

Dissertação - Artigo de Revisão Bibliográfica

Mestrado Integrado em Medicina

## **Criopreservação ovocitária**

Mariana Cebotari

**Orientador**

Dra. Cláudia Sofia Macário Lourenço

# Criopreservação ovocitária

## Revisão Bibliográfica

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

Mariana Cebotari Nº aluno: 201107464

Mestrado Integrado em Medicina – 6º Ano Profissionalizante

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade do Porto

Endereço eletrónico: olimpiada\_sod@hotmail.com

**Orientador:** Dra. Cláudia Sofia Macário Lourenço

Professora Auxiliar da Unidade Curricular de Ginecologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Assistente Hospitalar de Ginecologia/Obstetrícia

Centro Hospitalar do Porto | Centro Materno-Infantil do Norte

Largo do Professor Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal

## Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Cláudia Lourenço, pela sua ajuda e paciência.

À minha família, especialmente meu irmão Victor, pelo apoio incondicional.

Ao Ricardo, pela ajuda na revisão deste trabalho.

# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Metodologia</b> .....	<b>3</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>4</b>
Condições que resultam no declínio da fertilidade .....	4
Tratamento antineoplásico .....	4
Radioterapia .....	5
Quimioterapia .....	5
Terapêuticas biológicas .....	5
Hormonoterapia .....	6
Doenças autoimunes e síndromes genéticas .....	6
Declínio da fertilidade relacionado com a idade avançada .....	6
Aconselhamento para preservação da fertilidade .....	7
<b>Criopreservação ovocitária</b> .....	<b>8</b>
Congelação lenta .....	9
Vitrificação .....	10
A criopreservação dos ovócitos imaturos .....	11
Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos .....	11
Contextualização portuguesa .....	12
Questões éticas relacionadas com a preservação de fertilidade .....	13
<b>Discussão</b> .....	<b>16</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>18</b>

## Resumo

A preservação da fertilidade consiste na utilização de determinadas técnicas que possibilitam a manutenção da saúde reprodutiva nos pacientes que apresentam risco de declínio da fertilidade. Verifica-se um desenvolvimento crescente nesta área, devido ao aumento da necessidade, em consequência do aumento da incidência de neoplasias em jovens adultos e a necessidade de iniciar tratamentos gonadotóxicos. A preservação da fertilidade é de grande importância para estes pacientes.

O objectivo deste trabalho passa pela revisão dos artigos sobre a preservação da fertilidade feminina, recomendações existentes atualmente, opções disponíveis e técnicas utilizadas. Sendo a criopreservação a técnica mais utilizada, este trabalho vai ser focado nesta técnica em particular, passando pela descrição breve das indicações actualmente existentes em Portugal, o processo, as formas existentes de criopreservação, as suas características, as vantagens/desvantagens de cada uma delas, a evolução dos processos usados ao longo do tempo, as recomendações actuais e as questões éticas implicadas.

Várias condições causam declínio da fertilidade, no entanto a preservação desta estão apenas indicados para pacientes com doença oncológica e/ou que vão realizar tratamentos gonadotóxicos (quimioterapia, radioterapia, cirurgias) e para doentes com determinados síndromes genéticos. Um dos procedimentos mais utilizados actualmente é a criopreservação dos ovócitos, maduros ou imaturos. A criopreservação dos ovócitos pode ser conseguida através de duas técnicas diferentes, o congelamento e a vitrificação.

Concluindo, a técnica mais utilizada na preservação da fertilidade feminina actualmente é a criopreservação dos ovócitos, sejam estes maduros ou imaturos. Esta técnica apresenta poucos dilemas éticos associados quando comparada com as outras técnicas disponíveis. É necessário continuar a investigação no sentido de alcançar a melhor técnica, com melhores resultados e averiguar o perfil de segurança da criopreservação ovocitária.

Palavras-chave: preservação da fertilidade, declínio da fertilidade, criopreservação ovocitária, vitrificação e congelamento ovocitário, ovócitos imaturos.

## Abstract

The fertility preservation is the art of employing certain techniques that allow the maintenance of the reproductive health of patients in risk of losing their reproductive capacity. Recently there was an increase of the investigation in this area, caused by a bigger demand as a consequence of upsurge of the cancer incidence in the young adults and the necessity of implementing gonadotoxic treatment. The fertility preservation is of major importance in these patients.

The objective of this thesis consists in reviewing articles about fertility preservation in females, current recommendations, available options and employed techniques. As the cryopreservation is the most utilized technique, the paper will focus on this particular method, describing briefly the current indications for its use in Portugal, the process, the existent ways of achieving cryopreservation and their characteristics and the advantage/ disadvantage of each one, the evolution of the processes used, the present recommendations and the ethical considerations.

Various conditions cause fertility loss, but its preservation is mostly indicated to patients with oncological disease and to those that will receive gonadotoxic treatments (chemotherapy, radiotherapy, surgery) and for patients with certain genetic syndromes. The most employed technique nowadays is the oocyte cryopreservation, in the mature or immature form. The cryopreservation of the oocyte can be achieved by two different techniques, slow freezing and vitrification.

In conclusion, the mature or immature oocyte cryopreservation is the most used technique in the preservation of the female fertility. This technique doesn't pose many ethical dilemmas, as the other available methods. It is still necessary to continue the investigation in this field for reaching the best technique with better results and to validate the safety of oocyte cryopreservation.

Key words: fertility preservation, fertility decline, oocyte cryopreservation, vitrification and slow freezing, immature oocytes.

