência dos óocitos ou a sua coleta no caso do grupo A, estes foram cultivados em meio de cultura Global® w/HEPES (IVF Online®) suplementado com 6% de BSA e incubados a 37 ^{o} C, 8% CO_2 com 100% de umidade, até o estágio de MII da divisão meiótica. Depois de 24 horas em cultura, o grau de maturação nuclear foi verificado com o estereomicroscópio (Nikon SMZ645). Se a evolução para MII fosse verificada, estes oócitos eram imediatamente preparados para serem submetidos à análise da presença do fuso meiótico. Caso a maturação nuclear não tivesse ocorrido dentro deste intervalo de tempo, o estágio de maturação dos oócitos foi verificado a cada uma hora, até o máximo de 48 horas, sendo que cada oócito era preparado para visualização do fuso meiótico a medida que evoluísse para MII dentro do período de tempo proposto.

3.2.2.4 ANÁLISE DO FUSO MEIÓTICO

Assim que a maturação oocitária era verificada, os oócitos foram transferidos para disco de vidro (Fluoro dish de 50 mm, WPI) com meio de cultura a 37°C e pH entre 7,2-7,3. Para visualização do fuso meiótico foi utilizado o microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 equipado com uma câmera analógica de vídeo e um sistema de imagens que combina luz polarizada em cristal líquido denominado ICSI Guard (Octax™). A aquisição e análise de dados foram feitas por um software que mensura a birrefringência dos microtúbulos do fuso meiótico dos oócitos.

Caso o fuso meiótico não fosse detectado, o oócito era girado com micropipeta (Humagen, Virgínia, USA) para que todos os seus ângulos fossem inspecionados, tomando-se o cuidado desta manobra não demorar mais de um minuto por oócito. Se ainda a visualização do fuso meiótico não fosse possível, os oócitos eram deixados por mais uma hora em cultura e incubados a 37 ^{o}C com 8% CO_2 e 100% de umidade. Então, era feita nova análise e definida a presença ou ausência do fuso meiótico.

3.2.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O desfecho principal considerado para o cálculo do tamanho da amostra foi a diferença entre as taxas de anormalidades do fuso meiótico em oócitos criopreservados por técnica de vitrificação ou de congelação lenta. Levando-se em consideração estudo prévio realizado com metodologia similar (Cao *et al*., 2008) e considerando-se um poder de amostra de 80% com intervalo de confiança de 95%, foram necessários 69 oócitos analisados em cada grupo. Para a análise estatística foi

utilizado o teste Z para duas proporções com correção de Bonferroni, sendo então as diferenças consideradas significativas quando $p<0,015$. Para amostras pequenas foi aplicado teste de Fisher. A análise das variáveis não paramétricas foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis para confirmação da diferença entre os grupos seguido da aplicação do teste de Mann-Whitney (pós-teste). Nesta análise, a diferença foi considerada significativa quando $p< 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

Foram analisados oócitos de camundongas nos estágios de maturação oocitária MI (n=164), TI (n=168) e MII (n= 182) e expostos às temperaturas 37°C, 22°C e 4°C. Para todas as temperaturas estudadas, os oócitos vivos foram visualizados ao microscópio com luz polarizada (MLP) para observação, em tempo real, da birrefringência da tubulina polimerizada. Posteriormente a este primeiro estudo, os ócitos foram fixados e analisados por imunocitoquímica (Figura 12).

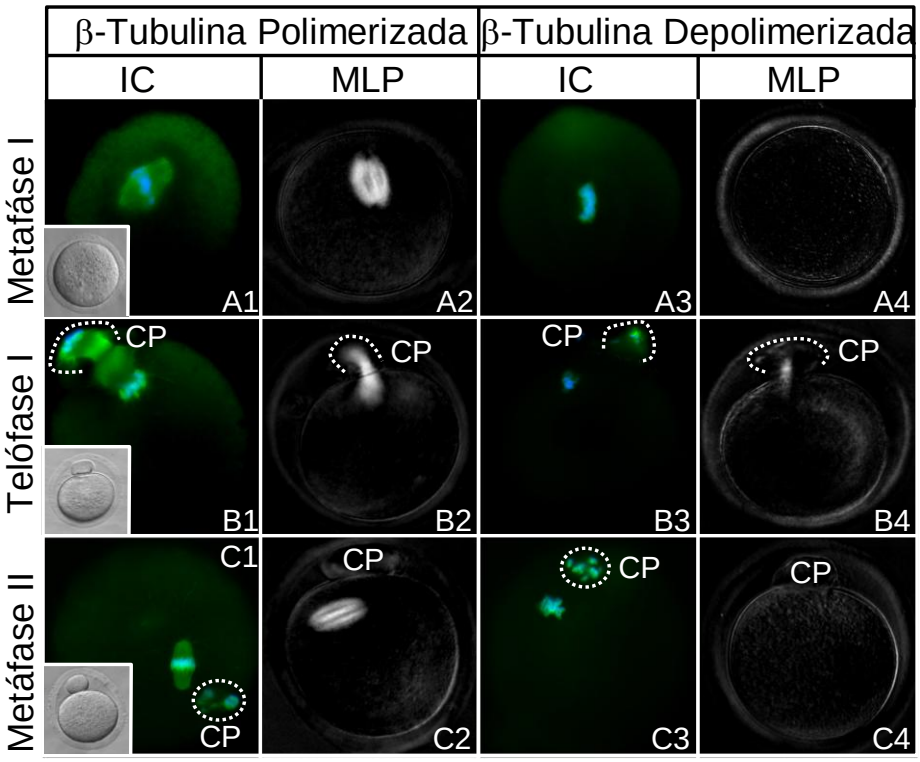


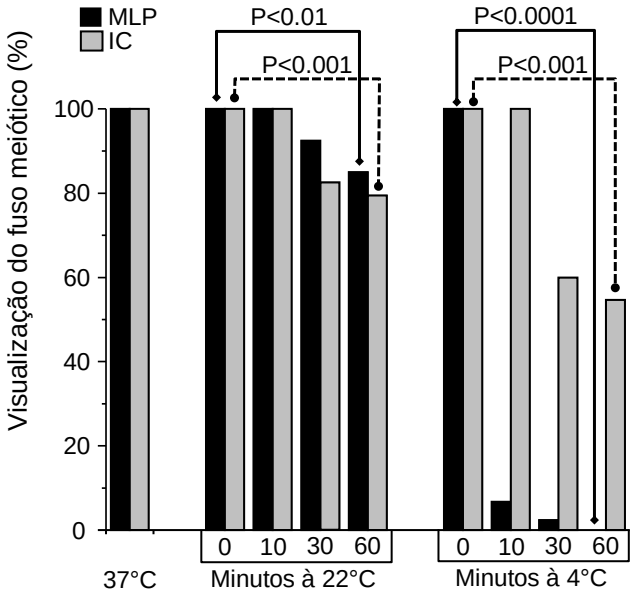
Figura 12 – Fotomicrografias dos oócitos de camundongas mostrando o fuso meiótico polimerizado e despolimerizado. As fotomicrografias coloridas demonstram a visualização do fuso meiótico polimerizado e despolimerizado pela técnica de imunocitoquímica (IC)

(A1 e A3 respectivamente – oócito em metáfase I , B1 e B3 respectivamente- oócito em telófase I, C1 e C3 respectivamente- oócito em metáfase II). As fotomicrografias em preto e branco demonstram a visualização do fuso meiótico polimerizado e despolimerizado pela técnica de microscopia com luz polarizada (MLP) (A2 e A4 respectivamente – oócito em metáfase I , B2 e B4 respectivamente - oócito em telófase I, C2 e C4 respectivamente- oócito em metáfase II). CP- corpúsculo polar

No tempo 0 h e à temperatura de 37º C, todos os oócitos em MI, TI e MII tiveram o fuso meiótico visualizado tanto com a imunocitoquímica(IC) quanto com a microscopia de luz polarizada(MLP).

Quando os oócitos em MI foram analisado por MLP e em cultura à temperatura de 4°C a porcentagem de visualização do fuso meiótico decresceu com o passar do tempo e foi de 100% no tempo zero, 6,7% no tempo de 10 minutos, 2,4% no tempo de 30 minutos e 0% após 60 minutos de cultura ($p < 0,0001$). Também a mesma análise realizada a 22°C demonstrou decréscimo significativo da detecção do fuso meiótico com o passar do tempo (tempo = 0 minuto: 100%; tempo=10 minutos: 100%; tempo=30minutos: 92,5%; tempo 60 minutos: 85%, $p < 0,01$) (Gráfico 1). Quando foi utilizada a técnica de imunocitoquímica, a porcentagem de fusos meióticos visualizados quando os oócitos em MI foram expostos à temperatura de 22°C foi de 100% nos tempo 0 minuto e 10 minutos, 82,5% para cultura por 30 minutos e 79,5% para 60 minutos ($p < 0,001$). Realizando a mesma técnica à temperatura de 4°C os resultados foram os seguintes: 100% em cultura de 0 minuto e 10 minutos, 60% para 30 minutos e 54,7% para 60 minutos ($p < 0,001$). (Gráfico 1).

