



UNIVERSIDADE  
**LUSÓFONA**

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA  
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA  
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

## **Vitrificação de Embriões: Sistema Fechado vs Sistema Aberto**

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Embriologia e Reprodução Humana orientada por Prof. Dra. Patrícia Rodrigues





UNIVERSIDADE  
**LUSÓFONA**

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA  
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA  
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

## **Vitrificação de Embriões: Sistema fechado vs Sistema aberto**

**VERSÃO FINAL**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 25/10/ 2024, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 946/2024, de 11 de Setembro, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Bruno Daniel da Costa Gomes

Arguente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Leal Rato

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Patrícia Carla Coelho Rodrigues





# Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Patrícia Rodrigues, pela iniciativa e empenho por todos os dias “lutar” para que se abra oportunidades nesta área. Quero também agradecer pelo tempo disponibilizado no acompanhamento da dissertação e no esclarecimento de dúvidas. Obrigada pelos conselhos e lições que me deu quando mais precisei, irei levá-los comigo tanto na minha vida profissional como na minha vida pessoal. Não a considero apenas uma professora pois com o tempo tornou-se como uma mentora para mim.

Seguidamente quero agradecer aos meus colegas de mestrado que me acompanharam neste percurso, pelo mútuo apoio e por termos partilhado entre nós o carinho que temos por esta área.

De seguida quero agradecer aos meus amigos Beatriz Alves, Luiz Santos, aos gémeos Francisco e António por me terem apoiado neste meu sonho e por estarem ao meu lado nos momentos de stress, frustração, choro e alegria.

Quero agradecer com muito amor e carinho ao meu namorado Pedro Estevão por acreditar em mim e nas minhas capacidades, sempre todos os dias a torcer por mim.

Com todo o meu coração quero agradecer ao meu cão Billy que infelizmente já não está entre nós, mas que sempre esteve em todas as etapas da minha vida e que me deixou pronta para este momento. Mesmo não estando presente para presenciar este feito, esta também é uma vitória dele.

Por último quero agradecer à minha família por toda ajuda e apoio no meu percurso académico.

A todos, o meu mais sincero obrigada!

## Resumo

A criopreservação de embriões é fundamental na área de procriação medicamente assistida e recentemente destaca-se um aumento do número de ciclos *freeze-all*. O método de vitrificação não só tornou mais eficiente a criopreservação, como também o descongelamento de embriões e de oócitos com a diminuição dos danos provocados pela formação de cristais de gelo.

Inicialmente na vitrificação foi desenvolvido o método do sistema fechado no qual os embriões não entram em contato direto com o azoto líquido, pois as palhetas são seladas hermeticamente antes de entrarem em contato com o azoto e depois armazenadas em crio contentores. Posteriormente surgiu o método do sistema aberto, no qual os embriões são expostos diretamente ao azoto líquido. Ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, mas a vitrificação pelo sistema aberto é mais utilizada nos laboratórios de fertilização *in vitro*.

Esta dissertação teve como objetivo analisar a eficácia da vitrificação de embriões pelos sistemas fechado e aberto através da comparação de taxas de nascimentos provenientes de transferências embrionárias após a descongelação da clínica CEMEARE - Centro Médico de Assistência à Reprodução. Quanto aos resultados obtidos verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre ambos os sistemas, o que sugere que ambos são eficazes na vitrificação dos embriões.

**Palavras-chave:** embriões, vitrificação, congelação lenta, sistema aberto, sistema fechado

# Abstract

Embryo cryopreservation is fundamental in the field of medically assisted procreation. Recently there has been an increase in the number of freeze-all cycles. The vitrification method has not only made cryopreservation feasible, but also the warming of embryos and oocytes, with reduce of damage from the formation of ice crystals.

Initially, in vitrification, the closed system method was developed, where the embryos do not come into direct contact with the liquid nitrogen, as the straws are sealed hermetically before rapid submission into nitrogen and then stored in cryo-containers. Later, the open system method emerged, in which the embryos are exposed directly to the liquid nitrogen. Both methods have advantages and disadvantages, but vitrification using the open system is more commonly used in *in vitro* fertilization laboratories.

The aim of this dissertation was to analyze the effectiveness of closed and open systems for embryo vitrification by comparing birth rates from embryo transfers after warming at the CEMEARE clinic. The results showed that there were no statistically significant differences between the two systems, which suggests that both are effective in vitrifying embryos.

**Keywords:** embryos, vitrification, slow cooling, open system, closed system

## Lista de Siglas

<b>CEMEARE</b>	Centro Médico de Assistência à Reprodução
<b>CPAs</b>	<i>Cryoprotective Agents</i>
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl Sulfoxido</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>DS</b>	<i>Dilution Solution</i>
<b>EG</b>	<i>Ethylene Glycol</i>
<b>ES</b>	<i>Equilibration Solution</i>
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>GI</b>	<i>Glycerol</i>
<b>H0</b>	Hipótese nula
<b>HOS</b>	<i>Hiperstimulation Ovarian Syndrome</i>
<b>HSV</b>	<i>High-Security Vitrification Straw</i>
<b>PMA</b>	Procriação Medicamente Assistida
<b>PGT-A</b>	<i>Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies</i>
<b>PROH</b>	<i>Propanediol</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>TECS</b>	Transferência de Embriões Congelados
<b>TS</b>	<i>Thawing Solution</i>
<b>UV</b>	<i>Ultraviolet</i>
<b>VS</b>	Vitrification Solution
<b>WS</b>	<i>Washing Solution</i>

## Lista de Símbolos

$f$  - Número de frequências observadas

$\hat{f}$  - Número de frequências teóricas

$\chi^2$  - Distribuição do qui-quadrado

$P$  - Probabilidade

$\nu$  - Graus de liberdade

# Índice

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract	3
Lista de Siglas	4
Lista de Símbolos	5
Índice	6
Índice de Tabelas	7
Índice de Figuras	8
<b>Capítulo I. Introdução</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Fundamentos da Criopreservação</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Técnicas de Criopreservação</b>	<b>14</b>
1.2.1. Congelação lenta	14
1.2.2. Vitrificação	16
1.2.3. Diferenças entre Congelação Lenta e Vitrificação	18
<b>1.3. Vitrificação de Embriões</b>	<b>20</b>
1.3.1. Em que estadio criopreservamos embriões	20
1.3.2. Vitrificação pelo Sistema Aberto	21
1.3.3. Vitrificação pelo Sistema Fechado	23
<b>1.4. Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>Capítulo II. Metodologia e Análise Estatística</b>	<b>25</b>
2.1. Materiais	26
2.2. Métodos	26
2.3. Análise estatística	28
<b>Capítulo III. Análise de Resultados</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo IV. Discussão</b>	<b>32</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>35</b>

# Índice de Tabelas

**Tabela 1.** Diferenças e similaridades entre os métodos de congelação lenta e vitrificação.....19

**Tabela 2.** Tabela de contingência onde está representado as frequências observadas ( $f$ ) para cada variável e as respectivas frequências teóricas ( $\hat{f}$ ).....31

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Efeitos da criopreservação em embriões e nos gâmetas.....	13
<b>Figura 2.</b> Diagrama representativo do processo da congelação lenta.....	15
<b>Figura 3.</b> Criopreservação de duas soluções após contato com azoto líquido a -196°C .....	16
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático da técnica de vitrificação .....	17
<b>Figura 5.</b> Ilustração dos estádios de um embrião.....	20
<b>Figura 6.</b> Ilustração do método de vitrificação pelo sistema aberto .....	22
<b>Figura 7.</b> Ilustração do método de vitrificação pelo sistema fechado .....	24
<b>Figura 8.</b> Ilustração esquemática do protocolo de vitrificação Vit Kit-freeze para o sistema fechado e aberto.....	27
<b>Figura 9.</b> Ilustração esquemática do protocolo de <i>warming</i> Vit KIT-Warm para o sistema fechado e aberto.....	28

# Capítulo I

## Introdução

## 1.1. Fundamentos da Criopreservação

A criopreservação é um procedimento que permite preservar células, tecidos celulares e outros materiais biológicos através do arrefecimento das amostras a baixas temperaturas (Jang et al., 2017).

Esta é uma técnica bem conhecida, utilizada em reprodução assistida para preservar material genético durante vários anos. É empregue em pacientes que realizam tratamentos de quimioterapia ou radioterapia ou que possuem doenças autoimunes. Também é aplicada a pacientes com oligozoospermia severa, em casos de distúrbios ejaculatórios e em situações de doação de gâmetas (Ozimic et al., 2023). No caso de homens que queiram proceder a um tratamento de mudança de género é aconselhável que se preserve o seu material genético e por consequente a sua fertilidade antes de começar a sua terapia hormonal (Estudillo et al., 2021).

Por outro lado, no caso dos gâmetas femininos, a criopreservação de oócitos veio resolver as eventuais dificuldades reprodutivas das mulheres que pretendem adiar o seu desejo de serem mães. A criopreservação de oócitos para conservação da fertilidade pode ser designada por criopreservação por motivos sociais, precisamente para distinguir a criopreservação devido a outras razões médicas como no caso de pacientes oncológicos que irão ser submetidos a tratamentos de radioterapia e/ou quimioterapia (Raposo, 2020).

A doação de gâmetas ou embriões aumenta a probabilidade de ter uma criança quando um ou ambos os parceiros se encontram impossibilitados de utilizar os seus gâmetas, e/ou criar os seus próprios embriões. Os casais escolhem gâmetas e/ou embriões doados devido a problemas médicos como por exemplo ausência de gâmetas, má qualidade oocitária ou espermática. Em algumas situações para não correr o risco de transmitirem doenças genéticas, os casais optam pela doação. Podem recorrer à doação também por motivos sociais como mulheres solteiras ou por casais de mulheres (American Society for Reproductive Medicine, 2014).