## Metodologia

Foi realizada uma pesquisa no *PubMed*, utilizando as seguintes palavras-chave: infertilidade, preservação de fertilidade, criopreservação de ovócitos maduros, maturação *in vitro*.

Foram definidos como critérios de inclusão: estudos, artigos de revisão e *case report* escritos em inglês e português. Foi dada preferência a artigos publicados há menos de dez anos, embora artigos mais antigos tenham sido utilizados face à sua relevância sobre o tema. Após leitura integral de alguns artigos e de alguns resumos foram escolhidas as publicações com maior interesse. Foi incluída bibliografia adicional dada a necessidade de estudar os artigos primários referidos nas revisões e nas meta-análises.

# Introdução

## Condições que resultam no declínio da fertilidade

A preservação da fertilidade é um campo emergente que proporciona a oportunidade de manter a saúde reprodutiva de todos os pacientes que necessitam receber tratamento gonadotóxico por razões médicas ou desejam guardar os seus gâmetas com vista de adiar a criação de uma família. [1]

## Tratamento antineoplásico

O cancro da mama, cervical e o colorrectal são os cancros mais prevalentes nas mulheres a nível mundial. Aproximadamente 4% das mulheres com cancro terão menos de 35 anos de idade na altura do diagnóstico, sendo o cancro da mama o cancro com maior incidência neste grupo etário. Alguns dos pacientes podem ser diagnosticados numa fase precoce, aumentando assim a probabilidade de cura. O atraso da gravidez nos países desenvolvidos resulta numa proporção crescente de mulheres diagnosticadas com patologia oncológica antes da primeira gravidez. Com a melhoria do tratamento para a doença oncológica e as estratégias de suporte, os médicos responsáveis pelo tratamento de jovens adultos e mulheres na idade fértil estão, não só preocupados com o atingimento dum estado de cura, mas também com a preservação da fertilidade destas. A quimioterapia e a radioterapia em doses elevadas aumentam de maneira radical o tempo de sobrevivência dos pacientes oncológicos, mas os efeitos secundários destes tratamentos são a falência ovárica prematura e a infertilidade. Neste caso a preservação da fertilidade torna-se uma questão fundamental na altura do diagnóstico.[1, 2, 3]

Os tratamentos usados no contexto da doença oncológica (cirurgia, radioterapia e terapêutica sistémica) podem ter influência sobre a fertilidade através de um ou mais dos seguintes mecanismos:[4]

- ✓ gonadotoxicidade direta, quando há lesão direta do ovário ou do epitélio seminífero no testículo;
- ✓ gonadotoxicidade indireta, quando as alterações interferem com o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, sobretudo através do efeito na função endócrina.

Nas mulheres, quimioterapia e radioterapia afectam tanto os ovários, diminuindo o pool ovocitário, como o útero, atingindo a vascularização uterina.

## Radioterapia

A radioterapia é utilizada no curso do tratamento de diversas neoplasias e pode ser aplicada em campos que afetem os órgãos reprodutores[5].

As gónadas são muito sensíveis à radioterapia cujos efeitos gonadotóxicos dependem da dose, do esquema de fracionamento e sobretudo do campo de irradiação.[5] A radioterapia da pélvis pode ter um efeito negativo sobre a função ovárica e no útero ao alterar a vascularização. Doses de 4-6 Gy podem provocar a perda de 50 % do *pool* folicular, enquanto que a irradiação total acarreta um risco aumentado de insuficiência ovárica em 55-80 % dos pacientes. As mulheres mais jovens (< 40 anos) são menos afectadas pela radiação, levando a menos danos.[6]

A irradiação não-pelvica também pode prejudicar a fertilidade ao interferir no eixo hipotálamo-hipófise, causando um mal funcionamento da ovogénese.[7]

## Quimioterapia

Os agentes de quimioterapia afectam a função ovárica através de vários mecanismos, como a depleção folicular (mecanismo de *burn-out*), dano vascular e fibrose cortical. A maioria dos agentes quimioterapêuticos atuam no ciclo de divisão celular, afectando dessa forma, os ovócitos na fase de maturação. A idade do paciente e o plano terapêutico (tipo e dose) são factores importantes no risco de falência ovárica prematura. Mulheres mais velhas tem um risco maior para infertilidade permanente. Vários estudos mostram que as mulheres com menos de 40 anos expostas a quimioterapia tem uma probabilidade de 61% de desenvolver amenorreia, enquanto que as mulheres com mais de 40 anos, 95%. De um modo geral, estima-se que 1/3 das mulheres expostas a quimioterapia irão desenvolver falência ovárica prematura. [1, 8, 9]

## Terapêuticas biológicas

Existe ainda pouca informação sobre o impacto das terapêuticas biológicas na fertilidade [8]. A grande maioria dos Anticorpos Monoclonais e das pequenas moléculas inibidoras da tirosina-cinase apresentam reservas na gravidez pelo risco teratogénico. O Bevacizumab é o fármaco melhor estudado, com falência ovárica reportada em 34% das doentes que o receberam associado a quimioterapia para tumores do cólon.[10]

## Hormonoterapia

A indução de amenorreia prolongada tem impacto na fertilidade devendo ter-se em consideração que a administração de hormonoterapia por períodos prolongados pode, por si só, levar a uma situação de infertilidade decorrente apenas do inexorável envelhecimento ovário.[10]

## Doenças autoimunes e síndromes genéticas

Existem doenças autoimunes e síndromes genéticas que podem causar diminuição da fertilidade.