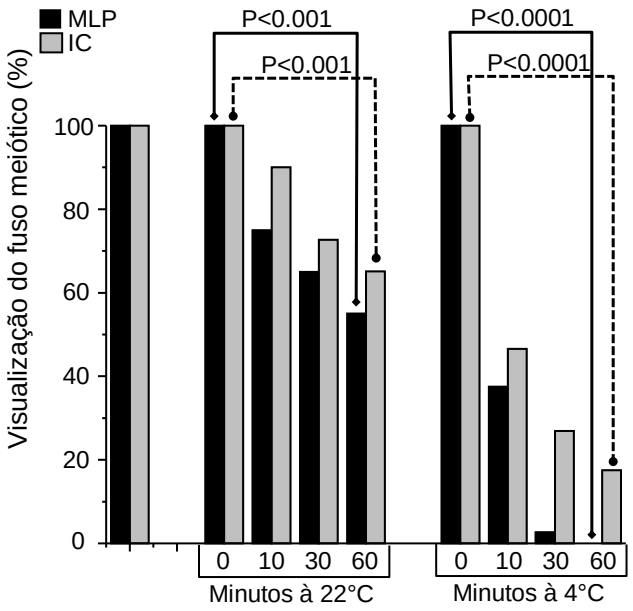
Gráfico 1 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de MI nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC)



Da mesma forma, para os oócitos em MII também ocorreu diminuição significativa da detecção do fuso meiótico com o passar do tempo para as duas temperaturas que foram estudadas. Quando os oócitos foram expostos à temperatura de 4°C e analisados por MLP a detecção do fuso meiótico ocorreu em 100% dos oócitos em MII no tempo 0 minuto, 37,5% no tempo 10 minutos, 2,5% no tempo 30 minutos e 0% no tempo 60 minutos ($p< 0,0001$). Pelo estudo com imunocitoquímica a mesma temperatura de 4°C os resultados foram: 100% no tempo 0 minuto, 46,6% no tempo 10 minutos, 26,9% no tempo 30 minutos e 17,5% no tempo 60 minutos ($p< 0,0001$) (Gráfico 2). Para temperatura de 22°C, os oócitos de camundongas em MII apresentaram os fusos meióticos polimerizados segundo a técnica de microscopia de luz polarizada em: 100% das vezes no tempo 0 minuto, 75% no tempo 10 minutos,

65% no tempo 30 minutos e 55% no tempo 60 minutos (p< 0,001). Os mesmos oócitos fixados e submetidos à imunocitoquímica demonstraram a presença do fuso meiótico nas seguintes porcentagens: 100% no tempo 0 minuto, 90% no tempo 10 minutos, 72,7% no tempo 30 minutos e 65,1% no tempo 60 minutos.

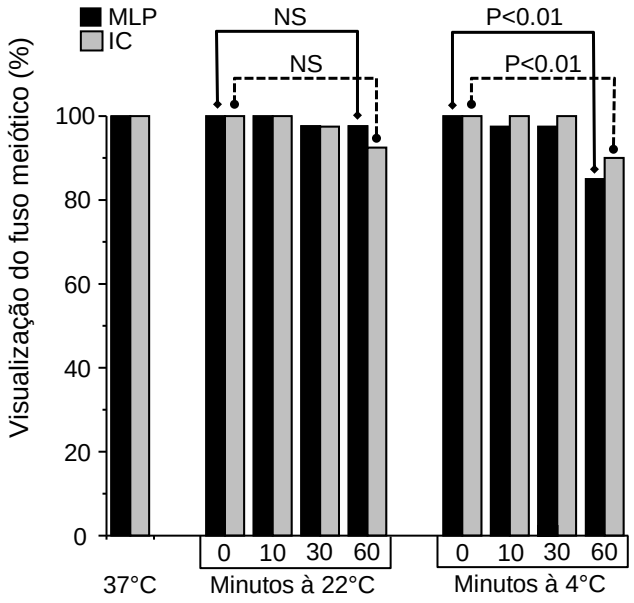
Gráfico 2 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de MII nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC)



Por outro lado, quando os oócitos em TI foram estudados a porcentagem de detecção do fuso meiótico foi semelhante nos dois métodos de análise utilizados. Além disso, não houve alteração significativa na porcentagem de fusos meióticos despolimerizados em oócitos em estágio de TI expostos à temperatura de 22°C quando comparados os diversos tempos de exposição e as duas técnicas de visualização do fuso meiótico (tempo =0 e 10 minutos: 100%, tempo= 30 e 60 minutos: 97,6%

para MLP e tempo= 0 e 10 minutos: 100%, tempo= 30 minutos: 97,5% e tempo= 60 minutos: 92% para IC) (Gráfico 3). No entanto, à temperatura de 4°C, a detecção do fuso meiótico dos oócitos em TI teve descréscimo significativo com o passar do tempo para ambos os métodos, imunocitoquímica e microscopia de luz polarizada, apesar deste ser menos pronunciado do que o ocorrido para oócitos em MI e MII. Para a primeira técnica os resultados foram: 100% de visualização do fuso meiótico nos tempos 0, 10 e 30 minutos e 90% no tempo 60 minutos ($p < 0,01$). Para a segunda técnica: 100% no tempo 0 e 10 minutos, 97,6% no tempo 30 e 60 minutos ($p < 0,01$). (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Porcentagem de fusos meióticos visualizados (eixo Y) de oócitos de camundongas em estágio de TI nas diferentes temperaturas e tempos de exposição. Em preto as colunas que representam a microscopia de luz polarizada (MLP) e em cinza as colunas que representam a imunocitoquímica (IC)



Os resultados da visualização do fuso meiótico foram similares para os métodos de imunocitoquímica e microscopia de luz polarizada na análise de todos os estágios de maturação oocitária e de todas as temperaturas estudadas, à exceção da apreciação dos oócitos de camundongas em MI os quais apresentaram maior detecção do fuso meiótico por meio da técnica de imunocitoquímica.

4.2 EXPERIMENTO 2

Foram selecionados 347 oócitos em estágio de vesícula germinativa (GV) coletados de 107 mulheres submetidas a tratamento de fertilização *in vitro* e que preencheram os critérios de inclusão do estudo. Habitualmente estes oócitos, por serem imaturos, seriam descartados. Os oócitos em GV foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo controle (A), constituído de oócitos a fresco; grupo de oócitos submetidos à criopreservação pela técnica de congelação lenta (B); grupo de oócitos submetidos à criopreservação pela técnica de vitrificação (C).

O grupo controle (A) foi formado de 120 oócitos em GV e submetido a processo de maturação *in vitro*. A mediana do tempo de maturação para MII foi de 26 horas, com mínimo de 24 horas e máximo de 28 horas. Ao final da maturação *in vitro* obtiveram-se: 57 oócitos em MII (47,5 %), 18 oócitos em MI (15%) e 45 oócitos permaneceram em estágio de GV (37,5%). Dos 57 oócitos em MII resultantes da maturação *in vitro*, 28 (49%) possuíam o fuso meiótico visualizado por meio de microscopia com luz polarizada.

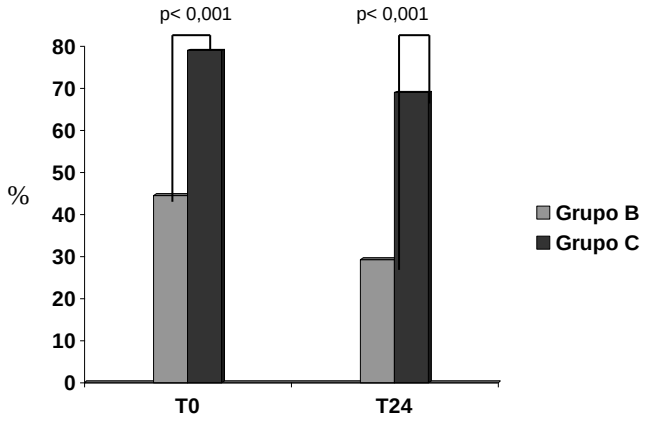
O grupo B foi composto de 109 oócitos em GV, os quais foram submetidos à técnica de congelação lenta. Imediatamente após o descongelamento, 49 (44,6%) oócitos sobreviveram e depois de 24 horas em cultura para maturação i*n vitro*, 32 (29,2%) oócitos permaneceram viáveis. A mediana do tempo de maturação até estágio de MII foi de 27 horas sendo o mínimo de 26 horas e o máximo de 29 horas. Após a maturação *in vitro* dos oócitos em GV que sobreviveram ao processo de descongelamento foram obtidos 11 oócitos em MII (33,3%), 15 oócitos em MI (47%) e seis (20%) oócitos permaneceram em GV. O fuso meiótico foi detectado em dois MII (26,4%) dos 11 resultantes da maturação *in vitro.*

O grupo C se constituiu de 118 oócitos vitrificados em estágio de GV. Imediatamente após o aquecimento, 93 (79%) oócitos em GV sobreviveram sendo que 81(69%) se encontraram viáveis após 24 horas em cultura para maturação *in vitro*. A mediana do tempo para maturação até estágio de MII foi de 26 horas, com mínimo de 25 horas e máximo de 28 horas. Foram formados 40 oócitos em MII(49, %) e 30 oócitos em MI(37%) após o processo de maturação *in vitro*, sendo que 11(13%) oócitos continuaram em estágio de GV. A microscopia de luz polarizada evidenciou o fuso meiótico polimerizado em 16 MII (40%).

Quando comparadas as medianas de tempo de maturação *in vitro* entre os grupos, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo de oócitos vitrificados (p=0,170). No entanto, para o grupo de oócitos submetidos à congelação lenta a mediana foi maior tanto em relação ao grupo controle (p=0,001) quanto ao grupo de oócitos vitrificados (p= 0,008).

Já, em relação à sobrevivência dos oócitos submetidos à criopreservação, o grupo de oócitos vitrificados apresentou melhor viabilidade tanto imediatamente após o aquecimento(T0), quanto após 24 horas em cultura (T24) (p< 0,001 para ambas as situações). (Gráfico 4).

