UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* de portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à estimulação ovariana: estudo piloto.

Rodolpho Cruz Vieira

RIBEIRÃO PRETO

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* de portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à estimulação ovariana: estudo piloto.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Aluno: *Rodolpho Cruz Vieira*

Orientador: *Profª. Drª. Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro*

RIBEIRÃO PRETO

2008

Vieira, Rodolpho Cruz

Avaliação do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* de portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à estimulação ovariana: estudo piloto. Ribeirão Preto, 2008.
104 p. : il. ; 29,7 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.
Orientador: Navarro, Paula Andréa de Albuquerque Salles

1. Síndrome dos Ovários Policísticos; 2. fuso meiótico; 3. qualidade oocitária; 4. Maturação In Vitro; 5. ICSI; 6. ciclos estimulados

"Só existe dois dias do ano em que nada se pode fazer.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã.
Portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver."

Dalai Lama, 1935

Aos meus pais, Jeremias e Maria da Graça, pela dedicação dispensada em minha formação, por toda experiência passada, que até hoje vem servindo de base para minha carreira, bem como pelo imenso amor com o qual minha vida é regida.

Agradecimentos

A todo o **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, pelas oportunidades que me foram concedidas durante o período de minha pós-graduação, e, em especial:

- à **Profa. Dra. Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro,** pela preciosa orientação, pelos valiosos conselhos e pelo incentivo ao meu crescimento científico;
- ao **Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani**, pela oportunidade única de me permitir realizar o sonho da docência;
- ao **Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá**, pelas primorosas contribuições e pelo exemplo de dedicação à vida acadêmica;
- ao **Prof. Dr. Antônio Nogueira**, pela contribuição à minha formação, pelas disponibilidade, atenção e acessibilidade;
- à **Profa. Dra. Rosana Maria Reis**, pela disponibilidade e pelo incentivo;
- à colega **Dra. Ionara Diniz Evangelista Barcelos**, pela amizade, parceria e colaboração no projeto que originou o presente trabalho;
- à colega **Elisa Melo Ferreira** pela amizade, parceria e pelo capricho com o qual auxiliou na análise dos dados do trabalho;
- à **Sra. Maria Cristina Picinato Medeiros de Araújo** pela amizade, pelo auxílio técnico e pela disponibilidade na contribuição para a coleta do material para o trabalho
- à **Profa. Isabel Moutinho da Ponte**, pela gentileza e pela eficiência com que realizou a revisão gramatical;

- à equipe técnica do laboratório do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Sras. Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Yamada Dantas, Roberta Cristina Giorgenon, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Sandra Viana e Maria Albina Vercese Bortoliero**, pelo apoio dispensado e pela amizade e carinho com que tratam a todos;
- à minha grande incentivadora e companheira **Amélia Belisa Moutinho da Ponte**, pelo incentivo, carinho e compreensão, e, por nunca ter se negado a dispensar esforços em prol da realização deste trabalho;
- aos meus irmãos **Dr. Leopoldo Cruz Vieira, Augusto César Antunes Vieira e Aline Cristina Antunes Vieira** pela incondicional amizade;
- à **Dra. Maria Telma Antunes Vieira**, pelos enormes apoio e incentivo;
- aos colegas e amigos da pós-graduação e do laboratório do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela amizade, pelo companheirismo, e pela torcida pelo sucesso mútuo, especialmente, a **Bruno Ramalho, Gustavo Mafaldo, Francielle Araújo, Daniela Garçon, Laura Santana, Janaína Mendes, Alessandra Vireque, Milena Bastos, Aline Zyman, Wellington de Paula, Carolina Sales, Gustavo Salata, Ivan Penna, Carlos Araújo**;
- à **Sra. Ilza Alves Rezende Mazzocato** e às **Srtas. Taísa Abade** e **Suellen Soares Bezerra** pela dedicação e eficiência com que exerceram a função do secretariado da pós - graduação da tocoginecologia, bem como, pela atenção dispensada;
- aos funcionários da secretaria do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Rosane Aparecida Cunha Casula, Elettra Greene, Ricardo José da Silva**, **Reinaldo Vicente Tavares,** pelo apoio técnico e atenção dispensada;