A criopreservação de embriões tem vindo a ser uma estratégia terapêutica bem-sucedida em procriação medicamente assistida (PMA) porque permite preservar embriões supra-numerários e alcançar várias gravidezes a partir de um único ciclo de estimulação ovárica. Também permite a transferência de um só embrião, minimizando o risco de gravidez múltipla (Cobo et al., 2012).

Nos últimos anos, foi adotada uma estratégia de *freeze-all* como alternativa a transferências a fresco de embriões durante os ciclos de fertilização *in vitro* (FIV). Nesta estratégia todos os embriões criados num ciclo são criopreservados, dependendo da sua qualidade observada e posteriormente o embrião com melhor qualidade é transferido num ciclo futuro (Roque et al., 2017).

Para o desenvolvimento e maturação dos folículos e consequentemente dos oócitos, é necessária uma estimulação ovárica, contudo existem algumas preocupações sobre os efeitos adversos desta estimulação. A principal complicação que se observa durante a estimulação ovárica é o risco de Síndrome de Hiperestimulação Ovárica (SHO). (Roque et al., 2017). Devido aos avanços na área a SHO é uma complicação cada vez mais atípica, mas ainda abrange cerca de 2,5% a 2,9% das mulheres sujeitas a técnicas de reprodução (Melo, 2022, p. 7).

De modo a diminuir o desenvolvimento de SHO, evita-se a transferência de embriões a fresco e promove-se a opção de *freeze-all* de embriões após o tratamento de fertilização *in vitro* e posteriormente a sua transferência apenas num ciclo seguinte (Zaat et al., 2021).

A tecnologia atual não permite testes genéticos em oócitos, no entanto, existe a possibilidade de testar geneticamente os embriões, como por exemplo, para aneuploidias através de um processo designado *Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies* (PGT-A), que consegue especificar se um determinado embrião tem o número apropriado de cromossomas. Este teste vem facilitar a escolha do embrião a transferir no sentido de originar uma gravidez com sucesso (Casciani et al., 2023).

A criopreservação torna-se fundamental no decorrer deste teste genético, uma vez que os resultados demoram a serem obtidos. Desta forma é essencial criopreservar o embrião, dando tempo para sua identificação para que este seja considerado apto ou não para a transferência (Bosch et al., 2020).

Embora a criopreservação de gâmetas e embriões traga várias vantagens para a reprodução assistida, esta compreende múltiplos efeitos fisiológicos que devemos ter em conta quando submetemos as células a temperaturas abaixo de 0°C.

Expor as células a temperaturas negativas sem o uso de agentes crioprotetores (ACPs) não é viável, tornando-se letal. Os crioprotetores são compostos moleculares utilizados para minimizar o stress produzido pelo congelamento/descongelamento, nomeadamente o stress induzido pela formação de gelo (Ozmic et al., 2023). De uma perspetiva molecular, os crioprotetores atuam ao quebrar as ligações de hidrogénio das moléculas da água (Gosden, 2011).

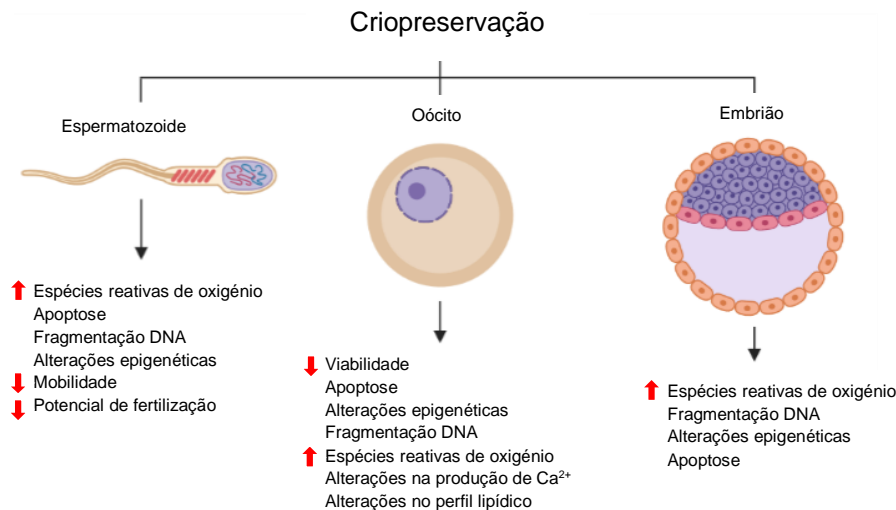
Com a formação de gelo, a água do meio extracelular diminui aumentando a concentração de solutos. Por osmose, a água presente a nível intracelular atravessa a membrana celular provocando a desidratação da célula e conseqüentemente a concentração de solutos aumenta no interior da mesma. Este processo pode provocar danos pois o aumento de solutos intracelular leva ao stress osmótico e o gelo formado no meio extracelular pode provocar danos no tecido membranar. Se o processo de arrefecimento ocorrer de forma muito rápido e a saída de água for brusca, também pode ocorrer a formação de gelo no interior das células provocando maiores danos do que a formação de cristais de gelo extracelular porque existe uma maior capacidade de danificar estruturas celulares internas fundamentais para a sobrevivência celular como por exemplo os lisossomas (Bojic et al., 2021).

Como a água constitui cerca de 80% do volume celular, intra e extracelular, o congelamento da mesma influencia alterações estruturais e bioquímicas podendo resultar em danos celulares como demonstrado na (Figura 1) (Whaley et al., 2021).

Ao nível bioquímico, a utilização de ACPs na criopreservação de oócitos, induz alterações na síntese de proteínas, aumenta a concentração de cálcio intracelular, provoca o endurecimento da zona pelúcida e o aumento de espécies reativas de oxigénio (EROs) (Moussa et al., 2014). Ambos os métodos de criopreservação, congelação lenta e vitrificação, causam uma diminuição dos grânulos corticais, estes provenientes do complexo de Golgi e que segregam várias enzimas importantes para o bloqueio à polispermia, induzem também alterações na morfologia das mitocôndrias. Uma vez que o material genético é sensível a procedimentos de criopreservação, há o risco de ocorrerem danos dos cromossomas e no fuso mitótico ou meiótico. (Estudillo et al., 2021).

Quanto à criopreservação de espermatozoides, o stress oxidativo afeta a composição de lípidos, a síntese de proteínas e o DNA o que conduz a uma redução da viabilidade, mobilidade e do potencial de fertilização devido a danos no citoesqueleto e na membrana celular. Por fim, quanto aos efeitos moleculares nos embriões, existe uma

maior concentração de EROs no estadio de mórula. (Estudillo et al., 2021). Relativamente à integridade do DNA, ambos os métodos de criopreservação geram alterações no mesmo, contudo a vitrificação resulta numa menor quantidade de células sinalizadas para a via apoptótica como consequência dos danos inflingidos no DNA do que a congelação lenta, o que sugere que a integridade do DNA é vulnerável aos diferentes métodos de criopreservação (Estudillo et al., 2021).



**Figura 1-** Efeitos da criopreservação em embriões e nos gametas. (Adaptado de Estudillo et al., 2021).

Para uma criopreservação com sucesso, é preciso equilibrar três componentes: concentração dos agentes crioprotetores (viscosidade), temperaturas de arrefecimento/descongelamento e o volume do meio, em que as células estão suspensas durante a vitrificação para prevenir a cristalização da água no interior da célula. A criopreservação não só depende do equilíbrio dos três componentes descritos, mas também depende da qualidade dos gametas e dos embriões que são preservados (Antonouli et al., 2023).

Evidentemente, o uso de crioprotetores é essencial em todos os protocolos de criopreservação. No entanto, há que ter em conta que em elevadas concentrações, os ACPs podem ser tóxicos para as células (Estudillo et al., 2021).

Dependendo da sua capacidade de penetrar a membrana celular, existem dois tipos de agentes crioprotetores: permeáveis e não permeáveis. Relativamente aos crioprotetores permeáveis, pode-se ter como exemplo Dimethylsulfoxido (DMSO), Glycerol (GI), Ethylene Glycol (EG), Propanediol (PROH). Comparativamente, em

relação aos crioprotetores não permeáveis existe a Sacarose e a Trealose, entre outros (Robles et al., 2019).

Os crioprotetores permeáveis são moléculas de baixa densidade e ao atravessarem a membrana celular para o seu interior, provocam o deslocamento da água para o exterior da mesma através de um gradiente osmótico ocupando o lugar da água. Por aumentarem a osmolaridade extracelular geram um gradiente osmótico que contribui para o contínuo da desidratação celular (Jeseta et al., 2016, p. 5).

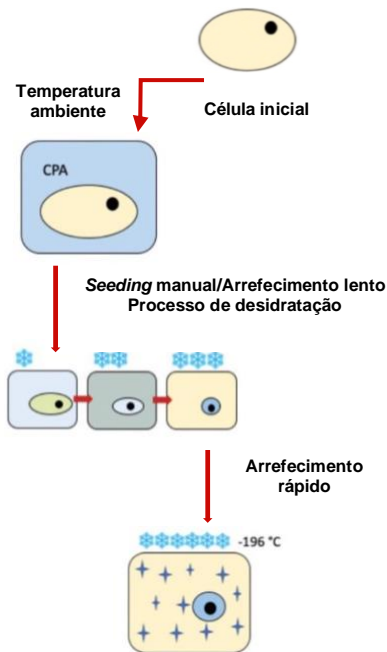
Enquanto os crioprotetores não permeáveis, ao permanecerem no meio extracelular, aumentam a osmolaridade extracelular gerando um gradiente osmótico pela membrana, contribuindo assim, para a desidratação da célula. Ao mesmo tempo previnem a entrada rápida de água para a célula durante o processo de descongelamento/rehidratação (Konc et al., 2014).

Nos últimos trinta anos, as técnicas de criopreservação em reprodução assistida têm vindo a ser desenvolvidas a partir de dois mecanismos: a congelação lenta e a vitrificação, sendo que esta última combina um tempo de arrefecimento ultrarrápido com a utilização de uma alta concentração de ACPs (Zhang et al., 2015).

