

Criopreservação de oócitos: pode ser considerada uma rotina na prática clínica?

Uma revisão sistemática

Oocyte cryopreservation: can it be considered a routine in the clinical practice? A systematic review

Raphael Câmara Medeiros Parente¹
 Felipe Simões Canavez²
 Saulo Dias³
 Roberto Antunes⁴
 Plínio Tostes Berardo⁵
 Hugo Miyahira⁶
 Vilmon de Freitas⁷

Palavras-chave

Oócito
 Criopreservação
 Injeções de esperma
 intracitoplásmicas

Keywords

Oocyte
 Cryopreservation
 Sperm injections,
 intracytoplasmic

Resumo

Considerando o grande interesse observado, os avanços nas técnicas para preservação da fertilidade feminina e levando em conta que a criopreservação de oócitos é uma atraente estratégia para preservação da fertilidade, foi realizada uma revisão sistemática para comparar a criopreservação de oócitos com outros métodos já estabelecidos para este intuito. Foram buscadas referências em dois bancos de dados (*Medline* e *Lilacs*), e identificados 869 estudos, mas nenhum deles conseguiu preencher os critérios de inclusão. Ainda há um longo caminho para este método ser incorporado à prática clínica.

Abstract

Considering the great interest observed; the advancement of techniques to preserve female fertility and that oocyte cryopreservation is an attractive strategy to fertility preservation, this systematic review was conducted in order to compare the cryopreservation of oocytes with other already established methods. References were searched in two databases (*Medline* and *Lilacs*). A total of 869 studies were identified, however none of them could compare oocytes cryopreservation with other techniques to preserve female fertility. There is still a long way to go to integrate it into a routine clinical procedure.

¹ Doutor em Ginecologia pela Universidade Federal Paulista (Unifesp) (Reprodução Humana) – São Paulo (SP); Médico Ginecologista do Ministério da Saúde do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (MS/RJ) – Rio de Janeiro (RJ), Brasil

² Mestre em Epidemiologia pelo Instituto de Medicina Social (IMS) da UERJ; Professor-assistente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Escola de Ciências Médicas de Volta Redonda – Volta Redonda (RJ), Brasil

³ Médico residente do Serviço de Ginecologia do Hospital dos Servidores do Estado (MS/RJ) – Rio de Janeiro (RJ), Brasil

⁴ Médico obstetra do MS do Rio de Janeiro; Médico da Clínica G&O de Reprodução Humana – Rio de Janeiro (RJ), Brasil

⁵ Médico ginecologista do Hospital dos Servidores do Estado do MS/RJ; Doutor em Ciências Morfológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

⁶ Chefe de Clínica do Serviço de Ginecologia do Hospital dos Servidores do Estado do MS/RJ; Doutor em Ginecologia pela UFRJ; Mestre em Ginecologia pela UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil

⁷ Professor livre-docente do Departamento de Ginecologia da Unifesp; Doutor em Medicina pela Unifesp – São Paulo (SP), Brasil

Introdução

Observa-se, nas últimas décadas, grande avanço no tratamento de doenças oncológicas com o auxílio da quimioterapia e radioterapia. Novos agentes quimioterápicos têm sido estudados para tratamento de inúmeras doenças, incluindo doenças hematológicas e autoimunes. Outras potenciais indicações de métodos para preservação da fertilidade são pacientes com necessidade de transplantes de medula óssea, e mulheres que terão que ser submetidas à ooforectomias por motivos benignos, como endometriose e tumores ovarianos benignos. Todos estes procedimentos têm como possível efeito colateral um dano irreversível à função reprodutiva da mulher. Associado a este fato, nota-se também uma tendência natural e progressiva do adiamento da gestação nas mulheres em idade fértil.

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas de preservação da fertilidade tem sido tema de grande interesse, seja pelo crescente uso de agentes gonadotóxicos que causam falência ovariana precoce, iatrogênica, ou pelo simples interesse em manter a fertilidade em mulheres que por opção própria, ou por falta de parceiro, têm que postergar a maternidade. Vários meios existem com o intuito de preservação da fertilidade: congelamento de embriões, de tecido ovariano e oócitos; ooforopexia; supressão ovariana química, entre outros. A criopreservação de oócitos é uma técnica experimental atraente pelo fato de não necessitar de cirurgia. Além disto, a criopreservação de oócitos não possui as implicações éticas, religiosas e legais referentes ao congelamento de embriões, além da falta da necessidade de parceiro. É também um método promissor para programas de doação de oócitos por não haver necessidade de concordância entre ciclos de doadora e receptora. Outra desvantagem desta técnica é que necessita de estimulação ovariana, a qual, por vezes, pode ser deletéria em tumores hormônio-responsivos, como, por exemplo, o câncer de mama. Além de atrasar o tratamento do câncer por algumas semanas para permitir a captação oocitária. O custo ainda é alto e as taxas de gravidez são pequenas.