Uma das causas bem estabelecidas de diminuição de fertilidade é a falência ovária prematura. Esta é maioritariamente idiopática, mas pode ser genética (Síndrome de Turner, Trissomia X e Síndrome do X frágil).

Até 20% das pacientes com falência ovária prematura apresentam uma doença autoimune associada, como Diabetes Mellitus, disfunção tiroideia, Síndrome de Addison, Miastenia Gravis, Doença de Crohn, Lúpus Eritematoso Sistémico ou Artrite Reumatoide[1,2,11]

Nestes casos, os indivíduos acometidos pela falência ovária prematura, podem também beneficiar das técnicas de preservação de fertilidade.

A quimioterapia pode ser utilizada em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, Síndromes Mielodisplásicas e algumas doenças hematológicas, o que acarreta um risco elevado de infertilidade.[12] O *target* destas terapias é o ciclo celular e a interrupção ou a paragem deste. Esta paragem pode provocar defeitos severos nos mecanismos de replicação e transcrição do ADN, levando por fim à morte celular.[1]

## Declínio da fertilidade relacionado com a idade avançada

O número de mulheres com mais de 40 anos de idade à procura de tratamentos para infertilidade tem vindo a aumentar de uma forma contínua nesta década. Os motivos para adiar o nascimento do primeiro filho são vários e devem-se a vários factores relacionados com o estilo de vida, tais como o desejo da construção de uma carreira, a impossibilidade de encontrar o parceiro ideal ou o desejo de construir uma nova família.[13]

O impacto da idade na fertilidade feminina é um facto bem conhecido, sendo evidente que as hipóteses de conceber uma criança saudável através dum processo natural, são mais favoráveis numa idade mais precoce.[14] O efeito do envelhecimento sobre a função

reprodutiva reflete-se na perda progressiva do pool de folículos ovários e com o declínio da qualidade dos ovócitos, resultando por fim na menopausa.[13, 15]

Para as mulheres que desejam adiar o início da maternidade e que possuem uma boa reserva ovocitária, o congelamento ovocitário representa uma opção a ter em conta. É de notar que apesar de o sucesso da criopreservação ovocitária poder ser tão alto como 45%, este declina rapidamente quando a mulher chega aos 35 anos de idade. Assim sendo, o sucesso dos procedimentos é inversamente proporcional à idade materna.[13, 16]

### **Aconselhamento para preservação da fertilidade**

Após o diagnóstico da neoplasia e antes de iniciar o tratamento gonadotóxico é preciso discutir com os pacientes as hipóteses disponíveis para a preservação da sua fertilidade[8, 12]. Estes devem ser informados de maneira clara e concisa sobre as técnicas disponíveis, as suas taxas de sucesso e os potenciais riscos associados. Os que manifestam interesse devem ser prontamente referenciados para um médico especialista em medicina reprodutiva [8,12]. Para conseguir ajudar estes pacientes é necessária uma equipa multidisciplinar, capaz de tomar decisões tendo em conta as características individuais de cada um. [8, 12]

Segundo as mais recentes guidelines da ASCO, o responsável pelo aconselhamento é o prestador de cuidados de saúde, termo que engloba oncologistas, ginecologistas, urologistas, hematologistas, oncologistas pediátricos, cirurgiões, bem como enfermeiras, assistentes sociais e psicólogos. [8,17]

O aconselhamento especializado também está recomendado aos pacientes com síndromes genéticas que provocam o declínio da função reprodutiva e pacientes com condições clínicas não oncológicas mas que irão receber tratamento gonadotóxico.[18]

Para as pacientes com declínio da fertilidade relacionada com a idade não existem, atualmente, recomendações específicas publicadas. [8]

## Criopreservação ovocitária

Em Outubro de 2012 a Sociedade Americana de Medicina da Reprodução retirou o rótulo de “experimental” à criopreservação de ovócitos[19], passando a ser considerada uma técnica de preservação da fertilidade com eficácia bem estabelecida, depois de se ter demonstrado que a vitrificação dos ovócitos permite taxas de sobrevivência, após desvitrificação, superiores a 90%, não existindo diferenças nas taxas de fecundação, no número de embriões de boa qualidade ou na taxa de gravidez clínica por ciclo relativamente aos ovócitos utilizados a fresco.[10, 20]

A criopreservação ovocitária está a tornar-se uma prática comum na maioria dos centros de fertilização *in vitro* com o desenvolvimento da técnica de vitrificação. As dificuldades com criopreservação ovocitária através de congelação lenta (formação de cristais de gelo, baixa taxa de sobrevivência, e embriões de baixa qualidade) nas últimas décadas, fizeram com que a criopreservação embrionária fosse a primeira escolha para a preservação do material reprodutivo. A técnica de vitrificação veio melhorar significativamente a sobrevivência dos ovócitos, as taxas de fecundação e a proporção de embriões de elevada qualidade, face à congelação lenta.[10] Como consequência destas melhorias, as taxas de gravidez e nascimentos com os ovócitos congelados são comparáveis àquelas obtidas com ovócitos frescos. Devido a estes factores, a criopreservação ovocitária actualmente é uma alternativa viável à criopreservação embrionária.