## 1.2. Técnicas de Criopreservação

### 1.2.1. Congelação Lenta

A congelação lenta envolve o equilíbrio dos embriões/oócitos em baixas concentrações de um ou mais crioprotetores durante alguns minutos para que o processo de desidratação ocorra antes de serem introduzidos em palhetas hermeticamente seladas. Em seguida, as palhetas são colocadas num equipamento programável que permite executar gradualmente este arrefecimento ( $\sim 0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) até aproximadamente  $-30^{\circ}\text{C}$ . Durante o processo de arrefecimento é induzida manualmente a formação extracelular de cristais de gelo (*seeding*) entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-8^{\circ}\text{C}$  em pontos mais distantes aos embriões/oócitos, impedindo uma congelação rápida de toda a água, dando tempo para que continue a desidratação enquanto a concentração extracelular de soluto aumenta. Posteriormente, quando as palhetas atingem os  $-30^{\circ}\text{C}$ , são submersas e agitadas vigorosamente em azoto líquido, no qual, a temperatura é rapidamente reduzida até aos  $-196^{\circ}\text{C}$  e armazenadas em azoto líquido (Figura 2) (Edgar & Gook, 2012).



**Figura 2-** Diagrama representativo do processo da congelação lenta. (Adaptado de Teng, 2020, p.11).

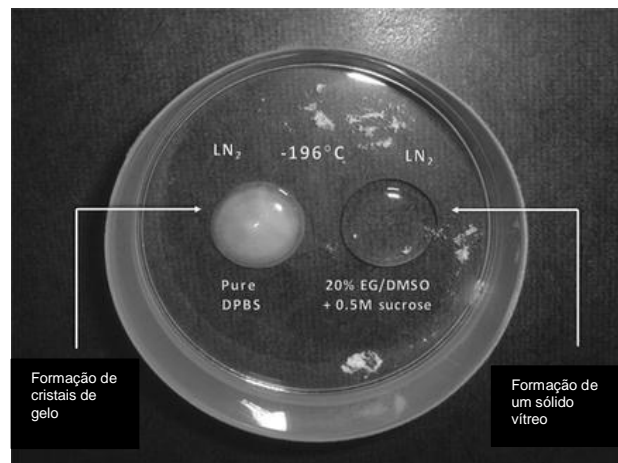
A principal vantagem da congelação lenta é o baixo risco de contaminação durante o procedimento sem ser preciso profissionais altamente qualificados. No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, tais como, o custo financeiro, processamento longo e necessidade de um equipamento específico (S. Aljaser, 2022, p. 4).

Um dos fatores que contribui para o reduzido sucesso desta técnica é a formação descontrolada de cristais de gelo, intra e extracelular, que deriva de uma desidratação inapropriada que, por sua vez aumenta o risco de danos celulares durante o processo de descongelamento (Vanderzwalmen et al., 2020).

Assim, apesar de ter sido utilizada por mais de trinta anos em laboratórios de PMA, as concentrações de crioprotetores utilizadas para evitar a formação de cristais de gelo foram consideradas baixas e por isso foi desenvolvida outra técnica de criopreservação, a vitrificação (Waterstone et al., 2018, p.13).

## 1.2.2. Vitrificação

A vitrificação é um método de congelação, mais recente, alternativo à congelação lenta para criopreservar embriões e oócitos e tem vindo a ser descrita como uma técnica revolucionária nos laboratórios de fertilização *in vitro* (Konc et al., 2014). O princípio da vitrificação é a solidificação de uma solução no estado líquido para um estado sólido amorfo (vítreo) sem organização cristalina após o contato com azoto líquido (Figura 3) (Wong et al., 2014).



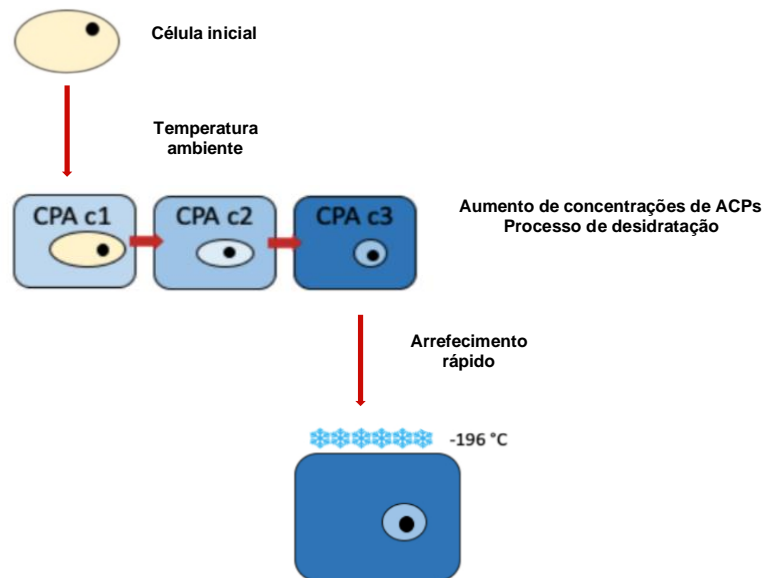
**Figura 3-** Criopreservação de duas soluções após contato com azoto líquido a -196°C. Solução cristalizada (à esquerda) sem a utilização de crioprotetores e solução vitrificada (à direita) com utilização de agentes crioprotetores permeáveis e não permeáveis. (Adaptado de Irvine Scientific, 2012).

Durante a vitrificação, os oócitos e embriões iniciam o processo de desidratação antes do arrefecimento ultrarrápido através da sua exposição a altas concentrações de crioprotetores, tornando a solução viscosa, no qual é necessário para a solidificação dos meios intra e extracelular num estado vítreo, que ocorre posteriormente através do aumento da velocidade da temperatura de congelação (Liebermann et al., 2002).

Um risco associado à vitrificação é a exposição dos oócitos e embriões a altas concentrações de crioprotetores que podem ser tóxicos, podendo provocar um choque osmótico afetando a viabilidade do embrião (Loutradi et al., 2008). Porém é possível limitar a toxicidade dos crioprotetores ao utilizar diferentes crioprotetores (permeáveis e

não permeáveis) diminuindo a concentração de cada um deles e reduzindo o tempo de exposição das células à solução de crioprotetores (Konc et al., 2014).

Durante o processo de vitrificação, a uma temperatura ambiente, os embriões são inicialmente expostos a concentrações elevadas de crioprotetores permeáveis (DMSO, EG ou PROH) e não permeáveis (Sacarose ou Trehalose) por um curto período, iniciando a substituição da água presente nos embriões pelos crioprotetores. Posteriormente, os embriões são retirados juntamente com parte da solução e colocados em palhetas de vitrificação em pequenos volumes (0.1 – 2  $\mu$ L) para facilitar o arrefecimento rápido. De seguida, a rápida redução da temperatura (aproximadamente superior a 10 000°C/min) é alcançada pela exposição imediata ao azoto líquido (Figura 4) (Edgar & Gook, 2012).



**Figura 4-** Diagrama esquemático da técnica de vitrificação. (Adaptado de Teng, 2020, p.11).

Durante o processo de *warming* (processo inverso à vitrificação), os embriões e os oócitos voltam ao estado que se encontravam inicialmente no qual, passam de -196°C para 37°C. Este processo tem de se realizar o mais rápido possível de modo a evitar a formação de cristais de gelo e consequentemente, ocorrer a danificação das células (Seki & Mazur, 2012). Seguidamente atravessam um período de reidratação gradual, onde ocorre a substituição dos crioprotetores permeáveis por água, levando assim a uma diminuição da concentração dos mesmos (Edgar & Gook, 2012).

O sólido amorfo resultante da vitrificação é extremamente frágil e pode ser convertido novamente para o estado líquido durante o processo de descongelamento, ao qual pode ocorrer a formação de gelo. Esta é devido ao descongelamento das moléculas de água que, por sua vez, podem reagrupar-se para formar cristais de gelo, podendo causar danos significativos nos organelos celulares (Sharma & Sharma, 2022). Os riscos de danos celulares durante o processo de *warming* são os mesmos associados à vitrificação (Bhattacharya et al., 2023).

Deste modo, muitos protocolos de *warming* utilizam altas taxas de descongelamento de maneira que não se verifique a formação de cristais de gelo durante a transição do estado sólido vítreo para líquido (Sharma & Sharma, 2022).

Os principais benefícios da criopreservação pela vitrificação é a não formação de cristais de gelo (intra e extracelular), conseguida pelo aumento rápido da temperatura resultando numa diminuição de danos. Sendo um processo de curta duração, o período em que os embriões permanecem fora da incubadora é reduzido e pode ser realizado a qualquer altura do dia consoante a necessidade. Contudo, como não é preciso um equipamento programável, uma potencial desvantagem da vitrificação é que na prática é mais desafiante e requer um embriologista mais experiente (Balaban et al., 2008).

### **1.2.3. Diferenças entre Congelação lenta e Vitrificação**

Comparando com o método de congelação lenta, a vitrificação não requer nenhum equipamento específico e é um processo de menor duração (Waterstone et al., 2018). Por outro lado, esta técnica necessita de uma alta concentração de crioprotetores, consequentemente aumentando o risco de toxicidade e danos osmóticos. Também precisa de ferramentas específicas que permitem uma alta taxa de arrefecimento, reduzindo o volume das soluções que contêm os embriões (Yousry et al., 2008).

Ambos os métodos de criopreservação utilizam ACPs semelhantes, mas diferenciam-se na concentração dos mesmos, assim como também nas taxas de arrefecimentos e de descongelamento. A congelação lenta como já mencionado, recorre a concentrações baixas de ACPs, baixas taxas de arrefecimentos e altas taxas de descongelamento. No entanto, o método de vitrificação utiliza altas concentrações de ACPs e altas taxas de arrefecimento e de descongelamento (Wong et al., 2014). Uma

outra diferença importante é que a vitrificação visa a evitar a formação de cristais de gelo nos meios intra e extracelular ao contrário da congelação lenta (Konc et al., 2014).