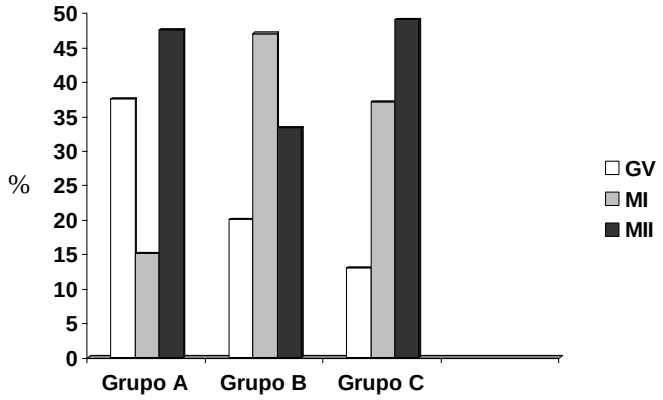
Gráfico 4 – Porcentagem de sobrevivência dos oócitos criopreservados em estágio de GV pela técnica de congelação lenta (cinza) e pela técnica de vitrificação (preto) imediatamente após o descongelamento/aquecimento (T0) e após 24 horas em cultura (T24)



A análise comparativa da evolução dos estágios da meiose durante a maturação *in vitro* nos diferentes grupos evidenciou que a taxa de oócitos que permaneceram em estágio de GV não diferiu entre os grupos A e B (p= 0,022; considerando correção de Bonferroni) e entre os grupos B e C (p=0,512). Por outro lado, o grupo de oócitos frescos (A) apresentou maior porcentagem de oócitos em GV do que o grupo de oócitos vitrificados (C) (p=0,000). Não houve diferença entre os grupos A e B e entre os grupos B e C quanto ao número de oócitos que evolui para o estágio de MI (p= 0,002 e p=0,341, respectivamente e considerando a correção de Bonferroni). Todavia, o grupo C apresentou quantidade significativamente maior de MI ao final do processo de maturação *in vitro* quando comparado ao grupo A (p=0,000). Em relação ao desenvolvimento de oócitos MII, e, portanto como parâmetro da eficiência final do procedimento de maturação *in vitro*, quando comparamos os grupos considerando somente os oócitos sobreviventes como denominador não houve diferença significativa (p=0,170 para grupo A *versus* B;

p=0,793 para A *versus* C e p= 0,136 para B *versus* C, considerando a correção de Bonferroni). Porém, se considerarmos como denominador o número total inicial de oócitos em GV utilizados em cada grupo, o número de oócitos que evoluíram para MII foi significativamente menor no grupo B quando comparado aos grupos A e C (p=0,000 para ambos) e semelhante para os grupos A e C (p=0,031). (Gráfico 5).

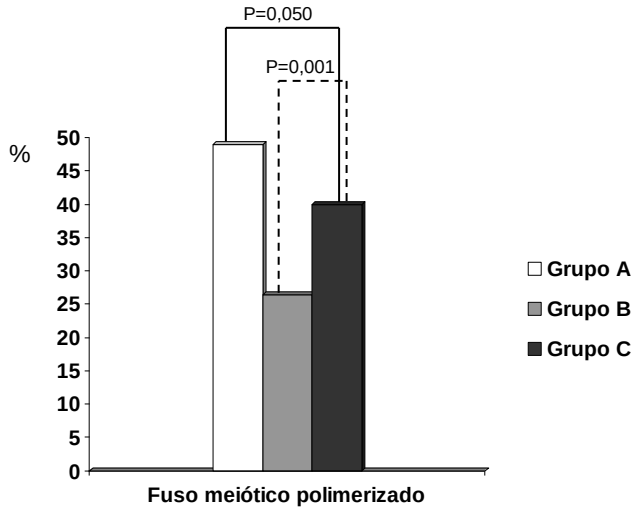
Gráfico 5 – Porcentagem de oócitos de acordo com o estágio de maturação da divisão meiótica nos grupos A, B e C, após procedimento de maturação *in vitro*. Porcentagem de oócitos que permaneceram em estágio de GV (em branco), porcentagem de oócitos que evoluíram para estágio de MI (em cinza) e porcentagem de oócitos que maturaram até o estágio de MII (em preto)



A visualização do fuso meiótico foi semelhante entre os grupos quando foram considerados os oócitos sobreviventes à criopreservação como denominador (p=0,021 para grupo A *versus* grupo B; p= 0,371 para A *versus* C e p= 0,118 para B *versus* C, considerando a correção de Bonferroni). Entretanto, se o número total inicial de oócitos em GV analisados por grupo for colocado como denominador à semelhança da ánalise anteriormente proposta, a quantidade de oócitos em estágio de MII com fuso meiótico detectado foi menor no grupo B quando comparado aos

grupos A e C (p=0,000 e p=0,001 respectivamente, considerando a correção de Bonferroni) e semelhante entre os grupos A e C (p=0,050). (Gráfico 6 e Figura 13).

Gráfico 6 – Porcentagem de fusos meióticos polimerizados de oócitos em estágio de MII nos grupos A, B e C



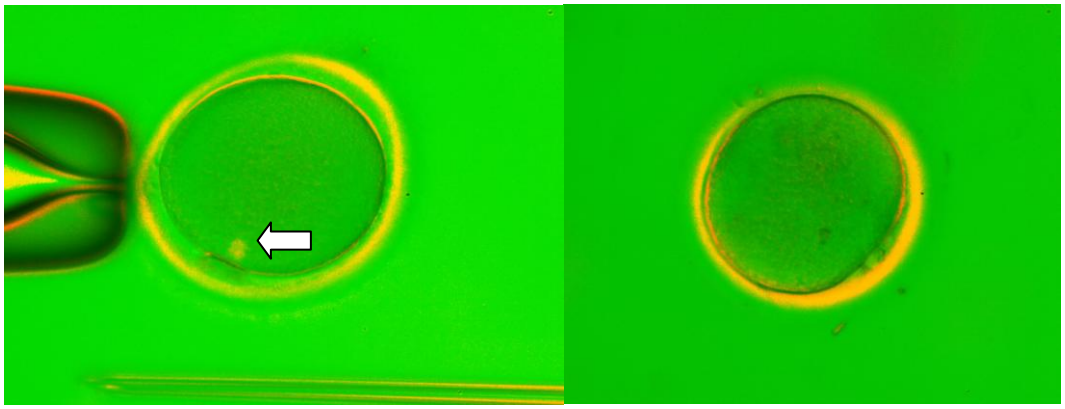


Figura 13 – Fotomicrografia demonstrando oócito humano em estágio de MII analisado por microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 (aumento de 20X) equipado com uma câmera analógica de vídeo e um sistema de imagens que combina luz polarizada em cristal líquido denominado ICSI Guard (Octax™). À esquerda: fuso meiótico polimerizado (destacado pela seta branca). À direita: fuso meiótico despolimerizado, isto é, não detectado

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO 1

O fuso meiótico oocitário tem um importante papel no alinhamento e segregação cromossômico durante a meiose e, consequentemente, participa ativamente do processo de maturação dos oócitos (Gomes *et al*., 2008; Ciotti *et al*., 2009; Chang *et al*., 2010; Coticchio *et al*., 2010). O fuso meiótico dos mamíferos é altamente sensível a flutuações de temperatura (Wang *et al.,* 2001; Mandelbaum *et al.,* 2004; Smith *et al.,* 2010). Os microtúbulos que compõe o fuso meiótico apresentam rápida despolimerização mesmo quando expostos a condições de temperatura de poucos graus abaixo da temperatura fisiológica (Pickering & Johnson, 1987). Wang e colaboradores (2001) demonstraram que a despolimerização do fuso meiótico de oócitos humanos se inicia a 31,9°C e termina a 27,1°C. Além disto, estes autores descreveram diminuição na movimentação de organelas e grânulos citoplasmáticos quando os oócitos são expostos à temperatura ambiente. Este fato também pode ocorrer durante procedimentos de reprodução assistida como a fertilização *in vitro* e a criopreservação de gametas, pois os oócitos são expostos a certas condições laboratoriais dentre elas as possíveis alterações de temperatura que vão desde a temperatura ambiente até a temperatura do nitrogênio líquido (- 196°C) (Wang *et al.,* 2001; Eincheinlaub-Ritter *et al*., 2002; Gomes *et al*., 2008). Sendo assim, as variações de temperatura que podem ocorrer durante a manipulação *in vitro* de gametas e a sua criopreservação podem resultar em despolimerização do fuso meiótico e contribuir para uma distribuição cromossômica anormal (Wang *et al.,* 2001; Eincheinlaub-Ritter *et al*., 2002; Gomes *et al*., 2008).

No entanto, muito pouco se sabe a respeito da despolimerização do fuso meiótico em resposta às variações de temperatura ocorrida nos diferentes estágios de maturação oocitária. Dessa forma, estudamos a despolimerização do fuso meiótico de oócitos de camundongas em resposta à variação de temperatura e de acordo com diferentes estágios de maturação oocitária. Optamos por definir os valores de temperatura em 37°C, temperatura ambiente (22 ^{o}C), e 4 ^{o}C, porque no primeiro valor temos uma temperatura que funciona como grupo controle pois é a considerada padrão para micromanipulação e cultura de gametas; já, no segundo valor podemos avaliar o que potencialmente ocorre, em certos momentos, durante a micromanipulação dos oócitos em laboratório de fertilização *in vitro* , e no terceiro valor tivemos como referência o estudo clássico de Pickering e Johnson, o qual foi o pioneiro na descrição da despolimerização do fuso meiótico oocitário em resposta à diminuição da temperatura para 4 ^{o}C (Pickering & Johnson, 1987).

Os resultados demonstraram que houve diferença na sensibilidade do oócito à temperatura dependendo do estágio da divisão meiótica no qual este se encontrava. Os oócitos de camundongas em TI mostraram menor porcentagem de despolimerização do fuso meiótico quando comparados com os oócitos em MI e MII em todas as temperaturas estudadas. O fuso meiótico dos oócitos em MII foi o mais despolimerizado quando exposto à tempertura de 4 ^{o}C e à temperatura ambiente. Além disso, a despolimerização do fuso meiótico em todos os estágios de maturação oocitária foi progressivamente mais freqüente quanto mais tempo eles ficaram expostos à baixa temperatura, à exceção da exposição dos oócitos em TI à temperatura de 22°C. Interessantamente, Chen e colaboradores (Chen *et al.,* 2004) demonstraram que o processo de repolimerização dos microtúbulos ocorrido durante a etapa de aquecimento do oócito em MII após a sua criopreservação também é dependente do tempo.