♣ aos **casais participantes** do presente trabalho, pelo carinho e pela cooperação, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e ao **Comissão Nacional de Ensino e Pesquisa (CNPq),** pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 12

3 MATERIAL E MÉTODOS 14

3.1. Material e Pacientes 15

3.2. Métodos 17

3.2.1 Protocolo de estimulação 17

3.2.2 Captação oocitária 19

3.2.3 Maturação *In Vitro* 21

3.2.4 Microscopia de imunofluorescência para visualização do fuso meiótico e da distribuição cromossômica 21

3.2.5 Análise morfológica do fuso meiótico e da distribuição cromossômica do oócito em Metáfase II 23

3.3 Análise Estatística 24

4 RESULTADOS 25

4.1 Taxas de Maturação *In Vitro* (MIV) entre as pacientes dos grupos SOP e controle 26

4.2 Análise do fuso meiótico e distribuição cromossômica dos oócitos em metáfase II, após MIV, nos grupos SOP e controle. 27

4.3 Cálculo do tamanho amostral 28

5 DISCUSSÃO 29

6 CONCLUSÃO 36

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38

APÊNDICE **46**

APÊNDICE A - Curva de maturação In Vitro 47

APÊNDICE B - Descrição dos oócitos incluídos na pesquisa do grupo SOP 48

APÊNDICE C - Descrição dos oócitos incluídos na pesquisa do grupo controle 49

ANEXOS **51**

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido 52

ANEXO B - Protocolo de pesquisa 54

ANEXO C - Artigo aceito para publicação pela Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 57

ANEXO D - Artigo enviado para publicação pelo periódico Fertility and Esterility 78

RESUMO

Objetivos: Avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e fatores masculino e/ou tubário de infertilidade.

Métodos: Vinte e seis pacientes inférteis com SOP e 48 pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade, submetidas a ciclos estimulados para captação oocitária para injeção intracitoplasmática de espermatozóide, foram selecionadas prospectiva e consecutivamente e divididas em grupos de estudo e controle, respectivamente. Oócitos imaturos (34 e 56 oócitos) foram obtidos de 13 e 27 pacientes, respectivamente, dos grupos SOP e controle, sendo submetidos à maturação *in vitro* (MIV), respectivamente, por 19 horas ± 1 hora (VG) e 4 horas ± 30 minutos (MI), conforme curva de MIV previamente realizada no presente serviço. Oócitos em metáfase II (MII) após MIV, foram fixados, submetidos a imunocoloração e microscopia de fluorescência para avaliação morfológica do fuso e da distribuição cromossômica.

Resultados: Não observamos diferença significativa nas taxas de MIV entre os dois grupos avaliados (50% e 42,8%, respectivamente, para os grupos SOP e controle). Na análise por microscopia de imunofluorescência, detectaram-se 3 e 2 oócitos, respectivamente, no grupo de estudo e no grupo controle, em estágio de Telófase I e 3 oócitos ativados partenogeneticamente no grupo controle. Ocorreu a impossibilidade de análise de 4 oócitos do grupo controle em virtude de dificuldades técnicas durante o processo de imunocoloração. Não houve diferença significativa nas proporções de anomalias meióticas entre os grupos SOP e controle (57,1 e 46,7%, respectivamente).

Conclusões: Os dados preliminares do presente estudo, apesar de não demonstrarem aumento significativo na incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas nos oócitos deste grupo de pacientes, quando comparados aos de portadoras de fator masculino e/ou tubário de infertilidade, o que

deverá ser mais bem avaliado em estudos com maiores casuísticas. Estes achados têm potencial clínico para apontar uma possível explicação para as controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome dos Ovários Policísticos, fuso meiótico, qualidade oocitária, Maturação In Vitro, ICSI, ciclos estimulados.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the meiotic spindle and the chromosome distribution of *in vitro* matured oocytes obtained during stimulated cycles from infertile women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and with male factor and/or tubal infertility.