Em comparação com os embriões, os ovócitos têm uma menor viabilidade após a descongelação devido à formação de microcristais que danificam a célula. O processo de criopreservação acarreta um endurecimento da zona pelúcida do ovócito com baixas taxas de fertilização (2% por ovócito). Com a técnica de criopreservação rápida e vitrificação, foram reportadas taxas de gravidez de 63,2% por transferência.[21]

Sem dúvida alguma, tanto as melhorias nas técnicas, como a remoção recente do rótulo “experimental”, abriram uma nova era para esta tecnologia. Espera-se que a criopreservação ovocitária se torne uma mais-valia na fertilização *in vitro* nos vários cenários clínicos: na indisponibilidade do esperma na altura da colheita dos ovócitos, nos casos do Síndrome de Hiperestimulação, no caso de resposta fraca ao tratamento, nas pacientes em risco de perder a sua fertilidade devido a anomalias genéticas (como a mutação BRCA, o Síndrome de Turner, a Síndrome do X Frágil e deleções do cromossoma X), como para os casais que não desejam criopreservar embriões devido a razões éticas, legais ou religiosas[16] e também fornecer armazenamento seguro do excesso de ovócitos obtidos durante as técnicas de reprodução assistida.[22]

Apesar de não existirem dados suficientes, ainda não foram reportadas anomalias cromossómicas, defeitos congénitos ou défices de desenvolvimento nos nascidos de ovócitos criopreservados.[16]

A preservação da fertilidade através da criopreservação de ovócitos compreende uma fase inicial de estimulação hormonal, para recrutamento multifolicular, seguida de punção folicular e criopreservação por vitrificação (congelamento ultra-rápida). O processo total ( estimulação ovárica e colheita ovocitária) leva 2-3 semanas, dependendo do ciclo ovulatório de cada paciente.

Estes tratamentos de estimulação hormonal acarretam um aumento suprafisiológico dos níveis circulantes de estrogénios que impõem alguma cautela no caso de neoplasias hormonossensíveis. Para contornar esta dificuldade, pode proceder-se à colheita dos ovócitos imaturos seguida da maturação in vitro. Esta é uma estratégia a considerar quando a estimulação ovárica não é possível. [23]

Actualmente existem duas técnicas de criopreservação ovocitária: a congelamento lento e a vitrificação.

## **Congelamento lento**

A congelamento lento é o primeiro método bem sucedido utilizado na criopreservação de ovócitos / embriões.

Esta técnica é caracterizada pela diminuição lenta da temperatura, conseguida através da utilização de equipamentos de congelamento a velocidade controlada, conjugada com uma exposição prolongada a reduzidas molaridades de crioprotectores permeáveis, proporcionando uma desidratação celular lenta.[24]

O princípio por trás deste método é induzir a cristalização de água extracelular em gelo de uma forma lenta e controlada de tal modo que a água intracelular seja atraída para fora da célula resultando numa solidificação intracelular sem, ou com formação mínima de cristais de gelo intracelular.[24] O procedimento envolve dois passos principais: equilíbrio e congelamento. No primeiro passo, os ovócitos são transferidos do meio de cultura isotónico para uma solução hiperosmótica contendo um ou mais aditivos crioprotectores permeáveis e é dado um breve período de equilíbrio para absorver as substâncias crioprotectoras.[24]

Depois da exposição aos crioprotectores, os ovócitos são colocados em palhetas onde ficam armazenados. Estas são expostas a temperaturas sucessivamente mais baixas e a formação de cristais de gelo na solução é induzida através do contacto com um objeto metálico arrefecido a -196°C na extremidade da palheta mais afastada do local onde se encontram as

células. Este passo constitui um avanço importante nos programas de criopreservação de ovócitos humanos: previne a supercongelção, iniciando-se assim o processo de desidratação celular.[25, 26]

Através da congelação suficientemente lenta, quase toda a água pode ser removida do meio intracelular o que permite que não ocorram danos nas células quando são transferidas para o azoto líquido.[27, 28]

As amostras congeladas são então armazenadas num tanque de armazenamento com azoto líquido para utilização futura. Apenas antes do uso, as amostras podem ser recuperadas do tanque, descongeladas a 37° C e rehidratadas por diluição por etapas para remover as substâncias crioprotectoras dos ovócitos congelados.[29, 30]

## Vitrificação

Vitrificação é um termo utilizado para referir o fenómeno físico que descreve a solidificação de água ou soluções à base de água em um estado líquido amorfo semelhante ao vidro (chamado estado vítreo), devido à elevação extrema na viscosidade durante o arrefecimento, sem a formação de cristais de gelo[22]

O processo de vitrificação leva as amostras a uma temperatura extremamente baixa, para evitar a formação de cristais de gelo. Isto é conseguido combinando a utilização de uma elevada concentração de solução crioprotectora com uma velocidade de arrefecimento extremamente rápida. A vitrificação tem a vantagem de ser realizada rápida e facilmente e não requer equipamento caro. No entanto, também pode expor facilmente as amostras a choque osmótico e toxicidade devido à alta concentração de crioprotectores usados, o que pode afetar a viabilidade do ovócito. [31][32]

O sucesso do método de vitrificação está relacionado com a concentração e volume dos crioprotectores, com o tempo de exposição aos mesmos e com a velocidade de arrefecimento, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular, sem deste modo provocar lesões e efeito tóxico ou osmótico. [29][33][34] Na vitrificação elimina-se totalmente a formação de cristais de gelo, contudo existe uma grande probabilidade de ocorrer fratura da zona pelúcida, com consequente alteração dos organelos intracelulares e do citoesqueleto.[35]

A maioria dos estudos mostrou que os métodos de vitrificação são mais eficientes e confiáveis do que qualquer versão do método de congelação lenta[22] sendo que a vitrificação, ao contrario do congelamento lento, evita a formação de cristais de gelo tanto no espaço intracelular como no espaço extracelular.[29]