No entanto, não há publicações, até o momento, que enfoquem as modificações do fuso meiótico de oócitos de camundongas em resposta à variação de temperatura de acordo com o seu estágio de maturação oocitária. Uma possível explicação para os resultados deste estudo é a de que a estabilidade da polimerização da tubulina, e, portanto da organização estrutural do fuso meiótico, não seja constante durante a transição dos oócitos para os estágios de MI, TI e MII e então este fato seria o responsável pelas diferenças nos achados de susceptibilidade a despolimerização do fuso meiótico devido à exposição a baixas temperaturas a depender do estágio de maturação no qual o oócito se encontra. Além disso, do ponto de vista morfológico, o fuso meiótico dos oócitos em metáfase é uma estrutura bipolar organizada em forma de barril com os cromossomos acoplados equatorialmente. Por outro lado, durante a telófase a segregação cromossômica já se finalizou, a cromatina migra para os pólos celulares e o fuso meiótico assume uma configuração diferente da encontrada na metáfase (Sathanantahn *et al.*, 2006; Trouson A, 2006). Essa diferença morfológica também pode contribuir para a desigual sensibilidade a temperatura nos diversos estágios de maturação oocitária.

Também, alguns estudos experimentais em diversas espécies de mamíferos evidenciam substâncias que participam no processo de formação e organização do fuso meiótio e que possivelmente são negativamente influenciadas pela diminuição progressiva da temperatura com potencial de prejuízo à maturação e competência oocitárias. Larson e colaboradores (Larson *et al.*, 2010) demonstraram que alterações da função da actina, miosina II e a família de proteínas ERM (ezrina-radixina-moesina) alteram o nível de tensão citoplasmática celular causando maior incidência de anormalidades do fuso meiótico de oócitos de mamíferos. Ma e colaboradores (2010)

analisaram os mecanismos que controlam a nucleação dos microtúbulos do fuso meiótico dos oócitos de camundongas e a sua consequente estabilidade e identificaram que a proteína NEDD1/GCP-WD é uma reguladora chave destes fenômenos. A perda da função desta proteína resultou em aumento da interrupção da maturação oocitária no estágio de MI. Estes oócitos que não progrediram até a maturação final apresentaram alterações da estrutura do fuso meiótico, redução da densidade dos microtúbulos e desalinhamento cromossômico acentuado. No entanto, é importante ressaltar que é necessário maior número de estudos moleculares e estruturais visando ao melhor entendimento da razão pela qual a tubulina do fuso meiótico durante a telófase é menos susceptível a despolimerização induzida por baixas temperaturas.

Recentemente, Montag e colaboradores (2006) realizaram elegante estudo a respeito da polimerização e despolimerização do fuso meiótico ocorrida durante a progressão meiótica dos oócitos humanos. Sequências de vídeo programadas e captadas em tempo real por microscopia de luz polarizada demonstraram que durante a transição do estágio de MI para MII, o fuso meiótico desaparece por aproximadamente 40 a 60 minutos. Este achado pode ser decorrente de um processo fisiológico oocitário ou eventualmente por limitação da microscopia de luz polarizada. Esta limitação seria decorrente do fato de que algumas estruturas celulares se movem tal qual ocorre com o fuso meiótico durante a maturação celular, que então poderia estar ausente em alguns momentos por ter saído do campo de visualização que está sendo filmado durante a sua movimentação. No entanto, se o resultado deste estudo for decorrente de um processo biológico normal, pode-se inferir que em alguns oócitos, a ausência de visualização do fuso meiótico é um indicador da progressão fisiológica de desenvolvimento para o estágio de meiose e não um distúrbio celular.

O presente estudo utilizou oócitos maturados *in vitro,* e, portanto poderia haver um questionamento a respeito da polimerização e despolimerização do fuso meiótico poderem ser atribuídas à maturação *in vitro per si* e não serem representativas do que ocorre *in vivo* ou de não poderem ser atribuídas somente à diminuição da temperatura. Existem evidências de que oócitos humanos maturados *in vitro* apresentam maior ocorrência de anormalidades cromossômicas e de fuso meiótico quando comparados com oócitos maturados *in vivo* quando ambos são expostos a baixas temperaturas (Cha KY & Chian RC, 1998; Wang WH & Keefe DL, 2002; Li Y *et al*., 2006; Fang C *et al*., 2007). No entanto, Huang e colaboradores (2008) demonstraram que as taxas de sobrevivência e de anormalidades cromossômicas e de fuso meiótico foram similares em oócitos de camundongas vitrificados e maturados *in vitro* e *in vivo.* Portanto, este é ainda tema controverso em literatura, sendo importante considerar as limitações de aquisição e análise de dados que visam estudar as similaridades e diferenças de fenômenos biológicos *in vitro* e *in vivo*. De qualquer modo, houve no presente estudo, a preocupação de se analisar três grupos expostos às mesmas condições de maturação *in vitro* em temperaturas diferentes. Dessa forma, caso a maturação *in vitro* propriamente dita seja um fenômeno que influencie na despolimerização do fuso meiótico, este fator esteve igualmente presente em todos os grupos estudados.

Para investigação dos efeitos da temperatura sobre o fuso meiótico de oócitos de camundongas foram utilizadas duas técnicas: a microscopia com luz polarizada e a imunocitoquímica. É relevante considerarmos as particularidades de cada técnica empregada, pois, apesar da fixação e coloração celular, que são etapas inerentes à imunocitoquímica, possibilitarem a análise estrutural detalhada do fuso meiótico e dos cromossomos a ele atrelados, elas não permitem a avaliação da despolimerização no

oócito vivo em tempo real no quais os fenômenos celulares vão ocorrendo, tal qual é possível com a microscopia de luz polarizada (Aigner *et al*., 2002; Larman *et al*., 2007; Coticchio *et al*., 2010). Além disso, durante o estudo por microscopia de luz polarizada, as imagens são transmitidas em tempo real, não havendo necessidade de fixação celular, sendo esta então uma técnica não invasiva por não afetar a viabilidade oocitária. No entanto, deve-se considerar que pode haver limitação para captação de imagens em tempo real, quando estas são programadas previamente, pois algumas estruturas celulares podem se mover, saindo assim do campo de visualização. No intuito de evitar este acontecendo, no presente estudo as imagens foram captadas manualmente e os oócitos foram visualizados em diversos planos e focos.

Quando os oócitos em TI e em MII foram analisados, os resultados obtidos com a imunocitoquímica e com a microscopia de luz polarizada foram concordantes. Gomes e colaboradores (Gomes *et al*., 2008) também demonstraram que os achados da microscopia de luz polarizada a respeito da presença do fuso meiótico em oócitos de camundongas foram compatíveis com os da imunocitoquímica. Igualmente, Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2004) atestaram que os aspectos morfológicos do fuso meiótico de oócitos de camundongas, quando visualizados por meio da microscopia de luz polarizada após vitrificação e aquecimento, corroboram com as avaliações obtidas com imunocitoquímica no mesmo grupo de oócitos. Surpreendentemente, a imunocitoquímica e a microscopia de luz polarizada mostraram resultados discrepantes em relação aos oócitos em MI, sendo que houve maior detecção do fuso meiótico pela técnica de imunocitoquímica. Este fato pode ser mais provavelmente atribuído a algum aspecto particular da orientação dos microtúbulos do fuso meiótico dos oócitos em MI. Neste sentido, há relatos de que no estágio de TI e no início da metafáse I o fuso

meiótico pode estar naturalmente desorganizado e, portanto não apresentando a propriedade de birrefringência, condição esta necessária para a visualização do fuso meiótico ao microscópio de luz polarizada (Eincheinlaub-Ritter *et al*., 2002).

5.2 EXPERIMENTO 2

Foram selecionados oócitos em estágio de GV de pacientes que preencheram os critérios de inclusão para o estudo com o objetivo de analisar a despolimerização possivelmente presente no fuso meiótico destes gametas, após terem sido submetidos a diferentes técnicas de criopreservação e posterior maturação *in vitro*. Entre os critérios de exclusão das pacientes estão os diagnósticos de endometriose e síndrome dos ovários policísticos (SOP) devido a pior qualidade oocitária sabidamente presente nestas condições (Vieira *et al*., 2008; Barcelos *et al.*, 2008; Barcelos *et al.*, 2009). Barcelos e colaboradores (Barcelos *et al*., 2008) demonstraram que apesar do número de oócitos em MII obtidos após maturação *in vitro* e da incidência de anormalidades do fuso meiótico não diferirem entre pacientes com ou sem endometriose, ocorre atraso no término da meiose I nas pacientes com endometriose. Este fato foi evidenciado pelo maior número de oócitos em telófase I no grupo de pacientes com endometriose, o que poderia vir a ser um viés de seleção do presente estudo. Além disso, apesar de Vieira e colaboradores (Vieira *et al*., 2008) não terem demonstrado maior proporção de anormalidades meióticas e de morfologia do fuso meiótico em pacientes com SOP, há relatos de menores taxas de fertilização e maior incidência de abortamentos após tratamentos de reprodução assistida neste grupo de

pacientes (Heijnen *et al*., 2006; Homburg *et al.,* 2006). É possível que alterações endócrinas e metabólicas associadas a esta síndrome também possam estar relacionadas com o comprometimento da qualidade oocitária, que por sua vez poderia contribuir para as menores taxas de fertilização e maior incidência de abortamentos (Vieira *et al*., 2008), fato este que também poderia se constituir em viés de seleção para este estudo. A exclusão de pacientes acima de 38 anos, pacientes com antecedentes de abortos de repetição, história de falhas de fertilização *in vitro* e de mulheres com cariótipo anormal, se faz necessária devido a maior incidência de anormalidades cromossômicas nestas populações, que podem estar relacionadas originalmente a alterações de fuso meiótico (Battaglia *et al*., 1996; Mandelbaum *et al.,* 2004; Frang *et al*., 2007; Bromfield *et al*. 2009; Coticchio *et al*. 2009).