Desde o primeiro relato de nascimento a partir de criopreservação de oócito humano em 1986¹ (C), até o número já atingido de cerca de 200 nascimentos por este método² (C), muito se discute sobre novas tecnologias de preservação da fertilidade. Inicialmente, a técnica de criopreservação de oócito foi deixada de lado devido à grande superioridade da preservação de embriões por meio de congelação. Com o desenvolvimento de novas tecnologias de congelamento, como a vitrificação de oócitos, além da melhora das técnicas, novamente foi dada atenção ao estudo de oócitos para esta finalidade. Além disto, em alguns países, como a Itália, foi completamente proibido o congelamento de

embriões, o que impulsionou a pesquisa de congelamento de oócitos. A consequência disto é que grande parte dos estudos publicados sobre este tema são italianos. Entretanto, mesmo com vários avanços e mudanças nos protocolos com diferentes métodos e concentrações de crioprotetores, somente foi atingida uma taxa máxima de gravidez de 10 a 25% com a criopreservação de oócitos no melhor dos panoramas² (C).

Estes pobres resultados norteiam, de acordo com o Comitê de Ética da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva de 2008, a orientação de que o único método bem estabelecido para preservação da fertilidade é a criopreservação de embriões, restando para o congelamento de oócitos ser realizado em centros de pesquisa para avaliar se, futuramente, terá espaço como mais uma técnica de preservação da fertilidade incorporada à prática clínica³ (D). Isto se deve aos resultados ainda pobres quando comparados ao congelamento de embriões, embora, recentemente, vários estudos têm demonstrado taxas maiores de sobrevivência oocitária pós-descongelamento, fertilização e gravidez³ (D). Uma metanálise publicada, em 2006, por Oktay, Cil e Bang demonstrou que a fertilização *in vitro* (FIV), utilizando oócitos advindos da técnica de congelação lenta, tem resultados insatisfatórios quando comparada com aqueles frescos. A taxa de gravidez para oócitos derivados desta técnica de criopreservação foi de 20,6%, a gravidez clínica de somente 2,3% e a taxa de implantação de 10,1%⁴ (A). Por terem poucos casos ainda na época desta metanálise, não foi avaliada a vitrificação de oócitos.

Vários motivos contribuem para estas baixas taxas de fertilização e gravidez. O oócito que se encontra na fase de metafase II é extremamente frágil devido ao seu grande volume, a maior quantidade de água intracelular e ao arranjo cromossômico, tornando-o mais suscetível à ação deletéria do congelamento e descongelamento. A injúria pelo frio (efeito *chilling*) é o maior obstáculo para o sucesso da criopreservação de oócitos, ocasionando lesões nas membranas celulares, microtúbulos e na organização do citoesqueleto e zona pelúcida. Anormalidades cromossômicas também são observadas após a criopreservação de oócitos⁵ (D). O *chilling* ocorre quando a membrana da célula se submete à transição do estado líquido para o sólido no momento em que as temperaturas variam entre +5 e -15° C, ocasionando alterações nos lipídeos da membrana e nos microtúbulos do fuso meiótico, além de ocasionar endurecimento da zona pelúcida. Há duas grandes estratégias de criopreservação de oócitos: congelação lenta e vitrificação. O efeito *chilling* ocorre quando se utiliza a técnica de congelação lenta, em que os oócitos passam por essas temperaturas com velocidades extremamente baixas (-0,3° C/min. até atingir cerca de -50° C e a partir deste momento mais rápido

até atingir -150°C). Como tentativa de resolver este problema, criou-se uma nova técnica denominada vitrificação. A vitrificação corresponde à técnica mais atual e com melhores resultados para a congelação de oócitos. Trata-se de um procedimento no qual o oócito é mergulhado em um pequeno volume de uma solução de crioprotetores altamente concentrada (na ordem de 6-7 M) diretamente no nitrogênio líquido. Dessa forma ocorre a desidratação oocitária rápida, diminuindo assim a formação de gelo intracelular. Outra característica do procedimento é a utilização de velocidades muito elevadas de resfriamento (15.000 a $30.000^{\circ}\text{C}/\text{min.}$). Desse modo, consegue-se reduzir o tempo de exposição às soluções altamente concentradas potencialmente citotóxicas. Também se diminui o período de exposição às temperaturas entre 15 e -5°C , momento crítico no qual ocorre o efeito *chilling*. A reversão do procedimento acontece utilizando a mesma velocidade