Methods: Twenty six infertile patients with PCOS and 48 patients with infertility due to tubal and/or male factor, submitted to stimulated cycles for oocyte retrieval for intracytoplasmic sperm injection, were selected prospectively and consecutively and respectively assigned to the study group and the control group. Imature oocytes (34 and 56 oocytes) were obtained from 13 and 27 patients, respectively, of PCOS and control groups, and submitted to *in vitro* maturation (IVM) for 19 hours ± 1 hour (GV) and 4 hours ± 30 minutes (MI) according to the IVM curve previously constructed in the present service. After IVM, oocytes in metaphase II (MII) were fixed and submitted to immunostaining and fluorescence microscopy for morphological evaluation of the spindle and of chromosome distribution.

Results: IVM rates were similar between the two analyzed groups (50% e 42.8%, respectively, in PCOS e control groups). By immunofluorescence analysis, there were 3 and 2 oocytes, respectively, in PCOS e control groups, in telophase I stage, and 3 parthenogenetic activated oocytes in control group. Because of technical difficulties during the execution of the immunofluorescence protocol, 4 oocytes from the control group could not be analyzed. The difference in the proportions of meiotic anomalies between the two groups was not statistically significant (57.1 e 46.7%, respectively, in PCOS e control groups).

Conclusions: The present preliminary data, although not showing a significant increase in the incidence of meiotic anomalies in women with PCOS, suggest a tendency to a higher occurrence of meiotic anomalies in the oocytes of this group of patients compared to women with male and/or tubal infertility, a fact to be better evaluated in studies on larger patient series. The present findings have the clinical potential to provide a possible explanation for

the controversial lower fertilization rates observed in patients with PCOS submitted to Assisted Reproduction Techniques.

KEYWORDS: Polycystic Ovary Syndrome, meiotic spindle, human oocyte quality, In Vitro Maturation, ICSI, stimulated cycles.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade decorrente da anovulação normogonadotrófica pode ser identificada em 18 a 25 % dos casais inférteis (HULL et al., 1985), sendo que a Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), representa o diagnóstico mais comum neste grupo de pacientes (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004).

Podemos encontrar em pacientes portadoras desta síndrome anormalidades no eixo reprodutivo manifestadas por hipersecreção de hormônio luteinizante (LH), hiperatividade celular teca-estromal e hipofunção do eixo hormônio folículo estimulante (FSH)-células da granulosa, resultando em hiperandrogenismo, hirsutismo, parada do desenvolvimento folicular e aciclicidade ovariana (YEN; JAFFE; BARBIERI, 1999).

Os critérios diagnósticos da SOP têm sofrido diversas modificações ao longo dos anos. Na atualidade, o diagnóstico de SOP baseia-se na presença de dois dos três seguintes critérios: oligo ou amenorréia, sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ovários policísticos a ultrassonografia (THE ROTTERDAM ESHRE/ASRM SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP, 2004). É importante ressaltarmos que este diagnóstico implica a exclusão de outras causas de anovulação crônica e de hiperandrogenismo.

A indução farmacológica da ovulação em pacientes com desejo de gestação constitui a opção de escolha no intuito de promover a mono-ovulação para ciclos naturais programados ou de inseminação intra-útero. O citrato de clomifeno geralmente é utilizado como droga de primeira linha com boas taxas cumulativas de nascidos vivos. Já as gonadotrofinas exógenas, por promoverem um risco maior de multiparidade e de ocorrência da Síndrome de hiperestimulação Ovariana (SHO), são opções de segunda linha, geralmente sendo prescritas nos casos de resistência ao uso do citrato de clomifeno e/ou quando há outro fator de infertilidade associado. Dispomos ainda de outras estratégias visando a promoção de ciclos mono-ovulatórios, como a redução de peso e instituição de mudanças no estilo de vida, a

utilização de agentes sensibilizadores à insulina (LORD et al., 2003) ou inibidores da aromatase (MITWALLY; CASPER, 2001) utilizados em associação com o citrato de clomifeno ou as gonadotrofinas ou, alternativamente, como drogas de primeira escolha, assim como a eletrocauterização laparoscópica dos ovários (FARQUHAR et al.,2001).