## A criopreservação dos ovócitos imaturos

Alguns centros realizam a colheita de ovócitos imaturos (sem recurso à estimulação ovárica e, portanto, sem risco de elevação dos estrogénios plasmáticos) para posterior maturação *in vitro* antes ou depois da vitrificação.[20]

A colheita ovocitária é geralmente realizada antes da ovulação, mas os ovócitos imaturos podem ser recuperados tanto na fase folicular, como na fase lútea.[36]

A preservação após a maturação *in vitro* (IVM) pode ser conseguida através da vitrificação ou congelamento lento. A vitrificação dos ovócitos IVM resultou numa taxa de natalidade de 20%, no entanto as taxa de sobrevivência e fecundação dos ovócitos IVM são mais baixas do que aquelas dos ovocitos maduros.[1]

A criopreservação dos ovócitos imaturos tem vantagens distintas dos ovócitos maduros. Esse método surgiu como uma opção ao congelamento de ovócitos maduros, a partir da hipótese de que gâmetas imaturos são mais resistentes ao processo de criopreservação, por serem mais indiferenciados, pela ausência de fusos e por ter cromossomos protegidos pela membrana nuclear.[37] Os ovócitos imaturos podem contornar a lesão aos cromossomas, que ocorre frequentemente em ovócitos maduros durante criopreservação, dado que os cromossomas permanecem no núcleo. Este facto protege-os da exposição directa a temperaturas baixas e substâncias crioprotectoras.[38] Além disso, a criopreservação dos ovócitos imaturos permitem aos pacientes oncológicos preservar a fertilidade sem atrasos no início do tratamento radio-quimioterapêutico.

Mas esta técnica apresenta também desvantagens, sendo que os ovócitos que sofreram maturação *in vitro*, apresentam taxas mais baixas de fertilização do que os ovócitos maduros. Até a data, poucos nascimentos foram reportados através desta técnica, tendo em conta que a criopreservação dos ovócitos maduros é ainda um método mais eficiente do que a criopreservação de ovócitos imaturos.[22][36]

## Maturação *in vitro* de ovócitos

A maturação *in vitro* de ovócitos é um tratamento recente, mas promissor. Apresenta-se como uma alternativa atractiva uma vez que não implica a administração de hormonas exógenas.[39]

Esta técnica desenvolveu-se sobretudo para diminuir as complicações de síndrome de hiperestimulação ovárica. A recolha de ovócitos imaturos é efectuada através da punção dos folículos antrais, com posterior maturação *in vitro* durante 24 a 52 horas (média 30h) e criopreservação dos ovócitos.[22,29]

Nos últimos anos verificou-se uma melhoria substancial do resultado clínico tendo sido referidas na literatura o nascimento de mais de 400 crianças após a maturação *in vitro*, seguido de técnica de procriação medicamente assistida, maioritariamente em doentes com síndrome de ovários poliquísticos, sendo a taxa de gravidez de 9% por aspiração. Estas técnicas continuam a ser experimentais, as taxas de fertilização são ainda subóptimas, associado a pior qualidade embrionária e a maior incidência de abortos. A introdução de substâncias no meio onde é feita a maturação do ovócito, poderá vir a exercer um efeito positivo dando origem a embriões de melhor qualidade. [17,40]

No subgrupo de doentes com doença oncológica esta técnica tem a vantagem de poder ser utilizada nas mulheres sem parceiro, e adolescentes, sem os potenciais riscos da estimulação hormonal. Outro campo importante é a avaliação da segurança destas intervenções moleculares. Estudos efectuados não revelaram alterações cromossómicas nos ovócitos[21], mas ainda são necessários estudos adicionais para garantir a segurança destes procedimentos em vista de retirar o rótulo experimental.

## Contextualização portuguesa

As técnicas de preservação da fertilidade feminina e masculina estão disponíveis no âmbito do Serviço Nacional de Saúde Português e em diferentes instituições privadas de saúde.[20] A lei portuguesa não impede nenhuma pessoa de recorrer ao Serviço Nacional de Saúde para conseguir preservar a fertilidade futura por motivos económicos, sociais ou culturais, mas os centros públicos priorizam os utentes com algum tipo de patologia. (decreto Lei n.º 17/2016, de 20 de junho)

No âmbito do Serviço Nacional de Saúde, os procedimentos associados à realização das técnicas e à congelação dos gametas recolhidos não comportam quaisquer custos para os doentes oncológicos . Apenas as mulheres submetidas a estimulação ovárica têm de suportar os custos inerentes à medicação necessária.[10][20]

**Indicações gerais para preservação da fertilidade** (no âmbito do SNS) : Mulheres com idade inferior a 40 anos, em idade fértil, com adequada reserva ovárica, (contagem de folículos antrais, níveis de Hormona Anti-Mulleriana e FSH), cujo projeto reprodutivo não está completo e cujo prognóstico é favorável.[20]

**Contraindicações gerais:** mulheres com idade  $\geq$  40 anos; falência ovárica; projeto reprodutivo completo; doença metastizada ou prognóstico muito reservado. [20]

## Questões éticas relacionadas com a preservação de fertilidade

A preservação da fertilidade em pacientes com cancro e preservação da fertilidade em mulheres que estão livres de doenças e que desejam evitar a perda de fertilidade relacionada com a idade são por vezes controversas devido à incerteza de usar o material criopreservado no futuro e ao benefício duvidoso para os pacientes.