Algumas diferenças e semelhanças entre os métodos podem ser observados na Tabela 1.

Características	Congelação Lenta	Vitrificação
Concentração de CPs	Baixo	Alto
Risco de toxicidade dos CPs	Baixo	Alto
Sobrevivência celular	Baixo	Alto
Dano celular devido aos cristais de gelo	Sim	Não
Duração do procedimento	>3h	<10min
Rapidez do arrefecimento	~0.3°C/min	~23.000°C/min
Riscos principais	Cristais de gelo extracelular	Toxicidade
Habilidades operacionais necessárias	Baixo	Alto

**Tabela 1-** Diferenças e similaridades entre os métodos de congelação lenta e vitrificação. (Adaptado de Jaiswal & Vagga, 2022; Rodrigo, 2023; Bojic et al., 2021).

A congelação lenta, por utilizar baixas concentrações de ACPs, apresenta um baixo risco de toxicidade. Por outro lado, revela ter sérios riscos em relação aos danos associados com o congelamento devido à acumulação de gelo no exterior das células. Porém o método de vitrificação envolve a exposição da célula suspensa num meio aquoso ao azoto líquido, provocando a transição para a “fase de vidro” (Chen et al., 2022).

O principal benefício da vitrificação é reduzir substancialmente a probabilidade de ocorrer danos ao nível celular derivados da formação de gelo mantendo uma elevada taxa de sobrevivência celular (Jaiswal & Vagga, 2022).

Em comparação à congelação lenta, ao longo do processo de vitrificação, a solução total (a ser criopreservada) permanece inalterada e a água existente nas células não precipita, não havendo formação de cristais de gelo (Liebermann et al., 2002).

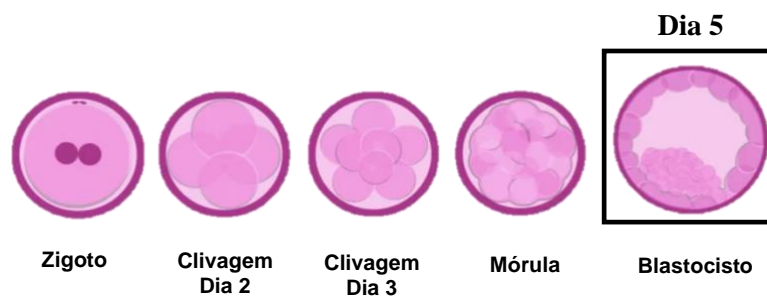
Vários estudos sugerem que a vitrificação resulta numa maior taxa de sobrevivência e taxa de desenvolvimento do que a congelação lenta e por isso a maioria das clínicas atualmente utilizam o método da vitrificação de forma a substituir o método da congelação lenta (Nel-Themaat et al., 2019).

## 1.3. Vitriificação de embriões

### 1.3.1. Em que estadio criopreservamos embriões?

Em relação aos gâmetas (oócitos e espermatozoides), os embriões são diplóides e apresentam uma maior resistência a fatores de stress. Porém, como apresentam células em constante divisão, o material genético encontra-se mais vulnerável a certos fatores promotores de stress em comparação aos cromossomas inativos e compactos do espermatozoide (Kopeika et al., 2015).

Os embriões podem ser criopreservados em diferentes fases do seu desenvolvimento, no estadio inicial de zigoto (dia 1), no estadio de clivagem (dia 2 - 3), no estadio de mórula (dia 4) e no estadio de blastocisto (dia 5 - 6) como ilustrado na (Figura 5).



**Figura 5-** Ilustração dos estádios de um embrião. (Adaptado de Santé, 2023)

A criopreservação de embriões no estadio de zigoto é realizada por motivos logísticos do laboratório e/ou por opção do paciente, como por exemplo, questões éticas. A criopreservação em estadio de clivagem é indicada quando há poucos oócitos fertilizados (entre um e quatro) ou quando se prevê um fraco desenvolvimento embrionário (tendo por base ciclos anteriores). Esta criopreservação dá oportunidade aos pacientes de terem embriões armazenados para futuras transferências embrionárias, mas como não usufrui de uma cultura prolongada, perde-se a vantagem de seleção, pois não se sabe qual embrião terá a capacidade de atingir o estadio de blastocisto (Nagy et al., 2020).

No entanto, foi demonstrado que embriões de dia 1 conseguem sobreviver ao processo de vitriificação e ao processo de *warming*, devido ao endurecimento da zona pelúcida após o processo de fertilização, conferindo à membrana plasmática mais

estabilidade e capacidade de suportar alterações osmóticas durante ambos os processos (Elnahas et al., 2010).

Relativamente ao estadio de clivagem, a criopreservação de embriões nesta fase beneficia da seleção que a cultura prolongada providencia, possibilitando uma melhor triagem de qual embrião aparenta ter melhor qualidade, porém antecipar o seu desenvolvimento continua a ser difícil. Deste modo, preservar embriões em estadios precoces sustenta a incerteza da viabilidade dos embriões (Tao et al., 2004).

Por outro lado, a criopreservação nos estadios de mórula e blastocistos (estadios embrionários mais avançados) possibilitam uma melhor seleção da qualidade embrionária o que aumenta a probabilidade de alcançar uma gravidez. Sendo o estadio de blastocisto o último antes da implantação uterina, este permite uma melhor seleção por apresentar a massa celular interna mais definida (Tao et al., 2004).

A vitrificação pode ser classificada em dois métodos: vitrificação pelo método fechado e vitrificação pelo método aberto (Vajta et al., 2015).

### 1.3.2. Vitrificação pelo Sistema Aberto

A vitrificação pelo sistema aberto utiliza palhetas que suportam pequenos volumes de solução a ser vitrificados, isto permite atingir taxas de arrefecimento mais elevadas (20.000-30.000°C/min) passando de uma solução aquosa para um sólido amorfo. Este sistema envolve o contato direto entre os embriões/oócitos e o azoto líquido (Criado Scholz, 2012; Carvalho et al., 2016). O sistema aberto possibilita também no processo de *warming* alcançar elevadas taxas de sobrevivência após descongelamento (Hajek et al., 2021).

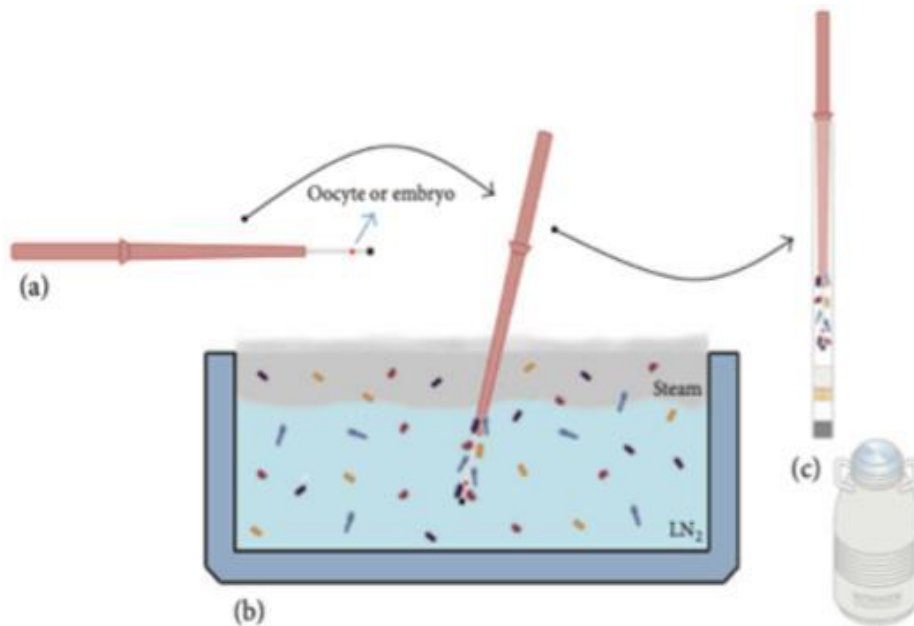
As palhetas utilizadas consistem num suporte físico, nos quais os embriões são colocados juntamente com a solução de vitrificação para serem criopreservados e armazenados em crio contentores, sendo apenas retirados dos mesmos no momento da sua utilização (M. G. Molina, 2018; Nagy et al., 2009).

Estas, não só permitem alcançar altas taxas de arrefecimento como também permitem a diminuição da citotoxicidade, pois o volume de solução a vitrificar juntamente com o embrião colocado nas palhetas é reduzido a um volume ~1 µL (Molina et al., 2016).

Este sistema opera com certas palhetas nomeadamente: as *Cryotop*, as *Cryolock*, as *Cryoloop*, entre outras (Kuwayama et al., 2005).

Sendo que o azoto permite a criopreservação a temperaturas ultrabaixas (-196°C), diversos microrganismos conseguem sobreviver a estas temperaturas conduzindo à sua contaminação e a uma possível contaminação cruzada (uma amostra criopreservada infeta outra amostra armazenada no mesmo crio contentor), esta promove o risco de os embriões/oócitos serem transportadores de doenças (Pomeroy et al., 2010; Cavalcante et al., 2020), visto que uma das preocupações em PMA é a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (Joaquim et al., 2017).

Uma desvantagem da vitrificação pelo sistema aberto pode ser o fato de no processo de vitrificação o contato direto entre o azoto líquido e a solução a vitrificar contendo os embriões, promove o risco de transmissão de agentes patogénicos e durante o armazenamento das amostras biológicas o risco de contaminação cruzada (Figura 6) (Hajek et al., 2021), se as amostras não estiverem devidamente seladas. Estando o azoto líquido contaminado, existe também o risco de contaminação das amostras criopreservadas. Assim o azoto líquido pode ser considerado uma potencial fonte de contaminação durante o processo de vitrificação e no armazenamento a longa duração (M. G. Molina, 2018).