Adicionalmente à indução convencional da ovulação, as técnicas de reprodução assistida de alta complexidade, como a Fertilização *In Vitro* (FIV) e a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) estão sendo aplicadas cada vez mais neste grupo de pacientes como tratamento da infertilidade (HEIJNEN et al., 2006). A introdução destes procedimentos de reprodução assistida na prática clínica tem nos trazido a oportunidade de estudar os efeitos da presente afecção em estágios específicos do processo reprodutivo, incluindo a foliculogênese, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação. Porém, convém ressaltarmos que os resultados destes procedimentos em pacientes portadoras de SOP são bastante conflitantes na literatura, aumentando ainda mais a dificuldade de compreensão dos mecanismos envolvidos no etiopatogênese da infertilidade relacionada a esta síndrome.

Desta forma, quando se analisam os dados disponíveis na literatura acerca dos resultados de FIV e ICSI em pacientes portadoras de SOP, evidencia-se que alguns autores observaram menores taxas de fertilização nas pacientes com esta afecção, comparativamente as que foram tratadas por fator tubário (HEIJNEN et al., 2006; URMAN et al., 2004; DOLDI et al., 1999; MULDERS et al., 2003), enquanto outros não corroboraram estes resultados (HARDY et al., 1995). Por outro lado, a maioria dos autores é concordante em não constatar diferença entre as taxas de clivagem, de implantação, de gravidez clínica e de nascidos vivos, de pacientes portadoras desta causa de anovulação crônica e de pacientes do grupo controle, constituído por pacientes com fator tubário como causa da infertilidade (HEIJNEN et al., 2006; URMAN et al., 2004; DOLDI et al., 1999; GROCHOWSKI et al., 1997; ASHKENAZI

et al., 1995; HARDY et al., 1995; HOMBURG et al., 1993; URMAN et al., 1992; DOR et al., 1990). Discordância ocorreu também quando foram comparadas as taxas de abortamento entre as portadoras e as não portadoras de SOP. Apesar de alguns autores relatarem uma maior incidência de abortamento espontâneo (20 a 25%) nas pacientes com SOP (HOMBURG; HOWLES, 1999), significativamente superiores as das pacientes sem esta afecção (10 a 15%), outros não corroboram este achado, atribuindo as maiores taxas de abortamento à presença de obesidade e/ou outras variáveis mais freqüentes no grupo de pacientes com SOP (WANG, J. et al., 2001; FRANK et al., 2003).

Apesar da escassez e da falta de uniformidade entre os dados publicados, em uma metanálise recentemente publicada, em que foram analisados nove estudos que compararam os resultados de FIV em pacientes com SOP e controles (totalizando 793 ciclos de FIV em 458 pacientes portadoras de SOP e 1116 ciclos no grupo controle), observou-se diferença significativa entre os grupos apenas em relação ao maior número de oócitos captados por ciclo, às menores taxas de captação e de fertilização nas pacientes com SOP, quando comparadas as grupo controle (HEIJNEN et al., 2006). Neste estudo, as taxas comparativas de abortamento entre os grupos não foram avaliadas, devido à escassez dos dados disponíveis nos estudos incluídos na análise, deixando margem a dúvidas quanto ao real impacto desta síndrome na gênese do abortamento espontâneo.