Como resultado de tratamentos mais eficazes, a taxa de sobrevivência a longo prazo de pacientes jovens com cancro aumentou nas últimas décadas. Infertilidade é uma questão importante para pacientes com cancro e para as suas famílias, e que deve ser abordada. Devem ser dadas informações realistas sobre os novos avanços na preservação da fertilidade, ao fim de assegurar um aconselhamento e tratamento apropriados.[1][12]

A possibilidade de vitrificação de ovócitos com taxas elevadas de viabilidade após desvitrificação, permitiu o armazenamento de gâmetas femininos de forma mais segura ao ultrapassar as dificuldades clássicas de manter a viabilidade dos ovócitos com o processo convencional de congelação.[41] O congelamento de ovócitos maduros assume grande importância ao eliminar dilemas éticos, legais e religiosos que envolvem o congelamento de embriões. Dessa forma, torna-se uma mais-valia para as mulheres sem parceiro estável e que não aceitariam a fertilização de seus ovócitos por gâmetas de um doador anónimo, ou que por questões pessoais sejam contra o congelamento de embriões.

Além disso, assume papel de destaque entre as opções de preservação de fertilidade em adolescentes, já que estas, de modo geral, ainda não têm parceiro seguro com quem pretendam constituir uma família.[37] Estas novas técnicas tornaram-se a primeira escolha na preservação da fertilidade, evitando as questões éticas e legais da criopreservação dos embriões, mas ao mesmo tempo criando novos dilemas pessoais e éticos.

A preservação da fertilidade é uma área delicada, repleta de dilemas éticos e que necessita de uma atenção particular, na procura de um agir eticamente correto para com estes doentes. Podemos analisar a criopreservação ovocitária segundo o Princípio da Beneficência que engloba os quatro princípios da Ética Médica (Beneficência, Não maleficência, Autonomia e Justiça).[10]

Os tratamentos de Medicina da Reprodução respeitam o princípio da beneficência, pois mesmo quando não restauram a fertilidade natural, evitam as consequências de uma função reprodutiva comprometida. [10]

O princípio da não maleficência visa pesar os procedimentos, em termos de riscos e benefícios, para assegurar que os riscos decorrentes das técnicas utilizadas (a estimulação e a punção folicular ecoguiada, atraso do tratamento oncológico e a reprodução em idade mais avançada), são mínimos, controláveis e aceitáveis para o doente.[10]

Para que o princípio da autonomia seja respeitado, o paciente deve ser devidamente informado sobre os riscos e a natureza das técnicas disponíveis e da possibilidade de o tratamento não resultar em gravidez de termo. Devem ser apresentadas as outras informações consideradas fundamentais, tais como as taxas de sucesso e as estatísticas do centro implicado, os custos do tratamento e a legislação em vigor quanto ao armazenamento e o destino futuro dos gâmetas colhidos. Por fim, devem ser sempre discutidas as outras hipóteses de parentalidade, nomeadamente a adopção. [10]

O princípio da justiça procura uma distribuição adequada dos recursos, promovendo a igualdade de acesso à informação, às técnicas pertinentes e disponíveis, assim como aos centros de preservação da fertilidade, através de uma rede de referenciação.[10]

Em qualquer contexto, em que imperam incertezas e a possibilidade de óbito da paciente, é de extrema importância o seu pleno esclarecimento, bem como dos seus responsáveis legais e familiares envolvidos no processo, além da documentação do consentimento livre e esclarecido para todas as etapas.[37]

Um caso notavelmente difícil de analisar são os doentes com mau prognóstico. Como estes doentes têm um prognóstico reservado, não deveriam ser submetidos aos procedimentos de preservação de fertilidade, sendo que a probabilidade de eles utilizarem no futuro os gâmetas criopreservados é escassa. Por outro lado, a lei portuguesa não estipula limites de acesso a estes procedimentos, sendo na prática a decisão definitiva a cargo da equipa médica.[10]

Uma questão sensível do ponto de vista ético é a preservação da fertilidade das mulheres consideradas “saudáveis” que recorrem a criopreservação por motivos pessoais, uma vez que a infertilidade destas mulheres não resulta de motivos exteriores ao seu controlo, como é o caso de doenças oncológicas. [42]

Estes procedimentos permitem uma autonomia pessoal que proporciona oportunidade de construir uma carreira e de se preparar para a maternidade. Por outro lado, também podem provocar um sentimento de falsa segurança numa maternidade adiada, porque nem sempre é possível conseguir uma gravidez de termo e as taxas de gravidez continuam baixas. [42]

Outro dilema é a gravidez em idade avançada e as complicações associadas, que poderão aumentar no futuro com a liberalização e o conhecimento crescente destas novas técnicas, sendo necessário estabelecer um limite de idade. [42]

O destino do material preservado é outra questão a ter em conta. A abordagem deve contemplar uma reflexão a respeito do período de armazenamento dos gâmetas, embriões ou tecidos congelados em bancos. O seu uso póstumo e a doação para receptores ou investigação científica frequentemente permanecem dilemas pessoais.[37] De acordo com o

Ministério da Saúde, este material será destruído se ao fim de três anos não for utilizado, nem reclamado.

O destino dos gâmetas, tecido ovárico e testicular é considerado menos problemático do que o dos embriões, dado aos primeiros não ser atribuído estatuto moral.[10]

Por fim, é importante inferir sobre a segurança das técnicas empregues. Embora as crianças nascidas de ovócitos vitrificados não apresentem maiores taxas de anomalias congénitas do que as que nasceram de ovócitos frescos, a segurança a longo prazo ainda deve ser provada. A tendência emergente de preservação da fertilidade na prática clínica está trazendo novas opções de tratamento que podem implicar novos dilemas éticos.[42]

## Discussão

A criopreservação ovocitária é uma técnica empregue na procriação medicamente assistida, melhorada ao longo do tempo e que conseguiu passar de uma técnica experimental para uma metodologia bem estabelecida. Actualmente representa uma alternativa viável a criopreservação embrionária, porque para além de ultrapassar as questões éticas associadas a criopreservação de embriões, preserva a fertilidade das pacientes em risco de falência ovárica e que são obrigadas a adiar o seu projecto de maternidade. É largamente utilizada em todos os centros de reprodução assistida.