O material de estudo selecionado foi o oócito em GV sendo o mais relevante propósito para tal escolha, a falta de conhecimento em relação às possíveis alterações citoarquiteturais ocorridas em resposta à baixa temperatura decorrente da criopreservação em oócitos humanos nesta fase de divisão meiótica. Além disso, por ser habitualmente descartado em procedimentos de fertilização *in vitro*, a utilização deste gameta em estudos experimentais não possui barreiras éticas, tal como ocorre com os oócitos em MII. Ademais, a sua possível utilização clínica em terapias de reprodução assistida poderia melhorar o custo-benefício do tratamento de fertilização *in vitro*, na medida em que oócitos imaturos execedentes poderiam ser criopreservados de modo eficaz e posteriormente utilizados em caso eventual de falha de um primeiro tratamento. No entanto, ao estudarmos oócitos humanos em GV provenientes de tratamentos de fertilização *in vitro* com hiperestimulação ovariana hormonal se deve ter em mente a probabilidade de estarmos analisando

células com potencial de maturação comprometido em sua origem. Sabe-se que o ciclo celular meiótico dos oócitos de mamíferos é um processo dinâmico que envolve uma série de etapas e participação de diversas substâncias. O oócito pode ter a sua maturação interrompida em todos os estágios da meiose. O desencadeamento da progressão da meiose do oócito se dá primeiramente pelo pico de LH ocorrido fisiologicamente na metade do ciclo menstrual natural (Tripathi *et al.*, 2010) ou administrado quimicamente em ciclos de reprodução assistida por meio de injeção rec-hCG quando pelo menos dois a três folículos ovarianos atingem diâmetro médio de 18 milímetros (Serafini *et al*., 2006). O aumento sérico de LH desencadeia então uma cascata de eventos que bloqueiam a ação inibitória de fatores produzidos pelas células da granulosa ou pelo próprio oócito que o mantém estagnado em prófase como: hipoxantinas, espécies reativas de oxigênio, adenosina monofosfato cíclico (AMPc), proteína kinase A e C e fatores de crescimento. O fator promotor de maturação, fatores citostáticos e proteínas envolvidas na formação e organização do fuso meiótico também estão relacionados ao processo de interrupção da progressão da maturação meiótica (Mehlmann *et al.*, 2005; Richard *et al*., 2007; Sun *et al*., 2009; Tripathi *et al.*, 2010). Portanto, quando coletamos oócitos expostos *in vivo* a todos estes sinalizadores, e que falham em completar a meiose, algumas destas etapas podem estar comprometidas já no ambiente folicular, e sendo assim, a ausência de maturação *in vitro* não seria decorrente de fatores laboratoriais como composição do meio de cultura e variações de temperatura.

O meio de cultura utilizado para a maturação *in vitro* foi o Global ® w/HEPES suplementado com 6% de BSA. Este meio de cultura contém aminoácidos, íons, lactatos, bicarbonatos, fosfatos, glicose, EDTA e gentamicina. Diferentemente

dos meios de cultura da maturação *in vitro* de oócitos coletados de mulheres que não receberam estímulo hormonal, o meio de cultura deste estudo não foi suplementado com gonadotrofinas (LH e FSH). A razão para tal é que utilizamos oócitos em GV já expostos ao FSH durante todo o processo de foliculogênese *in vivo* o qual inclui o pico hormonal do LH. Além disso, foram analisados oócitos em GV já denudados e que, portanto não possuem mais o contato com as células da teca-granulosa. Sabe-se que as gonadotrofinas (FSH e LH) exercem um importante papel sinalizador e desencadeador da maturação oocitária, que, porém é desempenhado sobre as células da teca e da granulosa, que então por meio de seu íntimo contato com o oócito, através de *gap junctions*, produzem uma série de substâncias capazes de desencadear o reinício da meiose (Kimura *et al*., 2007; Mehlmann *et al*., 2005). Assim, o efeito das gonadotrofinas não é exercido diretamente sobre o oócito, pois este não possui receptores de LH e FSH (Méduri *et al.*, 2002; Mehlmann *et al*., 2005), sendo, deste modo, desnecessária a suplementação hormonal do meio de cultura do particular tipo celular utilizado neste estudo.

A mediana do tempo de maturação *in vitro* não diferiu entre o grupo controle e o grupo de oócitos em GV vitrificados, porém para o grupo de oócitos em GV criopreservados pela técnica de congelação lenta a mediana foi significativamente maior. Não existem outros estudos similares em humanos para compararmos o tempo de maturação dos três grupos, porém podemos inferir que o maior tempo necessário para a maturação dos oócitos em GV criopreservados pela técnica de congelação lenta se deva a alterações oocitárias decorrentes da formação de gelo intracelular, que é característica desta técnica de congelação, e que afetam substâncias e microestruturas citoplasmáticas que participam do processo de maturação como

kinases, miosinas, fatores de transcrição e o fuso meiótico (Cha & Chian, 1998). Poucos estudos relatam o tempo de maturação *in vitro* de oócitos em GV a fresco denudados. Barcelos e colaboradores (Barcelos *et al*., 2009) relatam média de tempo de maturação *in vitro* de 19 horas com variação de uma hora para mais ou menos de oócitos em GV a fresco. No presente estudo, a mediana de 26 horas, para o grupo controle, pode ser atribuída a características particulares do laboratório e meio de cultura utilizados e da população estudada.

Ainda, a análise dos dados a respeito da maturação *in vitro* demonstrou que o reinício da meiose foi maior no grupo de oócitos vitrificados quando comparado ao grupo de oócitos a fresco, evidenciado pelo maior número de oócitos que permaneceram em estágio de GV no grupo a fresco. Bogliolo e colaboradores (Bogliolo *et al*., 2007) relatam resultado semelhante ao estudarem oócitos imaturos de ovinos. Estes autores concluíram que a remoção das células da granulosa antes de vitrificar os oócitos aumentou a sua sobrevida e a incidência de reinício da meiose, porém esta técnica de criopreservação apresentou o potencial de afetar importantes proteínas envolvidas no desenvolvimento completo do oócito até o estágio de MII, como o fator promotor de maturação (MAP), a proteína kinase mitogênica ativada (MAPK) e as auroras kinases. Swain e colaboradores (Swain *et al*., 2008) demonstraram que as auroras kinases participam da remodelação da cromatina oocitária durante a maturação de oócitos de camundongas. A inibição da aurora kinase durante a transição da metáfase I para metáfase II resultou em significante menor número de células capazes de finalizar o processo de maturação. No presente estudo, o número de oócitos em MI foi maior no grupo de oócitos vitrificados quando comparado com os outros dois grupos, porém a porcentagem de maturação

completa, isto é, a evolução para oócitos em MII foi semelhante entre os grupos. Consequentemente, a eficência da transição metáfase I, anáfase I e telófase I foi maior no grupo controle. Desse modo, uma possível inibição da aurora kinase decorrente da vitrificação poderia ser uma explicação para este resultado.

Considerando o número total inicial de oócitos em GV utilizados em cada grupo, e não somente os oócitos sobreviventes nos grupos criopreservados, o número de oócitos que evoluíram para MII foi significativamente menor no grupo de oócitos submetidos à técnica de congelação lenta quando comparado aos grupos controle e de oócitos vitrificados. Esta avaliação é importante, pois, representa a eficiência completa da metodologia estudada, englobando a análise da criopreservação e da maturação *in vitro*, além de possibilitar a estimativa do número de oócitos em GV que finalizaram todo o processo. A porcentagem de oócitos em GV denudados que evoluíram para estágio de MII foi semelhante à relatada na literatura (Barcelos *et al*., 2009; Vieira *et al*., 2008). Por outro lado, dados de maturação *in vitro* de oócitos em GV a fresco cultivados em conjunto com o complexo do *cumulus* mostram taxas maiores de maturação, em média de 70 a 80% (Park *et al*., 1997, Wang *et al*., 2002, Fang *et al*., 2007). Este resultado é explicado pela sabida influência positiva das células da granulosa sobre o processo de maturação oocitária (Mehlmann *et al*., 2005).

A comparação da sobrevivência dos oócitos de acordo com a técnica de criopreservação empregada demonstrou que os oócitos vitrificados sobrevivem melhor tanto imediatamente após o aquecimento, quanto após 24 horas em cultura. Smith e colaboradores (Smith *et al*., 2010) em recente estudo prospectivo e randomizado com oócitos em estágio de MII também demonstrou a superioridade da técnica de vitrificação em relação à sobrevivência quando comparada com a de

congelação lenta (81% versus 67% respectivamente). Da mesma forma, Cao e colaboradores (Cao *et al*., 2009) concluíram, em estudo com oócitos humanos em estágio de MII, que a viabilidade celular foi de 91,8% para os oócitos vitrificados contra 61% para os oócitos submetidos à congelação lenta.

No entanto, ao compararmos as taxas de sobrevivência de oócitos em estágio de MII com as mesmas taxas obtidas neste estudo com oócitos em GV, em ambas as técnicas, os oócitos em MII sobrevivem melhor à criopreservação. Para a congelação lenta a média da taxa de sobrevivência após o descongelamento de oócitos em estágio de MII é de 75 a 60% e para a vitrificação a taxa de sobrevivência após aquecimento de oócitos em estágio de MII varia de 85 a 95% (Smith *et al*., 2010, Tao *et al*., 2009, Borini *et al*., 2008). O achado de menor sobrevivência dos oócitos em GV ao processo de criopreservação corrobora com os resultados de alguns estudos clínicos e experimentais com oócitos humanos imaturos que compararam a sobrevivência oocitária e a despolimerização do fuso meiótico durante o processo de criopreservação, com os mesmos parâmetros analisados para oócitos maduros (Tucker *et al*., 1996, Hong *et al*., 1999; Goud *et al*., 2000). Os autores que atestam que os oócitos imaturos são mais frágeis ao serem expostos ao frio quando comparados com oócitos em MII, creditam essa maior sensibilidade a menor estabilidade e maior permeabilidade da membrana dos oócitos imaturos quando expostos aos crioprotetores, além de aventarem a hipótese de que proteínas reguladoras da formação e funcionamento do fuso meiótico poderiam ser afetadas antes mesmo da formação do fuso meiótico (Swain *et al*., 1998).