Assim como não há consenso quanto aos possíveis efeitos detrimentais da SOP sobre os resultados dos tratamentos da infertilidade por meio dos procedimentos de reprodução assistida, também não existe um fator causal definido para tais repercussões, o que parece ser um importante obstáculo para o sucesso da terapia destas pacientes. Temos evidências de que a resposta exacerbada às gonadotrofinas exógenas administradas para a indução da ovulação, elevando a concentração de estrogênio e androgênio séricos, poderia alterar a receptividade uterina (WANG, J. et al., 2001; VALBUENA et al., 1999). Por outro lado, as concentrações

elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, interferindo na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de má qualidade (STANGER; YOVICH, 1985; HOWLES et al., 1986; REGAN et al., 1990). Desta forma, questiona-se o papel do comprometimento da receptividade endometrial e da qualidade oocitária na gênese dos efeitos deletérios desta síndrome sobre a fertilidade feminina (ASHKENAZI et al., 1995; LUDWIG et al., 1999; SENGOKU; TAMATE, 1997; MIYARA, 2003). Tanto o comprometimento endometrial, como o, da qualidade oocitária poderiam estar envolvidos na gênese das supostas maiores taxas de abortamento, relatadas por alguns autores. O comprometimento da qualidade oocitária, por sua vez, poderia produzir a redução das taxas de fertilização observadas nestas pacientes.

Dispomos de diferentes metodologias destinadas à avaliação da qualidade oocitária. Tal avaliação pode ser realizada fisiologicamente, por meio da análise de marcadores biológicos, ou morfologicamente, de forma não-invasiva e invasiva.

A avaliação da qualidade oocitária por meio da análise da sua fisiologia apenas tem sido realizada em estudos experimentais, geralmente utilizando modelos animais e não apresentando aplicabilidade clínica até o momento.

A metodologia mais utilizada na prática clínica consiste na avaliação morfológica não-invasiva com microscopia óptica, que, geralmente, utiliza como critérios a análise de alterações na forma dos oócitos em metáfase II (M II), a coloração, a presença de granulações e homogeneidade do citoplasma, o tamanho do espaço perivitelínico (XIA, 1997), a presença de inclusões citoplasmáticas (BEDFORD; KIM, 1993; KIM et al., 1993; SERHAL et al., 1997) e a morfologia do primeiro corpúsculo polar e da zona pelúcida (EBNER et al., 1999, KAHRAMAN et al., 2000, XIA, 1997). Contudo, não há evidências de boa correlação entre a avaliação morfológica oocitária por meio da utilização destes critérios e a capacidade desenvolvimental oocitária. Recentemente, tem-se utilizado uma outra metodologia

morfológica não invasiva com a finalidade de avaliar a qualidade oocitária, denominada microscopia de polarização (LIU et al., 2000; WANG, W. et al., 2001; MOON et al., 2003; NAVARRO et al., 2005). Este método permite a visualização e análise dinâmica de estruturas celulares macromoleculares birrefringentes, como o fuso meiótico e a zona pelúcida oocitários. Contudo, a escassez de dados disponíveis não permite a larga utilização desta metodologia como método generalizado de rastreamento.

Dispomos de diferentes metodologias invasivas destinadas à avaliação morfológica oocitária, que, apesar de permitirem um adequado detalhamento das estruturas analisadas, requerem a fixação e a coloração oocitárias para análise, impossibilitando a utilização clínica do material estudado. O oócito pode ser avaliado, qualitativamente, por meio da análise imunocitoquímica por imunofluorescência, tanto da organização microtubular, como das configurações de DNA (MIYARA et al., 2003), usando-se microscópios convencionais ou confocais. Também se pode realizar a microinjeção de sondas no interior do oócito com o objetivo de se detectar alguns componentes estruturais menos acessíveis, como a gama-tubulina no centrômero, ou para se realizar a análise da função de proteínas específicas. Na investigação de anormalidades cromossômicas numéricas, podemos lançar mão da hibridização genômica comparativa (HGC) ou da hibridização por fluorescência i*n situ* (FISH) (FRAGOULI et al., 2006; GUTIÉRREZ-MATEO et al., 2004). Associada à análise por imunocitoquímica estática, a detecção da dinâmica citoesquelética em oócitos vivos pode ser realizada usando-se resgate fluorescente após fotobranqueamento (FRAP) ou citoquímica ativada por fluorescência. (FAUSER, 1999).