Apesar dos avanços conseguidos nos últimos anos, esta técnica apresenta algumas desvantagens. O maior desafio durante a criopreservação de ovócitos é prevenir a formação de cristais de gelo e concentrações tóxicas de solutos (as duas principais causas de morte celular associadas a criopreservação), enquanto se mantém a funcionalidade dos organelos intracelulares e a viabilidade do ovócito. Para tal, a solução de congelação, na qual as células são suspensas, deve ser suplementada com aditivos crioprotectores. A exposição aos aditivos crioprotectores suporta a desidratação da célula e reduz a formação de gelo intracelular. [29] Este método constitui uma estratégia para preservação da fertilidade nos pacientes que conseguem adiar o tratamento oncológico e quando a estimulação ovárica controlada não está contraindicada. É também uma opção válida para as mulheres na idade fértil sem um parceiro ou que não aceitam esperma de doador e têm objecções morais contra preservação embrionária.

Quando comparamos as duas técnicas de criopreservação, podemos concluir que a vitrificação é superior ao congelamento lento em termos de sobrevivência de ovócitos, fertilização, implantação e taxas de gravidez clínica.

Taxas de fertilização e desenvolvimento de embriões semelhantes foram obtidas com ovócitos frescos e vitrificados e as taxas de gravidez e taxas de aneuploidia embrionária de ovócitos vitrificados são semelhantes aos ovócitos frescos.

O número total de crianças nascidas no mundo após a fecundação de ovócitos criopreservados é superior a 1500[29]. Estudos indicam que as gestações e os recém-nascidos concebidos após a criopreservação ovocitária não apresentam risco aumentado de resultados obstétricos adversos ou anomalias congénitas. Não se observou qualquer aumento no número de cromossomas anormais ou dispersos nos ovócitos descongelados. Além disso, não foi encontrada diferença ao comparar a incidência de anormalidades cromossómicas em embriões humanos obtidos de ovócitos frescos e congelados. Apesar dos resultados promissores, ainda há preocupações quanto à possibilidade de aneuploidias cromossómicas ou outras anormalidades cariotípicas, malformações de órgãos ou outros problemas de desenvolvimento

em descendentes. Portanto, são necessários mais estudos de acompanhamento com número adequado de pacientes envolvidos para esclarecer esta questão.

Em suma, ainda há muita investigação a fazer no sentido de alcançar a melhor técnica, com melhores resultados e averiguar o perfil de segurança da criopreservação ovocitária.

## Bibliografia

- [1] C. Gonzalez *et al.*(2012) “ENABLING TECHNOLOGIES FOR CELL -BASED CLINICAL TRANSLATION Concise Review: Immunologic Lessons From Solid Organ Transplantation for Stem Cell-Based Therapies,” *stem cell tran. med.* pp. 136–142.
- [2] J. E. Roberts. (2005) “Fertility Preservation: A Comprehensive Approach to the Young Woman With Cancer,” *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, vol. 2005, no. 34, pp. 57–59.
- [3] F. A. Peccatori *et al.*( 2013) “Clinical practice guidelines Cancer , pregnancy and fertility : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up: clinical practice guidelines,” vol. 24.
- [4] T. K. Woodruff. (2011) “People with cancer,” *Nat Rev Clin Oncol.* vol. 7, no. 8, pp. 466–475.
- [5] V. L. Peddie *et al.* ( 2012) “Factors affecting decision making about fertility preservation after cancer diagnosis : a qualitative study,” pp. 1049–1057.
- [6] C. Benedict *et al.*( 2017) “HHS Public Access,” vol. 10, no. 1, pp. 87–94.
- [7] M. J. Loscalzo and K. L. Clark. (2007) “The Psychosocial Context of Cancer-Related Infertility,” pp. 180–190.
- [8] A. W. Loren *et al.* (2013) “Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 19, pp. 2500–2510.
- [9] L. E. Bath, W. H. B. Wallace, M. P. Shaw, C. Fitzpatrick, and R. A. Anderson. (2003) “Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: Detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound,” *Hum. Reprod.*, vol. 18, no. 11, pp. 2368–2374.
- [10] A. Teresa, A. Santos, and G. Sousa. (2015) “Recomendações Clínicas para a Preservação da Fertilidade no Doente Oncológico, *Revista portuguesa de oncologia*, vol.1.”
- [11] M. De Vos, J. Smitz, and T. K. Woodruff. (2014) “Fertility preservation in women with cancer.,” *Lancet (London, England)*, vol. 384, no. 9950, pp. 1302–10.
- [12] P. Amato *et al.* (2013) “Fertility preservation and reproduction in patients facing gonadotoxic therapies: A committee opinion,” *Fertil. Steril.*, vol. 100, no. 5, pp. 1224–1231.
- [13] T. J. Matthews and B. E. Hamilton. (2009) “Delayed childbearing: more women are having their first child later in life.,” *NCHS Data Brief*, no. 21, pp. 1–8.
- [14] W. Dondorp *et al.* (2012) “Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss,” *Hum. Reprod.*, vol. 27, no. 5, pp. 1231–1237.
- [15] C. Álvares *et al.* (2015) “Between the social and the biological : rethinking maternity in light of new techniques of assisted reproduction,” vol. 3, pp. 111–122.
- [16] Z. J.J. and C. S. (2015) “Autologous oocyte cryopreservation in women aged 40 and older using minimal stimulation IVF,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 13, no. 1..
- [17] M. Javed and E. Michael. (2015) “Fertility Preservation Options for Cancer Patients,” no. November, pp. 67–74.