No entanto, há relatos de que os oócitos imaturos possuem melhor taxa de sobrevida e menor incidência de anormalidades cromossômicas decorrentes da

despolimerização do fuso meiótico quando criopreservados em comparação com oócitos MII (Baka *et al*., 1995; Kuleshova *et al.,* 2002; Lornage *et al.,* 2007). Esta controvérsia pode ser decorrente de diferenças na seleção da amostra, metodologias dos estudos e das particularidades das técnicas de criopreservação empregadas, o que torna difícil uma fidedigna comparação entre os resultados. Os componentes do meio de cultura utilizado para maturação *in vitro*, a composição e concentração dos crioprotetores bem como o tipo de sistema utilizado para armazenamento do oócitos criopreservados também podem influenciar a sobrevida oocitária. Neste sentido, Li e colaboradores (Li *et al.,* 2008) relatam melhor viabilidade oocitária após processo de vitrificação utilizando dispositivo de armazenamento denominado *cryoloop* em oócitos humanos em estágio de GV quando comparados com oócitos em MII.

Também estudamos as possíveis diferenças na despolimerização do fuso meiótico decorrentes das diversas técnicas de criopreservação: vitrificação e congelação lenta. Sendo assim, como resultado observou-se que a visualização do fuso meiótico por microscopia de luz polarizada foi semelhante entre os grupos quando considerados somente os oócitos sobreviventes ao processo de criopreservação. Todavia, se o número total inicial de oócitos analisados por grupo for colocado como denominador, a quantidade de oócitos em estágio de MII com fuso meiótico detectado foi menor no grupo de oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta e semelhante entre os grupos controle e de oócitos vitrificados. Não há outros estudos publicados que comparam a influência da técnica de congelação lenta com a técnica de vitricação sobre o fuso meiótico de oócitos humanos criopreservados em estágio de GV e maturados *in vitro*. Desta forma, para análise comparativa dos resultados deste estudo, foram considerados outros autores que empregaram metodologia similar em

oócitos maduros ou que estudaram isoladamente a influência de uma das técnicas de criopreservação sobre o fuso meiótico.

Baka e colaboradores (Baka et al., 1995) estudaram os efeitos deletérios da baixa temperatura sobre o fuso meiótico de quatro diferentes grupos de oócitos: oócitos imaturos criopreservados antes e depois de maturados *in vitro*, oócitos imaturos a fresco maturados *in vitro* e oócitos frescos em MII. Eles concluíram que o número de oócitos com fuso meiótico normal no grupo de oócitos imaturos criopreservados antes da maturação *in vitro* foi semelhante ao encontrado nos oócitos a fresco maturados *in vitro* e nos oócitos a fresco em MII. Porém estes autores publicaram índices de despolimerização do fuso meiótico em 50% dos oócitos humanos em MII criopreservados por técnica de congelação lenta após sua maturação *in vitro.* Park e colaboradores (Park et al., 1997) estudaram as anormalidades ocorridas no fuso meiótico de 178 oócitos humanos imaturos coletados de ovários não estimulados por gonadotrofinas exógenas e submetidos à congelação lenta, e encontraram incidência de 70% de despolimerização do fuso meiótico após o descongelamento e maturação *in vitro*. Cao e colaboradores (Cao *et al.,* 2009) descreveram incidência maior de anormalidades do fuso meiótico em oócitos humanos criopreservados em estágio de MII com a técnica de congelação lenta (39,1%) quando comparada com a técnica de vitrificação (17,7%). Já, Huang e colaboradores (Huang *et al.,* 2008) relataram visualização de fuso meiótico normal em 88,2% de oócios em MII vitrificados originados de oócitos de camundongas em GV maturados *in vitro.* A menor influência da técnica de vitrificação sobre o fuso meiótico pode explicar a melhor eficácia clínica desta técnica em relação à técnica de congelação lenta, conforme atestam alguns autores (Kuwayama *et al., 2005*; Cobo *et al*., 2008; Smith *et al*., 2010).

Como os três grupos analisados no presente estudo foram igualmente submetidos à maturação *in vitro*, a maior incidência de anormalidades do fuso meiótico nos oócitos submetidos à congelação lenta pode ser atribuída ao processo de criopreservação *per si* e não a maturação *in vitro*, conforme previamente discutido para o experimento 1. Possivelmente as características particulares da técnica de congelação lenta, como a composição dos crioprotetores, velocidade de congelação e formação de cristais de gelo intracelular, parecem afetar negativamente substâncias que participam da formação e organização do fuso meiótico antes mesmo dele estar completamente organizado, sendo que dentre estas se podem citar as kinases, fosfatases e proteínas motoras (Swain *et al*., 2008; Sun *et al.*, 2009; Tripathi *et al*., 2010). Desta forma, as taxas de maturação oocitária e de polimerização adequada do fuso meiótico em oócitos criopreservados em estágio de GV pela técnica de congelação lenta podem ficar comprometidas, com provável consequente aumento na incidência de anormalidades cromossômicas, fato este que poderia explicar o desempenho desta técnica no que se refere aos seus resultados clínicos.

6 CONCLUSÕES

6.1 EXPERIMENTO 1

- Houve diferença na porcentagem de despolimerização do fuso meiótico em resposta à baixa temperatura entre os oócitos de camundongas nos diferentes estágios da divisão meiótica (MI, TI e MII);
- O fuso meiótico dos oócitos de camundongas em TI demonstrou menor despolimerização em resposta à diminuição da temperatura para 22 ° C e para 4° C;
- O fuso meiótico dos oócitos de camundongas em MII demonstrou maior despolimerização em resposta à diminuição da temperatura para 22 ° C e para 4° C;
- Em todas as fases da divisão meiótica, os oócitos de camundongas demostraram despolimerização dos microtúbulos do fuso meiótico diretamente proporcional ao tempo de exposição à baixa temperatura, à exceção dos oócitos em TI expostos à temperatura de 22°C;
- Os resultados da visualização do fuso meiótico foram similares para os métodos de imunocitoquímica e microscopia de luz polarizada, à exceção da análise dos oócitos de camundongas em MI.

6.2 EXPERIMENTO 2

- A porcentagem de oócitos em GV que evoluíram para maturação completa, isto é, estágio de MII foi menor no grupo de oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta e semelhante do grupo controle e de oócitos vitrificados;
- O tempo de maturação *in vitro* dos oócitos em GV foi semelhante no grupo controle e no grupo de oócitos vitrificados, porém foi maior para o grupo de oócitos criopreservados pela técnica de congelação lenta;
- A transição telófase I- anáfase I – metáfase II foi menos eficiente no grupo de oócitos em GV vitrificados;
- O grupo de oócitos em GV vitrificados apresentou melhor taxa de sobrevivência tanto imediatamente após o aquecimento (T0), quanto após 24 horas em cultura (T24) quando comparado ao grupo de oócitos em GV criopreservados pela técnica de congelação lenta;
- A porcentagem de oócitos com fuso meiótico não detectado por meio de microscopia de luz polarizada, isto é, fuso meiótico despolimerizado, foi maior no grupo de oócitos em GV submetidos à técnica de congelação lenta, e semelhante entre os grupos controle e de oócitos em GV vitrificados.

7 REFERÊNCIAS

Aigner S, Van der Elst J, Siebzehnrubl E, Wildt L, Lang N, Van Steirteghem AC. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1992; 7:857-864.

Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:103-110.

Baka SG, Toth TL, Veeck LL. Evaluation of the spindle apparatus of *in vitro* matured human oocytes following cryopreservation. *Hum Reprod* 1995; 10:1816-1820.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Araújo MC, Martins W de P, Ferriani RA, Navarro PA. Meiotic abnormalities of oocytes from patients with endometriosis submitted to ovarian stimulation. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30: 413-419.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA.Comparative analysis of the spindle and chromosome configuration of in vitro matured from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril* 2009; 92: 1749-1752.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996; 13: 2217-2222.

Bezanilla M, Wadsworth P. Spindle positioning: actin mediates pushing and pulling. *Curr Biol* 2008; 12: R168-169.

Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology* 2007; 68: 1138-1149.

Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod* 2002; 17: 1885-1891.

Borini A, Cattoli M, Mazzone S. Survey of 105 babies born after slow cooling oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2007; 88:S13.

Borini A, Cattoli M, Bulletti C, Coticchio G. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 49-58.

Braga DPAF, Figueira RCS, Rodrigues D, Madaschi C, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Borges E. Prognostic value of meiotic spindle imaging on fertilization rate and embryo development in *in vitro* matured oocytes. *Fertil Steril* 2008; 90: 429-433.

Breed WG, Simerly C, Navara CS, VanderBerg JL, Schatten G. Microtubule configurations in oocytes, zygotes, and early embryos of a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol* 1994; 164:230-240.

Bromfield JJ, Cocchitio G, Hutt K, Sciajno R, Borini A, Albertini DF. Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow – cooling cryopreservation. *Hum Reprod* 2009; 24: 2114-2123.

Brunet S & Maro B. Cytoeskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 2005; 130: 801-811.

Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril* 2009; 92: 1306-1311.

Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 103-120.

Chamayou S, Alecci C, Ragolia C. Comparison of *in vitro* outcomes from cryopreserved oocytes and sibling fresh oocytes. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:730-736.

Chang CC, Sung LY, Lin CJ, Kort HI, Yang X, Tian XC, Nagy ZP. The oocyte spindle is preserved by 1,2-propanediol during slow freezing. *Fertil Steril* 2010; 93: 1430-9.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 1:884-886.

Chen C. Pregnancies after human oocyte cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541: 541-549.

Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing- a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 101-107.