**Figura 6-** Ilustração do método de vitrificação pelo sistema aberto. a) - Palheta de vitrificação com embrião/oócito b) - Submersão da palheta diretamente no azoto contaminado c) - Armazenamento da palheta já contaminada no crio contentor. (Adaptado de Joaquim et al., 2017).

Apesar de ainda não ter sido mencionado nenhuma contaminação cruzada durante o armazenamento de embriões/oócitos (Nagy et al., 2020), existe ainda a preocupação de manter o azoto líquido e os crio contentores esterilizados. O método

mais utilizado para prevenir a contaminação nos crio contentores é a esterilização por meio de luz ultravioleta (UV), que em volumes pequenos de azoto líquido apresenta ser eficaz contra bactérias, vírus e fungos rápido (Parmegiani et al., 2010). Existe também a opção de esterilização por meio de filtros (Joaquim et al., 2017).

Atualmente a vitrificação pelo método de sistema aberto é a prática mais utilizada globalmente nos laboratórios de procriação medicamente assistida. (Vajta et al., 2015).

### 1.3.3. Vitrificação pelo Sistema Fechado

Devido ao risco de contaminação pelo azoto do sistema aberto desenvolveu-se um mecanismo de vitrificação no qual os embriões/oócitos não entram em contato direto com o azoto. Esta metodologia designa-se sistema fechado (Paffoni et al., 2011; Criado Scholz, 2012).

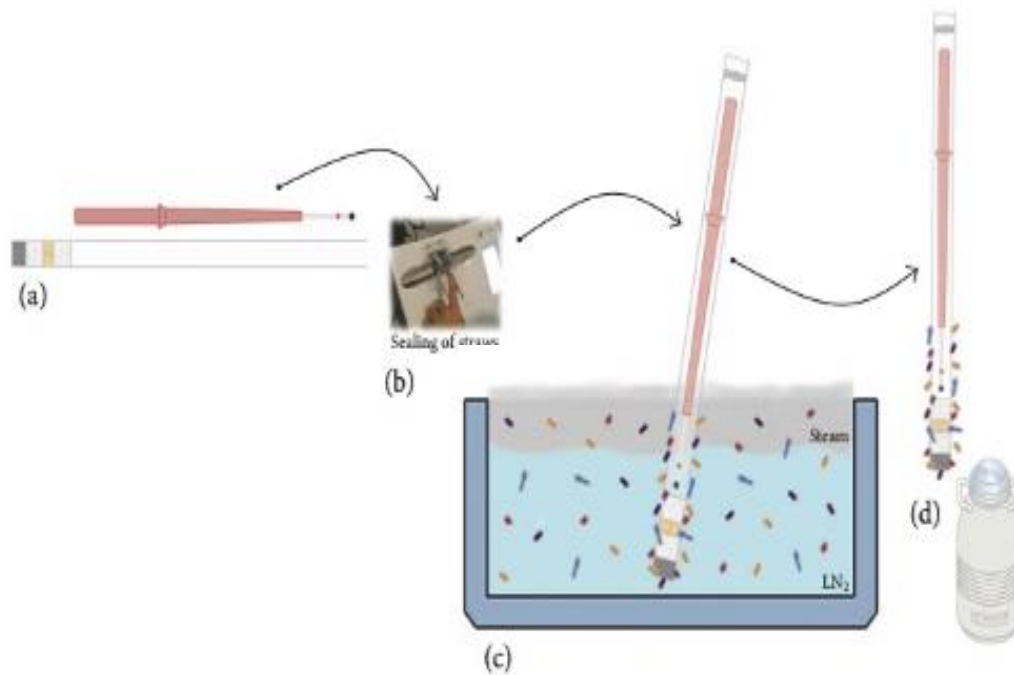
A prevenção da contaminação pelo contato direto ao azoto e a contaminação cruzada durante o compartilhamento nos crio contentores, o sistema fechado, uma vez que, trabalha com palhetas hermeticamente seladas (Cavalcante et al., 2020), permite aos embriões/oócitos juntamente com a solução a vitrificar não contactar diretamente com o azoto, o que provoca uma redução nas taxas de arrefecimento. Devido a esta redução, muitos protocolos de vitrificação por sistema utilizam altas concentrações de agentes crioprotetores de modo a evitar a formação de cristais de gelo, consequentemente, estes protocolos tornam-se mais “perigosos” /arriscados devido ao seu aumento de citotoxicidade por parte das concentrações dos crioprotetores (Panagiotidis et al., 2013).

Neste sistema são utilizadas palhetas como: as *CryoTip*, as *Cryopette*, as *Rapid-i*, as *High-Security Vitrification Straw* (HSV), entre outras (Panagiotidis et al., 2013).

Apesar de este método reduzir o risco de contaminação durante a vitrificação e o armazenamento (Figura 7), existe uma preocupação em vitrificar pelo sistema fechado devido à possibilidade da redução das taxas de arrefecimento que pode ser causada pelo isolamento térmico e pelo aumento do risco da formação de cristais de gelo.

De modo a ultrapassar esta preocupação, foi proposto o aumento de exposição aos crioprotetores para aumentar a sua concentração intracelular com o intuito de manter o estado vítreo da solução de vitrificação contendo os embriões/oócitos (A

review of best practices of rapid-cooling vitrification for oocytes and embryos: a committee opinion, 2021; Panagiotidis et al., 2013).



**Figura 7-** Ilustração do método de vitrificação pelo sistema fechado. a) – Palheta de vitrificação com embrião/oócito a vitrificar b) – Utilização de selador de palhetas c) – Palheta selada é submersa em azoto líquido contaminado d) – Armazenamento da palheta já contaminada no criocentor. (Adaptado de Joaquim et al., 2017).

## 1.4 Objetivos

A criopreservação embrionária tornou-se um processo fundamental em procriação medicamente assistida, e nos últimos anos tem havido um aumento crescente de ciclos *freeze-all*. O método de vitrificação tornou possível a criopreservação e o descongelamento de embriões e de oócitos diminuindo os danos provocados pela formação de cristais de gelo, no qual, estes são significativamente mais altos na congelação lenta, permitindo a realização de ciclos *freeze-all* não comprometendo a qualidade embrionária.

No entanto, existe alguma preocupação em relação à vitrificação pelo sistema aberto, em que o embrião entra em contato direto com o azoto líquido, o que gera alguma insegurança em relação à contaminação. Por outro lado, a vitrificação pelo

sistema fechado diminui o risco de contaminação, mas limita as taxas de arrefecimento e aquecimento.

A presente dissertação tem como objetivo analisar a eficácia da vitrificação de embriões pelos sistemas fechado e aberto através da comparação de nados-vivos provenientes de transferências embrionárias após a descongelação.



# **Capítulo II**

## **Metodologia e Análise Estatística**

## 2.1. Materiais

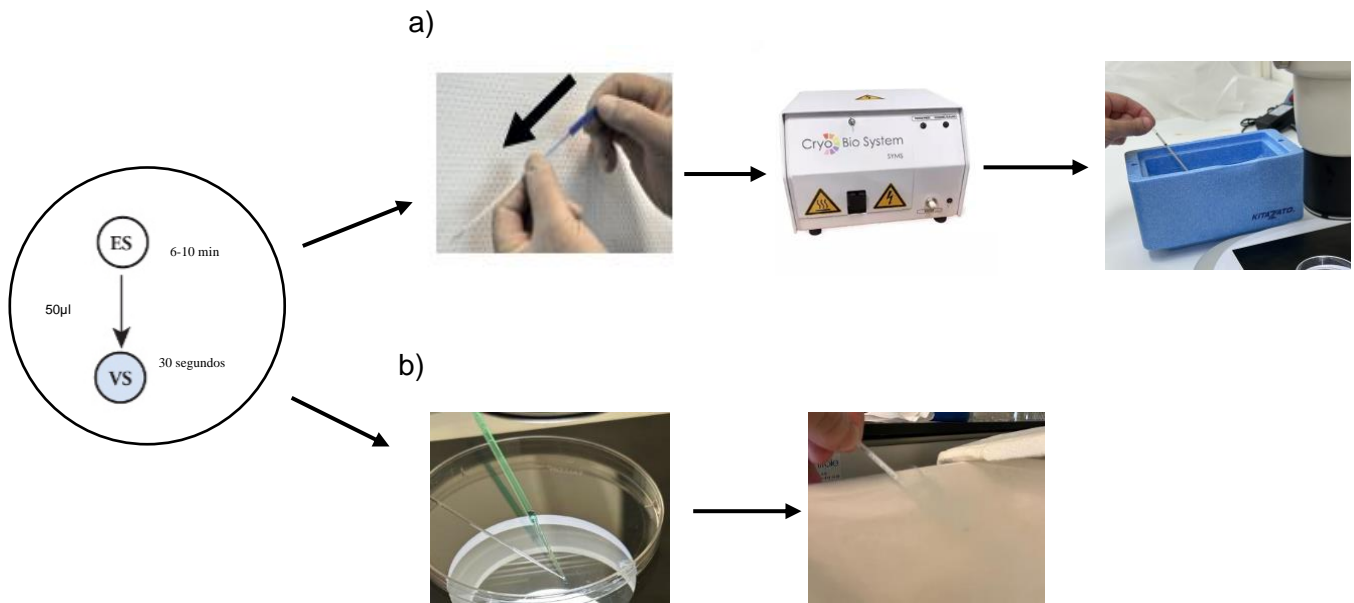
Para a realização prática deste estudo foram utilizados dados de transferências embrionárias de embriões congelados (TECs), da clínica CEMEARE - Centro Médico de Assistência à Reprodução, que por considerações éticas e de proteção de dados foram anonimizadas e apenas tive acesso aos números. Os dados utilizados foram referentes às TECs realizadas com o método de criopreservação pelo sistema fechado cujos dados estão compreendidos entre 01 de Janeiro de 2018 e 31 de Dezembro de 2019 e com utilização do método de criopreservação pelo sistema aberto entre 01 de Janeiro de 2021 e 31 de Dezembro de 2022.