Considerando a importância do tema numa sociedade em que a maternidade é cada vez mais postergada; e os tratamentos contra o câncer, os quais permitem que as mulheres ainda sonhem com o direito de terem filhos, optou-se pela realização de uma revisão sistemática que tem como objetivo avaliar a criopreservação de oócitos, comparando-a com outras técnicas disponíveis para o adiamento e/ou conservação da fertilidade no concernente às taxas de fertilização, gravidez e nascidos vivos.

O conhecimento destes métodos é necessário para auxiliar o médico na utilização das novas estratégias de preservação da fertilidade, com uma melhor compreensão das indicações e, principalmente, de suas limitações em atingir as expectativas da paciente.

Métodos

Estratégia de busca

Dois bancos de dados foram usados para buscar por referências bibliográficas: *Medline* e *Lilacs*. A busca efetuada no banco de dados do *Medline*, realizada entre 19 de abril a 20 de maio de 2009, utilizou como descritor para a pesquisa o termo *oocyte*[ti] AND cryopreservation*. Esta estratégia foi adaptada para a busca eletrônica no *Lilacs*, no mesmo período. A busca foi limitada a estudos em seres humanos e a estudos nos idiomas inglês, português, espanhol e francês, publicados de 1986 (primeiro caso documentado de criopreservação de oócitos) a 2009. Foram utilizados como critérios de exclusão: estudos em modelos animais, relatos de caso e estudos de comparação com criopreservação de esperma e/ou tecido testicular. Revisões narrativas e metanálises prévias foram utilizadas apenas para embasamento científico. As referências bibliográficas dos artigos

selecionados para leitura também foram utilizadas na busca, por meio de referência cruzada.

A pesquisa bibliográfica foi realizada por dois revisores RCMP e SBD, que leram os resumos ou, na falta destes, os textos completos dos artigos que foram encontrados, de forma a selecionar os artigos para inclusão na revisão sistemática.

Definição do desfecho

Os desfechos de interesse foram taxas de fertilização, gravidez e nascidos vivos entre estudos que comparam a criopreservação de oócito com outro método de preservação da fertilidade.

Resultados

Foram identificados 869 artigos no *Medline* e *Lilacs*. Pela leitura dos resumos, 191 artigos foram excluídos devido ao desenho do estudo (revisão, editoriais, relatos de casos etc.) e 634 por se tratarem de temas sem correlação com o estudado. Para análise posterior, foram selecionados 44 estudos. Destes, quatro estudos foram excluídos pelo idioma e 22 por serem do tipo revisão. Foram lidos, na íntegra, 18 estudos. Não houve ao final da busca, algum estudo que comparasse a criopreservação de oócitos com outro método de preservação da fertilidade (Figura 1).

Discussão

Não foi encontrado em nossa revisão sistemática nenhum estudo que comparasse a criopreservação de oócitos com outro método de preservação da fertilidade, por meio de ensaios clínicos ou estudos observacionais. Vários fatores podem ser aventados para este resultado, mas, provavelmente, o mais importante é o fato da criopreservação de oócitos ainda ser um método experimental com resultados inconsistentes até o presente momento. Portanto, somente após a comunidade científica aceitá-la como um método passível de ser utilizado de forma rotineira é que ela poderá ser comparada com métodos já sedimentados. Some-se a isto, o fato de grande parte dos outros métodos para preservação da fertilidade não terem resultados animadores, fazendo com que não haja nenhum método padrão-ouro contra o qual os outros possam ser confrontados para avaliação de eficácia de cada método, com exceção, da criopreservação de embriões que, mesmo assim, não cabe em todas as situações. Além disto, um método para preservação da fertilidade que pode ser muito útil numa determinada situação, por exemplo, é a ooforopexia para radioterapia localizada, e pode ser completamente inútil para outra, como por exemplo, no tratamento quimioterápico.