Chen CK, Wang CW, Wan-Jin T, Ling-Ling H, Hsin- Shih W, Yung-Kuei S. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocyes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil Steril* 2004; 82: 666-672.

Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48: 15-22.

Chian RC, Lim JH, Tan SL. State of the art in *in vitro* oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16:211-219.

Chian RC, Huang JY, Lucena E, Saa A. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 608-610.

Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009; 91: 2399- 2407.

Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Use of fluorescence in situ hybridization to acess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 354-360.

Cobo A, Kuwayama M, Perez S. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008; 89: 1657-1664.

Cohen Y, Malcov M, Schawrtz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing GB, Amit A, Azem F. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 2004; 19: 649-654.

Combelles CMH, Albertini DF. Microtubule pattering during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of δ-tubulin. *Dev Biol* 2001; 239:281-294.

Coticchio G, Sciajno R, Hutt K, Bromfield J, Borini A, Albertini DF. Comparative analysis of the metaphase II spindle of human oocytes through polarized light and high-performance confocal microscopy. *Fertil Steril* 2010; 93: 2056-2064.

Eincheinlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte : possible damage to the spindle apparatus. *Reprod Biomed Online* 2002;5: 117-24.

Eroglu A, Toner M, Leykin L, Toth TL. Cytoskeleton and polyploidy after maturation and fertilization of cryopreserved germinal vesicle – stage mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 447- 454.

Fabbri R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell Tiss Bank* 2006; 7: 113-122.

Fang C, Tang M, Li T, Peng WL, Zhou CQ, Zhuang GL, Leong M. Visualization of meiotic spindle and subsequent embryonic development in *in vitro* and *in vivo* matured human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 547-551.

Gomes CG, Silva e Silva CA, Gavrilina G, Acevedo N, Baracat EC, Serafini PC, Smith GD. Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. *Fertil Steril* 2008; 90: 1396-1404.

Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in human fetal ovary: ultraestructural and squash preparation study. Am J Obstet Gynecol 1986; 155:189-195.

Gook D, Osborn S, Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993; 8: 1101-1109.

Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Maele GV, Dhont M. Cryopreservation of human germinal vesicle and *in vitro* matured MII oocytes: influence of cryopreservation media on survival, fertilization and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000; 14: 1-8.

Grifo JA & Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 2010; 93: 391-396.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reprod Update* 2006; 12: 13-21.

Homburg R. Pregnancy complications in PCOS. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 381-392.

Hong SW, Chung HM, Lim JM. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72: 142-146.

Huang JYJ, Chen HY, Park JYS, Tan SL, Chian RC. Comparison of spindle and chromosome configuration in *in vitro*- and *in vivo*- matured mouse oocytes after vitrification. *Fertil Steril* 2008; 90: 1424-1432.

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Van der Ven H. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. *Fertil Steril* 2005; 84:1011-1016.

Jain JK, Paulson R. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2006; 86:1037-1046.

Jaroudi KA, Hollanders JMG, Sieck UV. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in- vitro matured oocytes. Human Reprod 1997; 12: 857- 859.

Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003; 80:223-224.

Kimura N, Hoshino Y, Totsukawa K, Sato E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signaling pathways regulating meiotic progression. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63: 327- 342.

Kuleshova L, Gianaroli L. Magli C. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: a case report. *Hum Reprod* 1999; 14: 3077-3079.

Kuleshova L, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449-54.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11:300-308.

La Sala GB, Vicoli A, Villani MT. Outcome of 518 salvage oocyte-cryopreservation cycles performed as a routine procedure in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 2006; 86: 1423-1427.

Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; 72:1073-1078.

Levi Setti PE, Albani E, Novara PV. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006; 21:370-375.

Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification on human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 692-700.

Larson SM, Lee HJ, Hung PH, Matthews LM, Robinson DN, Evans JP. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by miosin II and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. Mol Biol Cell 2010; Jul 21 article in press.

Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, Critser JK, Chen ZJ. Confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro*. *Fertil Steril* 2006; 85: 1-6.

Li YF, He QH, Zhang HW, Zhu GJ, Hu J, Liu Q, Ren XL, Wei YL. Cryopreservation by cryoloop damages human immature oocytes. Zhonghua Nan Ke Xue 2008; 14: 498-502.

Liebermann JL, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online* 2002; 4:146-150.

Liu RH, Sun QY, Li YH, Jiao LH, Wang WH. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003; 65:212-218.

Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systemic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008; 90: 186-193.

Lornage J, Salle B. Ovarian and oocyte cryopreservation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19: 390-394.

Luyet B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* 1937; 1:1-14.

Ma W, Baumann C, Viveiros MM. NEDD 1 is crucial for meiotic spindle stability and accurate chromosome segregation in mammalian oocytes. *Dev Biol* 2010; 339:439-450.

Madaschi C, Bonetti TCS, Braga DPAF, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Borges E. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril* 2008; 90: 194-198.

Mandelbaum J, Anastasiou O, Lévy R, Guérin JF, Larouzière V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol* 2004; 113S: S17-S23.

Méduri G, Charnaux N, Driancourt NA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. Follicle stimulating hormone receptors in oocytes? J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 2266-2276.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 791- 799.

Montag M, Schimming T, van der Ven H. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 442-446.

Motta PM, Nottola SA, Familiari G, Makabe S, Stallone T, Macchiarelli G. Morphodymanics of the follicular luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *Int Rev Cytol* 2003; 223: 177- 288.

Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod* 2003; 18:384-391.

Nagy ZP, Cecile J, Liu J. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal - vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65: 1047- 1050.

Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006; 86: 1-11.

Park SE, Song WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY.Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. Fertil Steril 1997; 68: 920-926.

Parmegiani L, Cogniti GE, Bernardi S. Freezing within 2hfrom oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slowfreezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2008; 12:1-7.

Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of mouse oocytes. *Hum Reprod* 1987; 8:978-989.

Piquette GN. The *in vitro* (IVM) maturation of human oocytes for *in vitro* fertilization (IVF): is it time yet to switch to IVM-IVF? *Fertil Steril* 2006; 85: 833- 835.

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R. Birth of a healthy female after intracytoplasmatic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68:724-726.

Porcu E, Bazzocchi A, Notarangelo L, Paradisi R, Landolfo C, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. *Curr Opin Endocrinol Diab Obes* 2008; 15:529-535.

Rall WF & Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196oC by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.

Richard FJ. Regulation of meiotic maturation. J Anim Sci 2007; 85 (13 Suppl): E4-E6.

Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytesduring the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004; 19: 655-659.

Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trouson AO. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Micros Res Tech* 2006; 69: 396-407.

Serafini PC, Yadid I, Motta ELA, Alegretti JR, Fioravanti J, Coslovsky M. Ovarian stimulation with daily late follicular phase administration of low-dose human chorionic gonadotropin for *in vitro* fertilization: a prospective, randomized trial. Fertil Steril 2006; 86: 830-838.

Smith GD, Silva e Silva CA. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online* 2004; 9:171-178.

Smith GD & Fioravanti J. Oocyte and embryo cryopreservation. Gardner D. In vitro fertilization: a practical approach. New York: Informa Healthcare USA, Inc 2006: 331-64.

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti J, Motta ELA. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010; article in press.

Steuerwald N. Meiotic spindle chekpoints for assessment of aneuploid oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 256-259.

Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006; 131:193- 205.

Sun KY, Miao YL, Schatten H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocytes meiosis resumption. *Cell Cycle* 2009; 8: 2741- 2747.

Swain JE, Jingwen JD, Smith GD. Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Mol Hum Reprod* 2008;14: 291-299.

Tao T, Zhang W, Del Valle A. Human oocyte cryopreservation. *Current Opin Obstet Gynecol* 2009; 21: 247-252.

Tripathi A, Kumar KV, Shaube SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 2010; 223: 592-600.

Trounson A. Spindle abnormalities in oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 838.

Tucker M, Wright G, Morton P. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1, 2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996;11:1513-1515.

Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation? *Eur J Obst Gynecol* 2004; 113S: S24-27.

Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. Intracytoplasmatic sperm injection. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 186:199-203.

Van Uem JFHM, Siebzehnrubl ER, Schuh B. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987; 1:752-753.

Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP. Solvent effects on cytoskeleton organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil* 1989; 87:809-820.

Vieira RC, Barcelos ID, Ferreira EM, de Araújo MC, dos Reis RM, Ferriani RA, Navarro PA. Evaluation of meiotic abnormalities of oocytes from polycystic ovary syndrome patients submitted to ovarian stimulation. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30: 241-247.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. Human Reprod 2001; 16: 2374-78.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001; 16:1464-1468.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmatic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 75: 345-356.

Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the Polscope. *Fertil Steril* 2002; 78:1-5.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M Ž F Ž
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M Ž F Ž
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....) .....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Influência da criopreservação na despolimerização e repolimerização do fuso meiótico e na ocorrência de anormalidades cromossômicas em óvulos humanos: comparação das técnicas de congelação lenta e de vitrificação**..

PESQUISADOR: Claúdia Messias Gomes.

CARGO/FUNÇÃO: Médica. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº.114419.

UNIDADE DO HC FMUSP:Departamento de Ginecologia e Obstetrícia- Centro de Reprodução Humana Mário Covas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO Ž RISCO MÍNIMO Ž RISCO MÉDIO X

RISCO BAIXO Ž RISCO MAIOR Ž

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃODAPESQUISA2anos.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. A senhora fará o tratamento com fertilização in vitro que é necessário para o seu caso de dificuldade para engravidar. Durante esse tratamento ocorre a coleta dos seus óvulos. Os óvulos que são usados para o tratamento são os óvulos maduros, os que são coletados e estão imaturos são descartados. Os óvulos utilizados nessa pesquisa são somente os imaturos e, portanto a senhora não terá prejuízo em seu tratamento. A pesquisa irá estudar a congelação de óvulos. O uso de congelação de óvulos pode auxiliar no tratamento de mulheres infertéis ou com necessidade de preservação de sua fertilidade. Esse tipo de tratamento ainda não é utilizado, pois não se tem tido sucesso com as experiências realizadas até o presente momento. Essa pesquisa tem por objetivo avaliar os prejuízos em termos de alterações genéticas em óvulos congelados por duas técnicas diferentes denominadas congelação lenta e de vitrificação.