A qualidade oocitária é decorrente de fatores correlacionados às competências nuclear e citoplasmática. A maturação do oócito é um processo chave para os eventos subsequentes do desenvolvimento e envolve mecanismos complexos e distintos, embora interligados, denominados maturação nuclear e maturação citoplasmática. A competência

citoplasmática é responsável pela capacidade do oócito de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, abrangendo toda a reorganização das organelas, acúmulo de RNAm, proteínas e fatores de transcrição que atuam tanto no processo global de maturação, quanto na fertilização, ativação do genoma embrionário e embriogênese inicial (DUCIBELLA et al., 1990, 1993, 1994; YOSHIDA et al., 1993; SCHULTZ; KOPF, 1995; CONNORS et al., 1998; CHAMOW; HEDRICK, 1986; NAVARA et al., 1995). Assim, subdividimos, didaticamente, a maturação citoplasmática em: 1) Redistribuição das organelas; 2) Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e 3) Maturação molecular. Análises ultra-estruturais revelam que as mitocôndrias, os ribossomos, o retículo endoplasmático, os grânulos corticais e o complexo de Golgi assumem posições diferentes daquelas observadas no estádio de vesícula germinativa, ao atingir o estádio de metáfase II.

A competência nuclear é caracterizada pela qualidade da cromatina e do fuso oocitário (MATTSON; ALBERTINI, 1990; ALBERTINI, 1992), que é essencialmente regulada pela atividade do Fator Promotor de Metáfase (FPM) (HASHIMOTO; KISHIMOTO, 1988; VERDE et al., 1990, 1992) e pela Quinase Ativadora de Mitogênese (MAP-K) (SUN et al., 1999). O FPM regula direta ou indiretamente todos os processos ligados à entrada na metáfase de células eucarióticas, assim como a quebra do envelope nuclear (OOKATA et al., 1992), a fosforilação da histona (COLLAS, 1999) e a polimerização de microtúbulos (CHARRASSE et al., 2000). A MAP-K age na regulação dos eventos do ciclo celular nos oócitos de mamíferos que não têm relação com o FPM, evitando microtúbulos e cromatina de entrar em configuração interfásica, sendo ativado após a quebra da vesícula germinal (SUN et al., 1999).

O fuso meiótico de oócitos humanos em metáfase II (MII) é uma estrutura temporária, dinâmica, composta por microtúbulos, que está associada com o córtex oocitário e sua rede de microfilamentos subcorticais (WANG; KEEFE, 2002). Os microtúbulos são

constituídos por unidades heterodiméricas de alfa(α) e beta(ß)-tubulina, capazes de rápida polimerização e despolimerização, compondo 13 protofilamentos arranjados lado a lado para formar uma parede cilíndrica. A tubulina polimerizada, contudo, está em equilíbrio com a reserva de tubulina do ooplasma. Os microtúbulos do fuso estão ligados aos cinetócoros dos cromossomos (MANDELBAUM et al., 2004) e, por isso, participam da segregação durante a meiose (WANG; KEEFE, 2002). Os microfilamentos, por sua vez, controlam os movimentos do citoplasma, incluindo a divisão celular (KIM et al., 1998). Desta forma, a fecundação normal e o desenvolvimento embrionário dependem deste controle.

Um fuso funcionante, essencial em oócitos sadios em MII, garante a fidelidade da segregação cromossômica (DE SANTIS et al., 2005; VOLARCIK et al., 1998; VAN BLERKOM; DAVIS, 2001). O fuso celular oocitário é extremamente sensível à ação de diversos fatores. O envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura (MULLEN et al., 2004; HU et al., 2001), a manipulação oocitária (EICHENLAUB-RITTER et al., 2002), a exposição ambiental a diversos agentes tóxicos (NAVARRO et al., 2004, 2006), entre outros fatores, podem afetar o fuso, causando uma despolimerização da tubulina e o deslocamento de cromossomos do equador metafásico. Qualquer alteração no complemento cromossômico, que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico, poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não-disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, (MANDELBAUM et al., 2004; BATTAGLIA et al., 1996; VAN BLERKOM; HENRY, 1992) comprometendo o desenvolvimento embrionário.