- [18] G. Mintziori *et al.* (2014) “Maturitas EMAS position statement: Fertility preservation,” *Maturitas*, vol. 77, no. 1, pp. 85–89.
- [19] Chang, C.C., Elliott, T.A., Wright, G., Shapiro, D.B., Toledo, A.A., Nagy, Z.P. (2013) Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril* 99:1891-1897.
- [20] A. Teresa *et al.* (2016) “Recomendações para a preservação do potencial reprodutivo no doente oncológico,” *Revista portuguesa de oncologia*, vol. 2.
- [21] C. Freitas, K. Brazão, Â. Farinha, J. Vieira, and M. Ferreira. (2011) “Preservação Da Fertilidade Na Mulher Com Doença Oncológica,” pp. 881–888.
- [22] Z. Zhang, Y. Liu, Q. Xing, P. Zhou, and Y. Cao, “Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by in vitro maturation: vitrification is superior to the slow freezing method,” *Reprod Biol Endocrinol*, vol. 9, no. 1, p. 156, 2011.
- [23] K. A. Rodriguez-wallberg and K. Oktay. (2017) “Fertility Preservation and Pregnancy in Women With and Without BRCA Mutation – Positive Breast Cancer,” vol. 17, no. 11, pp. 1409–1417.
- [24] G. D. Smith *et al.*(2010) “Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification,” *Fertil. Steril.*, vol. 94, no. 6, pp. 2088–2095.
- [25] N. A. Clark and J. E. Swain. (2013) “Oocyte cryopreservation: Searching for novel improvement strategies,” *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 30, no. 7, pp. 865–875.
- [26] K. Oktay, A. P. Cil, and H. Bang. (2006) “Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis,” *Fertil. Steril.*, vol. 86, no. 1, pp. 70–80.
- [27] J. Konc, K. Kanyó, R. Kriston, B. Somoski, and S. Cseh. (2014) “Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014.
- [28] S. Dias, R. Antunes, H. Miyahira, and V. De Freitas. (2009) “Criopreservação de oócitos : pode ser considerada uma rotina na prática clínica ? Uma revisão sistemática” *Feminina*, vol 37, no 12
- [29] J. M. Shaw, A. Oranratnachai, and A. Trounson. (2000) “Cryopreservation of Oocytes and Embryos 125,” *Handb. Vit. Fertil.*, vol. second\_ , no. 16, pp. 373–412.
- [30] T. Tao, W. Zhang, and A. Del Valle. (2009) “Human oocyte cryopreservation,” *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, vol. 21, no. 3, pp. 247–252.
- [31] A. P. Cil and E. Seli. ( 2013) “Current trends and progress in clinical applications of oocyte cryopreservation,” vol. 25, no. 3, pp. 1–9.
- [32] Pfeifer S at all. (2012) “Mature oocyte cryopreservation: a guideline,” *Fertil. Steril.*, vol. 99, no. 1, pp. 1–7..
- [33] J. A. Lee, J. Barritt, R. M. Moschini, R. E. Slifkin, and A. B. Copperman. (2013) “Optimizing human oocyte cryopreservation for fertility preservation patients: Should we mature then freeze or freeze then mature?,” *Fertil. Steril.*, vol. 99, no. 5, pp. 1356–1362.

- [34] V. Bianchi *et al.* (2014) "Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis.," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 12, p. 110.
- [35] R. C. Chian, Y. Wang, and Y. R. Li. (2014) "Oocyte vitrification: Advances, progress and future goals," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 31, no. 4, pp. 411–420.
- [36] E. Maman, D. Meirou, M. Brengauz, H. Raanani, J. Dor, and A. Hourvitz. (2011) "Luteal phase oocyte retrieval and in vitro maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation," *Fertil. Steril.*, vol. 95, no. 1, pp. 64–67.
- [37] B. Ramalho, D. Carvalho, J. Kliemchen, C. Japur, and D. S. Rosa. (2015) "Visão geral sobre preservação da fertilidade feminina depois do câncer," *Reprodução Clim.*, vol. 29, no. 3, pp. 123–129.
- [38] S. Paynter. (2005) "A rational approach to oocyte cryopreservation," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 10, no. 5, pp. 578–586.
- [39] F. Brambillasca, M. C. Guglielmo, G. Coticchio, M. Mignini Renzini, M. Dal Canto, and R. Fadini (2013) "The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 30, no. 12, pp. 1531–1539.
- [40] T. Lei, N. Guo, J. Q. Liu, M. H. Tan, and Y. F. Li. (2014) "Vitrification of in vitro matured oocytes: Effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 3, pp. 1159–1165.
- [41] Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E. Rienzi, L., Romano, S., Albricci, L., Maggiulli, R., Capalbo, A., Baroni, E., Colamaria, S., Sapienza, F., Ubaldi, F. (2010) Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* **25**:66–73.
- [42] A. Linkeviciute, F. A. Peccatori, V. Sanchini, and G. Boniolo. (2015) "Oocyte cryopreservation beyond cancer: tools for ethical reflection," *J. Assist. Reprod. Genet.*, vol. 32, no. 8, pp. 1211–1220.