Foram ainda excluídos destes períodos todas as TECs cujo método de criopreservação de embriões usado não fosse por vitrificação e/ou TECs de embriões doados.

## 2.2. Métodos

Os embriões criopreservados de ambos os sistemas (fechado e aberto) foram vitrificados e descongelados segundo os protocolos de vitrificação e descongelação utilizados na clínica CEMEARE.

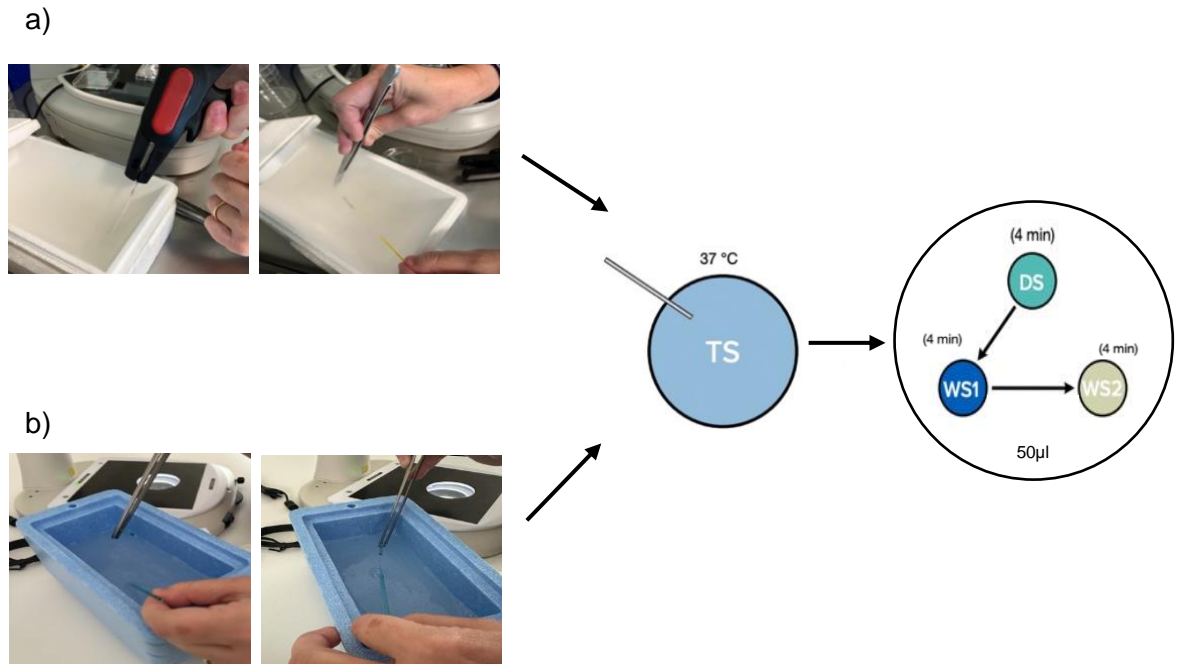
Para vitrificar os embriões recorreu-se ao *Vit kit-freeze* (Fujifilm Irvine Scientific), ilustrado na (Figura 8) o protocolo do mesmo. Inicialmente, à temperatura ambiente, foram colocados em gotas individuais de 50 µl de uma *Equilibration Solution* (ES), para se iniciar o processo de desidratação durante 6-10 minutos. Após a observação de uma redução de tamanho e de uma expansão gradual ao tamanho original (indício de que o processo de equilíbrio está completo) foram transferidos para gotas de 50µl de uma *Vitrification Solution* (VS) durante 30 segundos. Em seguida, os embriões referentes ao sistema fechado (2018-2019) foram transferidos com o mínimo de volume de solução de vitrificação para palhetas de HSV (Cryo Bio System CBS), que depois de carregadas foram seladas hermeticamente e submersas em azoto líquido. Os embriões relativos ao sistema aberto (2021-2022) foram transferidos para palhetas de sistema aberto. Na CEMEARE são utilizadas as *Cryolock* (Fujifilm Irvine Scientific), que após carregadas foram submersas em azoto líquido, e a seguir ao contato direto com o mesmo, foram fechadas com uma tampa protetora. No final do processo para ambos os sistemas de criopreservação os embriões foram armazenados em crio contentores a -196°C.



**Figura 8-** Ilustração esquemática do protocolo de vitrificação Vit Kit-freeze para o sistema fechado e aberto. a) – Vitrificação pelo sistema fechado: Colocação do tubo protetor na palheta, em seguida utilização do selador de palhetas para selar a mesma hermeticamente, seguido de uma agitação vigorosamente no azoto líquido b) – Vitrificação pelo sistema aberto: Carregamento da palheta com o embrião, seguido de uma agitação vigorosa no azoto líquido. (Adaptado de Crio Bio System e Fujifilm Irvine Scientific).

Para o processo de descongelamento dos embriões de os ambos sistemas foi utilizado o protocolo de *Vit Kit- Warm* (Fujifilm Irvine Scientific), como ilustrado na (Figura 9).

Quanto aos embriões referentes ao sistema fechado, primeiramente cortou-se o tubo protetor para remover a palheta do seu interior, sem que esta entrasse em contato com o azoto líquido. Por outro lado, em relação aos embriões vitrificados pelo sistema aberto foi-lhes retirada a tampa de proteção da palheta. De seguida, em ambos os sistemas, submergiu-se a palheta em 1ml de *Thawing Solution* (TS), esta previamente aquecida a 37°C e equilibrada a uma atmosfera de 6% de CO<sub>2</sub> na estufa, numa caixa de poço central durante 1 minuto. De seguida, os embriões foram transferidos para uma gota com 50µl de *Dilution Solution* (DS) durante 4 minutos para se dar o processo de rehidratação, onde os agentes crioprotetores são substituídos por água. Seguidamente foram pipetados para 2 gotas de 50µl de *Washing Solution* (WS), para remover a presença dos crioprotetores do meio durante 4 minutos cada uma. No final do processo de descongelamento os embriões foram transferidos para um meio de cultura próprio até ao momento da transferência.



**Figura 9-** Ilustração esquemática do protocolo de Vit KIT-Warm para o sistema fechado e aberto. a) – Descongelo da palheta por sistema fechado: corte do tubo protetor para se remover a palheta do seu interior b) – Descongelo da palheta por sistema aberto: remoção da tampa protetora expondo a palheta ao azoto líquido (Adaptado de Fujifilm Irvine Scientific).

## 2.3. Análise Estatística

Para analisar a eficácia da vitrificação de embriões pelo sistema aberto e sistema fechado fez-se uma análise estatística entre ambos os métodos de vitrificação e os desfechos da transferência, especificamente aborto, nado-vivo e não gravidez. Os dados recolhidos foram organizados numa tabela de contingência para permitir a análise de frequências e associações entre as mesmas. Para testar a hipótese nula ( $H_0$ ) de que não há associação entre o tipo de sistema de vitrificação e o desfecho da gravidez. Foi realizado o teste G, mais conhecido como *likelihood-ratio test* no qual este é utilizado para avaliar a concordância entre duas ou mais variáveis e pode ser calculado com a seguinte fórmula:  $G = 2 \sum f \ln \ln \left( \frac{f}{\hat{f}} \right)$ , onde ( $f$ ) é o número de frequências observadas e ( $\hat{f}$ ) é o número de frequências teóricas.

No entanto, não foi necessário a correção do valor de G porque esta é aplicada quando a amostra é pequena e as frequências esperadas forem inferiores a 5.

Para determinar a existência de uma associação significativa entre os dois sistemas, calculou-se os graus de liberdade ( $\nu$ ) através da fórmula  $\nu = (a - 1)(b - 1)$ , sendo ( $a$ ) o número de linhas e ( $b$ ) o número de colunas e para uma probabilidade de

significância  $P = 0.05$  (definida por convenção como limite razoável para rejeitar a  $H_0$ ), recorreu-se à tabela de distribuição do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) onde se retirou o valor crítico associado aos  $\nu$  e à probabilidade de significância referida. Seguidamente, realizou-se uma análise comparativa entre o valor  $G$  calculado e o valor de  $\chi^2$  obtido da tabela de distribuição para avaliar a associação entre as variáveis em questão.

# **Capítulo III**

## **Análise de Resultados**

Foram realizadas um total de 929 TECs, sendo que 334 foram relativas ao sistema fechado e 595 relativas ao sistema aberto. Entre as 334 TECs do sistema fechado compreendeu-se 28 casos de aborto, 67 casos de nado-vivo e 239 casos de não gravidez. Para as TECs do sistema aberto destaca-se 36 abortos, 130 nados-vivos e 429 não gravidezes entre o total de 595 TECs.

Estes dados foram organizados numa tabela de contingência (Tabela 2) onde para cada frequência observada calculou-se a respetiva frequência teórica  $\left(\frac{\text{total de } (f) \text{ por linha} \times \text{total de } (f) \text{ por coluna}}{\text{total de observações}}\right)$ .

Ao observar a tabela de contingência constatou-se que os valores calculados das frequências teóricas são aproximados às respetivas frequências observadas.

	Sistema fechado 2018/2019		Sistema aberto 2021/2022		
	Frequência Observada ( $f$ )	Frequência Teórica ( $\hat{f}$ )	Frequência Observada ( $f$ )	Frequência Teórica ( $\hat{f}$ )	
Aborto	28	23,00968784	36	40,99031216	64
Nado-vivo	67	70,82669537	130	126,1733046	197
Não gravidez	239	240,1636168	429	427,8363832	668
	334		595		N = 929

**Tabela 2** – Tabela de contingência onde está representado as frequências observadas ( $f$ ) para cada variável e as respetivas frequências teóricas ( $\hat{f}$ ). As somas das frequências observadas para cada linha (totais das linhas) e para cada coluna (totais das colunas) de ambos os sistemas também estão incluídos, permitindo uma visão geral da distribuição dos dados. Para o sistema fechado observa-se um total de ( $f = 334$ ) e para o sistema aberto um total de ( $f = 595$ ). Para cada variável, aborto, nado-vivo e não gravidez constata-se um total de 64, 197 e 668 respetivamente.