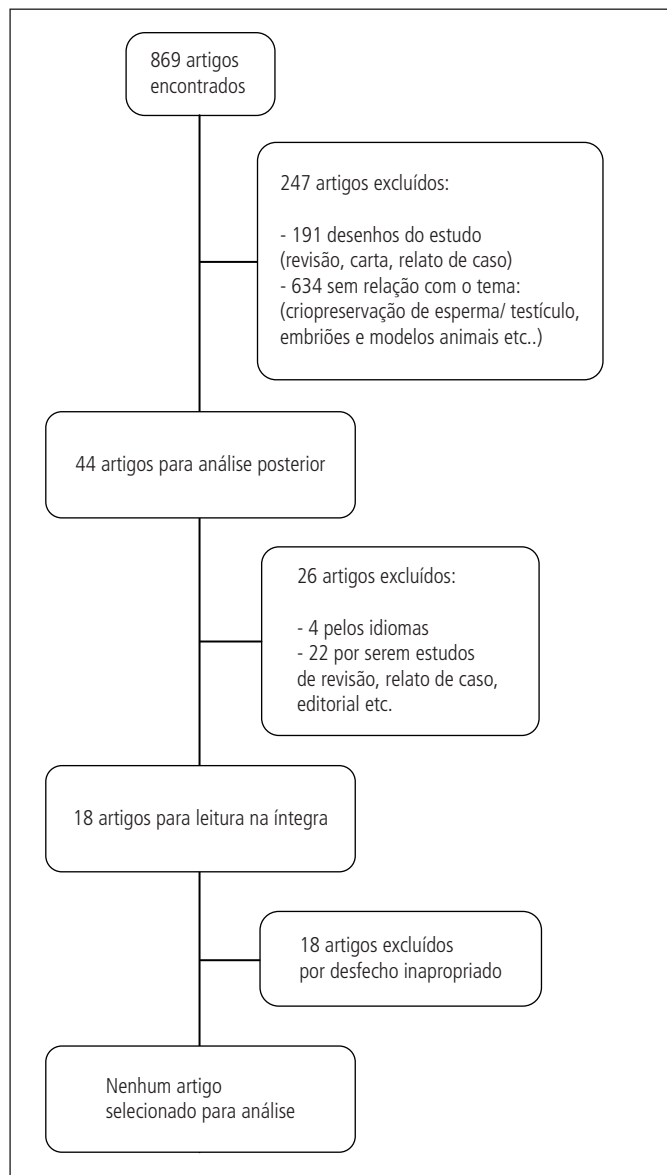


Figura 1 - Fluxograma da pesquisa bibliográfica e seleção dos artigos

Os estudos existentes sobre criopreservação de oócitos resumem-se a relatos e séries de casos. Comparações com outros métodos, quando existentes, são somente com FIV ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) utilizando-se de oócitos frescos. Os resultados são largamente favoráveis ao uso de oócitos frescos^{6,7} (C, C). Um estudo italiano, realizado em 2006, demonstrou que os desfechos em que a FIV precedida de criopreservação têm os piores resultados em relação à realizada com oócitos frescos são as taxas de clivagem e de obtenção de embriões do tipo I. Não houve diferença significativa no que se refere às taxas de fertilização⁷ (C).

As taxas de sobrevivência do oócito após a criopreservação variam entre os estudos de 75 a 82%^{8,9} (C, C). Mas após o descongelamento, vários oócitos não sobrevivem, com taxas

variando entre 25 a 40% de sobrevivência⁵ (D). Alguns estudos recentes têm descrito melhores taxas de sobrevivência oocitária pós-descongelamento, fertilização e de gravidez após novas técnicas de criopreservação oocitária^{10,11} (C, C). Entre eles, foram comparados resultados obtidos por FIV e ICSI derivadas de oócitos criopreservados pelas duas técnicas conhecidas de criopreservação com aqueles derivados de oócitos frescos. Nesses estudos observou-se que oócitos criopreservados pelo método de congelamento lento apresentaram menores taxas de fertilização e de clivagem, e resultaram no desenvolvimento de embriões de menor qualidade quando comparados com oócitos frescos, utilizando-se o método ICSI⁶ (C). Quando se comparou grupos de pacientes submetidos à FIV e ICSI, utilizando oócitos frescos e criopreservados por congelamento lento, observou-se menores taxas de clivagem no grupo que utilizou oócitos congelados para ICSI, assim como desenvolvimento de embriões de menor qualidade⁷ (C). Estes estudos sugerem, portanto, que o congelamento de embriões pelo método de congelamento lento pode refletir em um impacto negativo no potencial de fertilização e desenvolvimento embrionário, provavelmente dado por processo de lesão irreversível da repolimerização de microtúbulos que ocorre durante a crioconservação.