2. Os óvulos imaturos coletados durante seu tratamento de fertilização in vitro serão congelados e após serem descongelados serão avaliados em microscópio para procura de alterações genéticas.O processo de congelação de óvulos é considerado experimental. Normalmente esses óvulos seriam descartados pois não servem para fertilização e formação de embriões. Portanto suas chances de gravidez com o tratamento não serão diminuídas.

3. Não haverá nenhum desconforto ou risco adicional durante a realização da pesquisa já que a coleta dos óvulos faz parte do tratamento para infertilidade que a senhora está fazendo.

4. Estudos como esse podem ajudar na obtenção de uma técnica segura para congelação dos óvulos e a senhora como paciente com dificuldade para engravidar pode futuramente beneficiar-se desse tipo de tratamento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

2. Você tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do seu tratamento.

3. A sua confidencialidade, sigilo e privacidade serão guarantidas.

4. Você terá toda assistência no Hospital das Clínicas HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

_____

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Cláudia Messias Gomes: pesquisadora responsável telefone:_78105213 Endereço: Rua Cristiano Viana, 671 ap 123 Pinheiros São Paulo

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

_____

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 19 .

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

APÊNDICE 2

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.03.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1229/07**, intitulado: **"INFLUÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO NA DINÂMICA DO FUSO MIEÓTICO E NA OCORRÊNCIA DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS EM ÓVULOS HUMANOS: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CONGELAÇÃO LENTA E DE VITRIFICAÇÃO"** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **DR. EDMUND CHADA BARACAT**
Pesquisador (a) Executante : **DRA. CLÁUDIA MESSIAS GOMES**

CAPPesq, 20 de março de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

APÊNDICE 3

HC

COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA-CAPPESQ

Ilmo. Sr.
Dr. Edmund Chada Baracat
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Comunicamos a Vossa Senhoria que o Protocolo de Pesquisa nº **1229/07** intitulado **"Influência da criopreservação na dinâmica do fuso mieótico e na ocorrência de anormalidades cromossômicas em óvulos humanos: Comparação das técnicas de congelação lenta e de vitrificação"**, aprovado por esta CAPPesq em 12.03.08, será encaminhado para análise da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde – CONEP/MS, tendo em vista tratar-se de protocolo que se enquadra na área temática "reprodução humana".

Cumpre lembrar que de acordo com os incisos VIII.4 e IX.5, da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, **o protocolo de pesquisa só poderá ser iniciado após a aprovação da CONEP/MS**.

CAPPesq, em 20 de março 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
mate

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS

Memo.CAPPesq – 127/08

São Paulo, 27 de junho de 2008.

Ilmo Sr.
Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
DD Pesquisador
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

Por determinação do Senhor Presidente, Prof. Dr. Eduardo Massad, encaminhamos para conhecimento, cópia do Parecer Conep nº 417/2008 referente à **APROVAÇÃO** do Protocolo de Pesquisa nº **1229/07** – intitulado **"Influência da criopreservação na dinâmica do fuso meiótico e na ocorrência de anormalidades cromossômicas em óvulos humanos: comparação das técnicas de congelação lenta e de vitrificação".**

Atenciosamente,

Tânia Maria da Silva
Secretária
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 – São Paulo – SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 – e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 417/2008

Registro CONEP: 14801 **(Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)**

CAAE – 1055.0.015.000-07 **Processo nº 25000.068610/2008-05**
Projeto de Pesquisa: *"Influência da criopreservação na dinâmica do fuso meiótico e na ocorrência de anormalidades cromossômicas em óvulos humanos: comparação das técnicas de congelação lenta e de vitrificação".*
Pesquisador Responsável: Dr. Edmund Chada Baracat
Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo –Depto de Obstretícia e Ginecologia
CEP de origem: Hospital das clínicas da FMUSP-São Paulo
Área Temática Especial: Grupo IA – Novos Procedimentos
Patrocinador: não se aplica

Sumário Geral do Protocolo

O projeto é de relevante importância na área de infertilidade, como alternativa ao procedimento de congelamento de embriões.

Os ovos congelados têm sido utilizados para diferentes fins, em procedimentos de fertilização *in vitro*, pra substituir a prática de congelamento de embriões, para preservação de óvulos de pacientes com necessidade de radio ou quimioterapia.

As práticas de conservação desses óvulos trazem problemas quando se faz o descongelamento, e ultimamente as técnicas de criopreservação têm sido utilizadas na tentativa de aumentar a taxa de fertilizações realizadas a partir desses óvulos descongelados.

O presente estudo justifica-se na medida em que os potenciais defeitos decorrentes da criopreservação serão avaliados, podendo gerar resultados surpreendentes e benéficos para casais com infertilidade.

O objetivo principal visa a avaliar as modificações no fuso meiótico e a ocorrência de aneuploidias em óvulos humanos em estágio de vesícula germinativa, submetidos a criopreservação pelas técnicas usuais de congelação lenta, ou por vitrificação.

A inovação proposta é a preservação e utilização de óvulos imaturos, que são descartados, e será possível desenvolver um estudo com grande casuística e observações detalhadas do potencial das perturbações intracelulares após a criopresenvação de óvulos humanos, estudos estes que não foram ainda realizados.

Os critérios de inclusão foram definidos como: Pacientes em tratamento para fertilização *in vitro* em fase de captação de óvulos; Idade entre 18 – 35 anos; Para exclusão: Idade acima de 35 anos; Antecedentes de aneuploidias ou abortamento de repetição; Diagnóstico de endometriose

A coleta de óvulos será seletiva (apenas óvulos de vesícula germinativa (GV), com exclusão dos degenerados).Estes óvulos, normalmente coletados nos procedimentos de fertilização *in vitro*, não são usados para fertilização, sendo descartados após sua coleta.

Local de realização

O estudo desenvolver-se-á no Centro de Reprodução Humana Mário Covas do HC da Divisão de Ginecologia da FM-USP. Entretanto, devido à desativação temporária deste Centro, motivada por recente incêndio, se até o início da coleta o Centro não tiver sido

RECEBIDO POR: Uliana
DATA: 26/06/08
Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa-CAPPesq : HCFMUSP

reaberto, as pacientes tratadas na Huntington Centro de Medicina Reprodutiva serão os sujeitos da amostra. Já existe documento deste Centro autorizando o uso das dependências para o estudo.

Local de Realização

Trata-se de Projeto de Pesquisa desenvolvido apenas pela Instituição proponente (Hospital das Clínicas/USP-SP), que possui estrutura adequada a este tipo de investigação. O atendimento prestado a pacientes será o fornecedor dos sujeitos da Amostra, cujo N amostral é igual a 94 mulheres que buscam o Serviço de Fertilização *in vitro* do Hospital.

Toda a equipe possui *Curriculum Vitae* e formação médica e científica que os habilita à execução do Projeto.

O projeto está inserido num Programa de PG e será utilizado para a defesa de Dissertação de Mestrado.

Apresentação do Protocolo

O projeto envolve uma aluna de Pós-Graduação, que está solicitando financiamento de Aparelho de Análise, e bolsa à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Entretanto, como se trata de Serviço Hospitalar, a pesquisa segue procedimentos de rotina e não exige orçamento específico.

A Folha de Rosto está corretamente preenchida e nenhum item (orçamento, cronograma, documentos de aprovação do CEP) foi negligenciado.

Não haverá formação de Banco Biológico, nem remessa de material biológico ao exterior.

Local de Realização

O projeto irá se desenvolver apenas no Depto de Ginecologia e Obstetrícia da FM-USP/SP. Apenas se, devido a incêndio ocorrido final de 2007, no momento da coleta de material não houver ainda condições de atendimento, esta será realizada em Centro especializado, do qual os pesquisadores já têm autorização.

Comentários

O projeto não oferece risco às pacientes, nem prejuízos na tentativa de fecundação, desde que os óvulos a serem utilizados são normalmente descartados. A presente Pesquisa oferece a oportunidade de se controlarem fatores que interferem na qualidade dos óvulos, após congelamento/descongelamento, fatores estes cujas origens não puderem ainda ser conhecidas e/ou controladas.

Os métodos para preparação dos óvulos, e os protocolos de congelamento e descongelamento/aquecimento, vitrificação, estão descritos de maneira clara, com pormenores precisos. Para a análise do fuso meiótico foi solicitado aparelhagem à FAPESP, apesar de já existirem aparelhos no Hospital das Clínicas. Os procedimentos para detecção de aneuploidia (análise de cariótipos) estão bem delineados e as análises estatísitca são apropriadas.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apesar de não estar escrito em forma de convite, é sucinto, claro e de fácil compreensão. Descreve os objetivos da pesquisa e mostra, objetivamente, a ausência de riscos adicionais aos procedimentos de coleta de óvulos para fertilização *in vitro*. E que também não haverá prejuízos, pelo uso de óvulos em outro procedimento (pesquisa), desde que estes são óvulos comumente descartados, por serem imaturos. Há a possibilidade de contatos diretos com os pesquisadores, e a opção de sair da pesquisa, se a paciente o desejar, ou se houver algum dano à saúde. Neste caso, está assegurada a assistência hospitalar.

Cont.do Parecer CONEP Nº 417/2008

Considerações

O único ponto crítico deste projeto seria a impossibilidade de se realizar a coleta dos óvulos fora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC, devido a incêndio ocorrido no final de 2007. Entretanto, se no momento da coleta este problema não estiver resolvido, há a possibilidade de realizar as coletas em Centro particular (documento anexado ao projeto), que presta Serviço em Fertilização Assistida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Projeto aprovado.**

Brasília, 25 de junho de 2008.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

Tv/fr