Através da aplicação da fórmula obteve-se um valor de G ( $G = 1,97$ ) do *likelihood-ratio test* para este estudo.

O valor de G calculado foi comparado com o valor crítico da distribuição qui-quadrado com 2 graus de liberdade, pois sendo uma tabela de contingência de 3 linhas por 2 colunas foi possível identificar os graus de liberdade da mesma.

O valor crítico de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para um nível de significância de 0,05 e para 2 graus de liberdade é de 5,99.

# **Capítulo IV**

## **Discussão**

O presente estudo foi concebido para comparar a eficácia de vitrificação de embriões pelo sistema aberto e sistema fechado, recorrendo à utilização dos protocolos de vitrificação pela empresa Fujifilm Irvine Scientific para ambos os sistemas. Num total de 929 transferências, sendo 334 provenientes de vitrificação pelo sistema fechado e 595 resultantes de vitrificação pelo sistema aberto, categorizou-se as transferências em três desfechos possíveis (aborto, nado-vivo e não gravidez).

Através da análise estatística verificou-se uma aproximação dos valores das frequências teóricas calculadas com os valores das frequências observadas nas três categorias o que podemos concluir que não existe uma associação entre a eficácia de vitrificação por sistema aberto e sistema fechado nos desfechos da transferência. Isto sugere que ambos os sistemas são igualmente eficazes e viáveis na criopreservação de embriões e podendo estar associado às modificações/melhorias associadas às palhetas anteriormente utilizadas. No entanto, segundo Vajta e sua equipa (2015) estas modificações nem sempre aumentam a sua eficácia e segurança.

Em estudos anteriores relativos à vitrificação de embriões verificou-se uma ausência de diferença significativa entre a vitrificação por sistema aberto e sistema fechado no que diz respeito às taxas de nascimentos vivos (Kuwayama et al., 2005., Cai et al., 2018). Contudo, em outro estudo, Youm e os seus colegas (2017) identificaram uma diminuição em relação às taxas de nascimentos vivos pelo sistema fechado, embora esta tenha sido considerada estatisticamente insignificante.

Vários fatores como as taxas de arrefecimento e de descongelamento, a concentração dos crioprotetores e o volume de solução a vitrificar deve-se ter em conta nos efeitos da criopreservação nos embriões (Cai et al., 2018).

Pelo fato de a criopreservação de embriões ser um procedimento rigoroso na maximização da eficácia de um ciclo de fertilização *in vitro* para os pacientes, o sucesso desta varia de laboratório para laboratório e pode depender de diversos fatores, como, a idade do paciente, a qualidade e o estadió em que os embriões são criopreservados (Kuwayama et al., 2005).

Além de que, o estabelecimento dos protocolos de vitrificação a utilizar por cada centro de reprodução medicamente assistida são estipulados consoante as rotinas de cada laboratório e os próprios profissionais podem influenciar os resultados, tornando difícil determinar qual protocolo mais benéfico que o outro (Sciorio et al., 2024).

A vitrificação pelo sistema aberto, apesar de estar sujeita a um maior risco de contaminação e por ser um método no qual os embriões entram em contato diretamente com o azoto líquido, parece ser o método mais adotado a nível mundial, pois este

apresenta diversos benefícios não só em termos logísticos, como também o seu protocolo ser simples e rápido de executar (Vajta & Kuwayama, 2006, Vajta et al., 2015). A vitrificação permite um aumento das taxas de arrefecimento e de aquecimento (Gonzalez-Plaza et al., 2022) e utiliza concentrações mais elevadas de crioprotetores, num período de tempo muito reduzido, quando comparados com a congelação lenta, o que diminui o risco de toxicidade para os embriões (Cai et al., 2018).

Estes resultados permitem à clínica CEMEARE continuar a utilizar o protocolo de vitrificação de embriões pelo sistema aberto da empresa Fujifilm Irvine Scientific com confiança tendo em conta a comprovada eficácia e segurança. Este método não só permite uma criopreservação excelente dos embriões, como também minimiza os danos causados pela vitrificação e pelo processo de descongelamento, o que resulta em taxas de sobrevivência superiores. A contínua utilização deste protocolo não só mantém a alta taxa de sucesso da clínica, mas também assegura a confiança e a satisfação dos pacientes que procuram ajuda nesta área.

No futuro seria interessante aplicar este mesmo estudo, mas em relação à vitrificação de oócitos de modo a perceber se existe diferença significativa na eficácia de vitrificação pelo sistema aberto e sistema fechado na clínica CEMEARE. Os oócitos por serem constituídos por uma única célula apresentam uma maior sensibilidade à criopreservação, o que pode influenciar substancialmente os resultados. Analisar a eficácia dos dois sistemas de vitrificação neste contexto pode proporcionar informações importantes para otimizar protocolos e melhorar as taxas de sobrevivência dos oócitos após o seu descongelamento, garantindo assim a segurança e eficácia dos procedimentos realizados na clínica CEMEARE.

## Referências Bibliográficas

Antonouli, S., Di Nisio, V., Messini, C., Daponte, A., Rajender, S., & Anifandis, G. (2023). A comprehensive review and update on human fertility cryopreservation methods and tools. *Frontiers in veterinary science*, *10*. Acedido em 23 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1151254>

Balaban, B., Urman, B., Ata, B., Isiklar, A., Larman, M. G., Hamilton, R., & Gardner, D. K. (2008). A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *23*(9), 1976–1982. Acedido em 11 de Março de 2024 em, <https://doi.org/10.1093/humrep/den222>

Bhattacharya, S., Seth, R., Das, D., & Parveen, S. (2023). A review article on cryopreservation of human embryo - methods, timing, and other considerations for optimizing embryo cryopreservation program. Em *Progress in Chemical and Biological Science* (pp. 140–153). Lincoln University College, Malaysia. Retirado: Março, 25, 2024 de <https://doi.org/10.31674/book.2023pcbs012>

Bojic, S., Murray, A., Bentley, B. L., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J. L., Bauer, R., & de Magalhães, J. P. (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>

Bosch, E., De Vos, M., & Humaidan, P. (2020). The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies. *Frontiers in endocrinology*, *11*. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00067>

Cai, H., Niringiyumukiza, J. D., Li, Y., Lai, Q., Jia, Y., Su, P., & Xiang, W. (2018). Open versus closed vitrification system of human oocytes and embryos: a systematic review and meta-analysis of embryologic and clinical outcomes. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0440-0>

Carvalho, A., Rocha Faustino, L., & Ricardo Figueiredo, J. (2016). *VITRIFICAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES E MATERIAL GENÉTICO*

DE FÊMEAS MAMÍFERAS EM CRIOBANCOS. Researchgate.net. Acedido em 08 de Abril de 2024 em, <https://www.researchgate.net/publication/277029520>

Casciani, V., Monseur, B., Cimadomo, D., Alvero, R., & Rienzi, L. (2023). Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges. *Fertility and Sterility*, 120(3), 506–520. Acedido em 22 de Março de 2024 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.06.005>

Cavalcante, M. M. M., Matias, M. C., Nascimento Junior, A. D. do, Lima, S. S. de B., Santos, S. F. dos, Oliveira, G. A. de, Cruz, R. K. S., Nascimento, Z. H. do, Vasconcelos, C. C. de, & Luz, V. B. (2020). PROCESSOS DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES: O QUE VOCÊ PRECISA SABER. Em *A Pesquisa nos Diferentes Campos da Medicina Veterinária 3* (pp. 60–69). Atena Editora. Retirado em Abril, 09, 2024 de [10.22533/at.ed.5462007128](https://doi.org/10.22533/at.ed.5462007128)

Chen, H., Zhang, L., Meng, L., Liang, L., & Zhang, C. (2022). Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clinical Epigenetics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01355-y>

Cobo, A., de los Santos, M. J., Castellò, D., Gámiz, P., Campos, P., & Remohí, J. (2012). Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1138-1146.e1. Acedido em 21 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1107>

Criado Scholz, E. (2012). *The Problem of Contamination: Open vs. Closed vs. Semi-Closed Vitrification Systems*, *Current Frontiers in Cryopreservation*. Intechopen.com. Acedido a 08 de Abril de 2024 em, <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryopreservation/the-problem-of->

Edgar, D. H., & Gook, D. A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 18(5), 536–554. Acedido em 23 de março de 2024 em <https://doi.org/10.1093/humupd/dms016>

Elnahas, A., Alcolak, E., Marar, E. A., Elnahas, T., Elnahas, K., Palapelas, V., Diedrich, K., & Al-Hasani, S. (2010). Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Society Journal*, 15(1), 2–9. Acedido em 15 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2010.03.013>

Estudillo, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & López-Ornelas, A. (2021). Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10864. Acedido em 19 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.3390/ijms221910864>

*Gamete (eggs and sperm) and embryo donation.* (2014). Reproductivefacts.org. Acedido em 19 de Fevereiro de 2024 em <https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/fact-sheets-and-infographics/gamete-eggs-and-sperm-and-embryo-donation/>

Gonzalez-Plaza, A., Cambra, J. M., Parrilla, I., Gil, M. A., Martinez, E. A., Martinez, C. A., & Cuello, C. (2022). The open cryotop system is effective for the simultaneous vitrification of a large number of porcine embryos at different developmental stages. *Frontiers in veterinary science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.936753>

Gosden, R. (2011). Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, 96(2), 264–268. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.029>

Hajek, J., Baron, R., Sandi-Monroy, N., Schansker, S., Schoepper, B., Depenbusch, M., Schultze-Mosgau, A., Neumann, K., Gagsteiger, F., von Otte, S., & Griesinger, G. (2021). A randomised, multi-center, open trial comparing a semi-automated closed vitrification system with a manual open system in women undergoing IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 36(8), 2101–2110. Acedido em 05 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1093/humrep/deab140>