Quando a ICSI foi comparada, utilizando oócitos frescos e congelados pelo método da vitrificação, observamos taxas de fertilização, clivagem e implantação mais semelhantes entre os grupos comparados¹² (C). Utilizando-se a vitrificação pelo método *Cryotop*, encontram-se descritas taxas de fertilização, clivagem e qualidade embrionária mais próximas entre os grupos que utilizaram tanto oócitos frescos quanto vitrificados para ICSI¹³ (C), embora ainda sejam inferiores aos resultados obtidos com oócitos frescos. Esses estudos sugerem que a técnica de vitrificação pode representar um promissor método de criopreservação, obtendo melhores resultados quando comparado com a congelamento lento. Contudo, novos estudos tornam-se necessários para avaliação mais consistente do método e utilização rotineira na preservação da fertilidade.

O grande desafio é aumentar as taxas de nascidos vivos para próximas aos resultados obtidos com oócitos frescos. As taxas obtidas com a criopreservação ainda estão muito distantes de resultados que permitam caracterizar a técnica como estabelecida no manejo de preservação da fertilidade⁴ (A).

Os métodos de preservação da fertilidade tornam-se cada vez mais importantes, devido aos diagnósticos de câncer, que antes eram sinônimos de morte ou de comprometimento severo da qualidade de vida a longo prazo em mulheres jovens, atualmente serem totalmente passíveis de cura em significativa parte dos casos após tratamentos com quimio e/ou radioterapia. Alie-se a

isto, a postergação da maternidade por parte de várias mulheres entretidas nos afazeres profissionais ou por falta de parceiros. Dentre as complicações apresentadas pelas pacientes que se submetem ao tratamento do câncer, está a perda da função ovariana, havendo relação direta com o tipo e a dose da droga utilizada, o tempo de tratamento, a via de administração, a doença em questão, o sexo e a idade da paciente no momento do tratamento e a presença de terapia prévia para infertilidade¹⁴ (D). Segundo a Sociedade Americana de Oncologia Clínica, somente a ooforopexia para radioterapia localizada, cirurgias conservadoras e a criopreservação de embriões são métodos comprovadamente eficazes para a preservação da fertilidade¹⁵ (D). Por outro lado, o Comitê de Ética da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) somente tem como método estabelecido de preservação da fertilidade feminina a criopreservação de embriões. Todos os outros métodos, no qual se inclui a criopreservação de oócitos, ainda estão sob investigação e só devem ser realizados em centros de pesquisas¹⁶ (D).

Embora com taxas crescentes de sucesso, a criopreservação de oócitos ainda é desapontadora. Este fato é importante para o caso de ser utilizada em mulheres que tão somente querem adiar a maternidade por motivos que não sejam doenças. É um importante ponto, pois já há alguns centros de reprodução humana que oferecem o método com este propósito mesmo sem consenso por parte das sociedades mais influentes mundiais na área da reprodução. Uma metanálise sobre o tema, comparando a criopreservação de oócitos seguida de FIV e a FIV com oócitos frescos, demonstrou que o sucesso do método em mulheres de 33 anos foi comparável com resultados obtidos por mulheres de 41 e 42 anos utilizando oócitos frescos⁴ (A), o que faz, no mínimo, ser algo temerário utilizar a técnica para postergação da maternidade no atual nível de desenvolvimento do método. Felizmente, há avanços muito rápidos nas técnicas utilizadas e é possível que, brevemente, as taxas de sucesso alcancem melhores resultados.

Existem duas grandes técnicas de criopreservação de oócitos. Inicialmente, a congelação lenta era a única forma disponível. Esta obteve vários avanços durante mais de 20 anos de manuseio do método e ganhou grande aceitação ultimamente. Melhoras referentes aos crioprotetores utilizados e no processo de congelação e descongelação melhoraram bastante as taxas de sobrevivência de oócitos e de gravidezes obtidas¹⁷ (D). O objetivo é o de ter uma lenta passagem para o estado de congelação que permita às células responder osmoticamente por meio da máxima desidratação possível, evitando, assim, a presença de água e formação de

gelo intracelular. É necessária também no momento da utilização do oócito, uma rápida descongelação para evitar os deletérios efeitos da formação de gelo intracelular, a qual ocasiona defeitos estruturais ao oócito na passagem do estado sólido para o retorno ao líquido. Mudanças na concentração de sucrose, passando de 0,1 para 0,3 mol/L, trouxeram grandes benefícios para esta técnica¹⁸ (C). Alguns solutos diferentes foram utilizados como crioprotetores, incluídos entre eles: dimetilsulfóxido, glicerol, etileno e propilenoglicol⁹ (D).

Outras modificações incorporadas ao longo destes anos que melhoraram as taxas de gravidezes foram: mudanças na temperatura inicial de exposição dos oócitos aos crioprotetores, diminuição da concentração de sódio no meio em que se situa o oócito e a troca do sódio por compostos orgânicos, e adição do crioprotetor trealose no interior dos oócitos¹⁹ (C). O grande inconveniente desta técnica é o fato de haver passagem relativamente longa pelo gradiente de temperatura, quando ocorre o efeito *chilling*. A concentração de crioprotetores utilizada nesta técnica é relativamente baixa o que, em teoria, pode evitar os efeitos tóxicos diretos ao oócito. Por outro lado, no processo de vitrificação não há necessidade de estabelecer o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelulares no período de congelação das células. Devido às altas velocidades de congelação utilizadas, não há cristalização do meio intracelular. A necessidade de crioprotetores é maior que na congelação lenta, já que a desidratação das células é feita antes do resfriamento por meio de uma solução altamente concentrada de crioprotetores (6-7 M)²⁰ (C). Embora no começo do uso da vitrificação tenha havido um grande entusiasmo quando comparada com a congelação lenta, notou-se não haver grandes diferenças de resultado com o passar dos anos. Somente com o uso de novos sistemas de resfriamento, como o *Cryotop*, incorporados às técnicas de vitrificação, foi quando houve um salto qualitativo nos resultados obtidos, fazendo da vitrificação o meio mais promissor para a criopreservação de oócitos^{13,21} (C, C).

Embora recentemente tenha havido grandes progressos nas técnicas de criopreservação de oócitos, ainda é um método em desenvolvimento e que necessita de mais estudos e avanços para ser incorporado à prática clínica e nos protocolos de preservação da fertilidade feminina. Como demonstração disto, a presente revisão sistemática não encontrou nenhum estudo em que a criopreservação de oócitos tenha sido confrontada com algum outro método aceito pela comunidade para preservação da fertilidade.

Leituras suplementares

1. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986;1(8486):884-6.
2. Kim TJ, Laufer LR, Hong SW. Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril*. 2009. [No prelo].
3. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S241-6.
4. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86(1):70-80.
5. Tao T, Del Valle A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25(7):287-96.
6. Magli MC, Lappi M, Ferraretti AP, Capoti A, Ruberti A, Gianaroli L. Impact of oocyte cryopreservation on embryo development. *Fertil Steril*. 2009. [No prelo].
7. Chamayou S, Alecci C, Ragolia C, Storaci G, Maglia E, Russo E, et al. Comparison of in-vitro outcomes from cryopreserved oocytes and sibling fresh oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(6):730-6.
8. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 2001;16(3):411-6.
9. Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1, 2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum Reprod*. 2005;20(7):1975-80.
10. Barritt J, Luna M, Duke M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, et al. Report of four donor-recipient oocyte cryopreservation cycles resulting in high pregnancy and implantation rates. *Fertil Steril*. 2007;87(1):189.e13-7.
11. Boldt J, Tidswell N, Sayers A, Kilani R, Cline D. Human oocyte cryopreservation: 5-year experience with a sodium-depleted slow freezing method. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):96-100.
12. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(1):72-9.
13. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1657-64.
14. Silva A. Preservação de fertilidade. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(6):365-72.
15. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2917-31.
16. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. *Fertil Steril*. 2005;83(6):1622-8.
17. Porcu E, Bazzocchi A, Notarangelo L, Paradisi R, Landolfo C, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008;15(6):529-35.
18. Bianchi V, Coticchio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C, Borini A. Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/l) and rehydration (0.3 mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(1):64-71.
19. Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod*. 2006;21(2):512-7.
20. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006;65(1):236-44.
21. Chian RC, Huang JY, Gilbert L, Son WY, Holzer H, Cui SJ, et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2391-8.