Irvine, S. (2012). *Vitrification: Say goodbye to slow freezing.* Gonagen.com. Acedido em 27 de Março de 2014 em, <https://gonagen.com/documents/vitrification-brochure.pdf>

Jaiswal, A. N., & Vagga, A. (2022). Cryopreservation: A review article. *Cureus*. Acedido em 10 de Abril de 2024 <https://doi.org/10.7759/cureus.31564>

Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18. Acedido em 22 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.00>

Jeseta, M., Zakova, J., Ventruba, P., Kempisty, B., & Crha, I. (2016). Cryopreservation of human gametes and embryos: Current state and future perspectives. Em *Cryopreservation in Eukaryotes*. InTech. Retirado: Abril, 24, 2024 de 10.5772/64950

Joaquim, D. C., Borges, E. D., Viana, I. G. R., Navarro, P. A., & Vireque, A. A. (2017). Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *BioMed Research International*, 2017, 1–11. Acedido em 09 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1155/2017/1840417>

Konc, J., Kanyó, K., Kriston, R., Somoskői, B., & Cseh, S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International*, 2014, 1–9. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.1155/2014/307268>

Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, 21(2), 209–227. Acedido em 23 de Fevereiro de 2024 em, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., & Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(5), 608–614. Acedido em 09 de Abril de 2024 em, [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61169-8](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61169-8)

Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., & Tucker, M. J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1671–1680. Acedido em 23 de Março de 2024 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.006833>

Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Papanikolaou, E. G., Pados, G., Bontis, I., & Tarlatzis, B. C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90(1),

186–193. Acedido em 23 de Março de 2024  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.010>

Melo, A. R. S. (2022). Síndrome de hiperestimulação ovárica. Trabalho final do Mestrado Integrado em Medicina apresentado à faculdade de Medicina, orientada por Margarida Silvestre, Coimbra. Acedido a 12 de Fevereiro de 2024 em <https://hdl.handle.net/10316/102503>

Molina, I., Mari, M., Martínez, J. V., Novella-Maestre, E., Pellicer, N., & Pemán, J. (2016). Bacterial and fungal contamination risks in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertility and Sterility*, 106(1), 127–132. Acedido em 08 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.024>

Molina, M. G. (2018). *Vitrification of human oocytes employing a closed carrier with enhanced thermal efficiency and short times of exposure to synthetic cryoprotectant solutions*. Tese apresentada ao departamento de Engenharia química e ambiental da Universidade de Sevilha para obtenção do grau de doutor. Acedido em 09 de Abril de 2024 em <https://hdl.handle.net/11441/81631>

Moussa, M., Shu, J., Zhang, X., & Zeng, F. (2014). Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Science China. Life Sciences*, 57(9), 903–914.  
<https://doi.org/10.1007/s11427-014-4689-z>

Nagy, Z. P., Shapiro, D., & Chang, C.-C. (2020). Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertility and Sterility*, 113(2), 241–247. Acedido em 17 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.009>

Nel-Themaat, L., Chang, C.-C., Elliott, T., Bernal, D. P., Wright, G., & Nagy, Z. P. (2019). Slow freezing of embryos. Em *In Vitro Fertilization* (pp. 689–700). Springer International Publishing. Retirado em: Março, 11, 2024 de [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9\\_56](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9_56)

Ozcan, M. C. H., Snegovskikh, V., & Adamson, G. D. (2022). Oocyte and embryo cryopreservation before gonadotoxic treatments: Principles of safe ovarian stimulation,

a systematic review. *Women's Health (London, England)*, 18, 174550652210748. <https://doi.org/10.1177/17455065221074886>

Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734. Acedido em 16 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.3390/cimb45060300>

Paffoni, A., Guarneri, C., Ferrari, S., Restelli, L., Nicolosi, A. E., Scarduelli, C., & Ragni, G. (2011). Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reproductive Biomedicine Online*, 22(3), 292–298. Acedido em 10 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.11.004>

Panagiotidis, Y., Vanderzwalmen, P., Prapas, Y., Kasapi, E., Goudakou, M., Papatheodorou, A., Passadaki, T., Petousis, S., Nikolettos, N., Veletza, S., Prapas, N., & Maroulis, G. (2013). Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. *Reproductive Biomedicine Online*, 26(5), 470–476. Acedido em 14 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.01.016>

Parmegiani, L., Accorsi, A., Cognigni, G. E., Bernardi, S., Troilo, E., & Filicori, M. (2010). Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1525–1528. Acedido em 10 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.089>

Pomeroy, K. O., Harris, S., Conaghan, J., Papadakis, M., Centola, G., Basuray, R., & Battaglia, D. (2010). Storage of cryopreserved reproductive tissues: evidence that cross-contamination of infectious agents is a negligible risk. *Fertility and Sterility*, 94(4), 1181–1188. Acedido em 09 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.031>

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society of Reproductive Biologists and Technologists. (2021). A review of best practices of rapid-cooling vitrification for oocytes and embryos: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 115(2), 305–310. Acedido em 14 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.11.017>

Raposo, V. L. (2021). Fertilidade rima com idade? (enquadramento ético-legal da criopreservação de ovócitos como método de preservação da fertilidade feminina). *Direito e Desenvolvimento*, 11(2), 245–263. Acedido em 16 de Fevereiro de 2024 em <https://doi.org/10.26843/direitoedesenvolvimento.v11i2.1331>

Robles, V., G. Valcarce, D., & F. Riesco, M. (2019). The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, 9(5), 181. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.3390/biom9050181>

Rodrigo, A. (2023, novembro 13). *Cryopreservation & vitrification of embryos, sperm & eggs*. inviTRA. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://www.invitra.com/en/freezing-and-vitrification/>

Roque, M., Valle, M., Kostolias, A., Sampaio, M., & Geber, S. (2017). Freeze-all cycle in reproductive medicine: current perspectives. *JBRA Assisted Reproduction*, 21(1). Acedido em 06 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20170012>

S. Aljaser, F. (2022). Cryopreservation methods and frontiers in the art of freezing life in animal models. Em *Veterinary Medicine and Science*. IntechOpen. Retirado: Fevereiro, 18, 2024 de 10.5772/intechopen.101750

Santé, C. A. (2023, junho 28). *What is long embryo culture and blastocyst grading?* inviTRA. Acedido em 22 de Março de 2024 em <https://www.invitra.com/en/embryo-culture-up-to-blastocyst-stage/>

Sciorio, R., Tramontano, L., Campos, G., Greco, P. F., Mondrone, G., Surbone, A., Greco, E., Talevi, R., Pluchino, N., & Fleming, S. (2024). Vitrification of human blastocysts for couples undergoing assisted reproduction: an updated review. *Frontiers in cell and developmental biology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1398049>

Seki, S., & Mazur, P. (2012). Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$  in dilutions of a standard vitrification solution. *PLoS One*, 7(4), e36058. Acedido em 11 de Março de 2024 em, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036058>

Sharma, Y., & Sharma, M. (2022). Biophysics of Cryopreservation. *International Journal of Thermodynamics*, 25(1), 17–27. Acedido em 11 de Março de 2024 em, <https://doi.org/10.5541/ijot.925283>

Tao, J., Craig, R. H., Johnson, M., Williams, B., Lewis, W., White, J., & Buehler, N. (2004). Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer. *Fertility and Sterility*, 82(1), 108–118. Acedido em 12 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.12.024>

Teng, J. (2020). *IMPROVING CRYOPRESERVATION OF BOVINE OOCYTES AND EMBRYOS*. Tese apresentada à Faculdade de Agricultura e Ciências da Vida, Zootecnia da Universidade Cornell para cumprimento parcial dos Requisitos para o programa de honras de pesquisa. Acedido a 24 de Abril de 2024 de <https://ecommons.cornell.edu/server/api/core/bitstreams/c69fa4b3-f523-4a84-bf86-4bcefca04a62/content>

Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>

Vajta, G., Rienzi, L., & Ubaldi, F. M. (2015). Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 30(4), 325–333. Acedido em 05 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.12.012>

Vanderzwalmen, P., Ectors, F., Panagiotidis, Y., Schuff, M., Murtinger, M., & Wirleitner, B. (2020). The evolution of the cryopreservation techniques in reproductive medicine—exploring the character of the vitrified state intra- and extracellularly to better understand cell survival after cryopreservation. *Reproductive Medicine (Basel, Switzerland)*, 1(2), 142–157. Acedido em 23 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.3390/reprodmed1020011>

Waterstone, M., Anastácio, A., & A. Rodriguez-Wallberg, K. (2018). Clinical outcomes of assisted reproductive techniques using cryopreserved gametes and embryos in human medicine. Em *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. IntechOpen. Retirado: Fevereiro, 16, 2024 de 10.5772/intechopen.80627

Whaley, D., Damyar, K., Witek, R. P., Mendoza, A., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2021). Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*, 30, 096368972199961. Acedido em 23 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>

Wong, K. M., Mastenbroek, S., & Repping, S. (2014). Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertility and Sterility*, 102(1), 19–26. Acedido em 23 de Março de 2024 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.027>

Youm, H. S., Choi, J.-R., Oh, D., & Rho, Y. H. (2017). Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: A meta-analysis. *Cryobiology*, 77, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.05.006>

Yousry, M., Orief, Y., Palapelas, V., & Al-Hasani, S. (2008). Embryo cryopreservation: is vitrification ready to replace slow freezing? *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, 3(4), 455–463. Acedido de 10 de Abril de 2024 em, <https://doi.org/10.1586/17474108.3.4.455>

Zaat, T., Zagers, M., Mol, F., Goddijn, M., van Wely, M., & Mastenbroek, S. (2021). Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *The Cochrane Library*, 2021(2). Acedido em 23 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.1002/14651858.cd011184.pub3>

Zhang, L., Yan, L.-Y., Zhi, X., Yan, J., & Qiao, J. (2015). Female fertility: Is it safe to “freeze?” *Chinese Medical Journal*, 128(3), 390–397. Acedido em 23 de Março de 2024 em <https://doi.org/10.4103/0366-6999.150115>