Os estudos que avaliaram de forma não-invasiva a qualidade oocitária em pacientes com SOP, utilizaram a análise de parâmetros como a taxa de oócitos em metáfase II (LUDWIG et al., 1999; ABOULGHAR et al., 1997) e a análise da morfologia do complexo *cumulus*-oócitos (TANBO et al., 1990; KODAMA et al., 1995; TARLATZIS et al., 1995).

Contudo, pela fraca correlação destes parâmetros com o desenvolvimento embrionário subseqüente, e, conseqüentemente, com o prognóstico da gestação, supomos que estes critérios não sejam adequados preditores da real qualidade oocitária (FAUSER, 1999). Entretanto, não dispomos de estudos que tenham avaliado a qualidade oocitária em portadoras de SOP por meio da análise de critérios morfológicos mais objetivos e, potencialmente, capazes de predizer a real capacidade desenvolvimental oocitária.

Apesar de controversos, os dados existentes sugerem a ocorrência de menores taxas de fertilização e maiores taxas de abortamento após a realização de procedimentos de reprodução assistida em pacientes com SOP, o que poderia ser decorrente, entre outros fatores, da inadequada qualidade oocitária e, consequetemente, embrionária em mulheres portadoras desta síndrome. Sabe-se que para o oócito maduro estar preparado para a fertilização, é necessário que o fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de desenvolvimento oocitário, mantenha a sua integridade e funcionabilidade. Desta forma, anomalias no fuso celular e/ou configuração cromossômica oocitária poderiam cursar com falha ou redução das taxas de fertilização e aumento da ocorrência de abortamento espontâneo, passíveis de estarem relacionadas a este suposto comprometimento da qualidade oocitária em portadoras de SOP. Contudo, até o presente momento, não dispomos de estudos que tenham avaliado o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos de mulheres inférteis com SOP, comparando-os aos de grupos controle, nos quais a qualidade oocitária supostamente preservada, não sendo uma variável relacionada ao comprometimento da fertilidade (como o caso dos fatores masculino e/ou tubário de infertilidade).

A utilização de oócitos humanos maduros para pesquisa provenientes de ciclos estimulados para ICSI, acarretaria custos e riscos para a paciente e se depararia com a grande dificuldade de doação e a conseqüente escassez de material. Por isso, optamos por utilizar oócitos imaturos obtidos após captação ovariana em ciclos estimulados com gonadotrofinas

endógenas, não utilizados na prática clínica, e maturá-los *in vitro* previamente à análise morfológica do fuso celular e distribuição cromossômica.

JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO E HIPÓTESE

Sabe-se que a SOMP acomete cerca de 22% da população geral (ADAMS et al., 1985) e que a infertilidade observada nestas mulheres decorre, sobretudo, da anovulação crônica. Apesar de controverso, alguns autores relatam menores taxas de fertilização e maior incidência de abortamentos após a realização de TRA neste grupo de pacientes. Questionam-se os papéis do comprometimento da receptividade endometrial e da qualidade oocitária na gênese dos efeitos deletérios da SOP sobre a fertilidade feminina. Postula-se que as concentrações elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, ao interferir na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de má qualidade. É possível que outras alterações endócrinas e metabólicas proporcionadas por esta síndrome, também possam estar relacionadas ao comprometimento da qualidade oocitária, o que precisa ser elucidado. Desta forma, há evidências de que a qualidade oocitária e, conseqüentemente, a qualidade embrionária, potencialmente atingida pela gama de alterações endócrinas e metabólicas proporcionadas por esta síndrome, seriam importantes responsáveis por esses índices de insucesso.

Sabe-se que para o oócito maduro estar preparado para a fertilização, é necessário que o fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de maturação e ativação oocitárias, mantenha a sua integridade e funcionabilidade. A avaliação da qualidade oocitária por meio do estudo morfológico da organização e distribuição estrutural do fuso meiótico, responsável

pela organização do conteúdo nuclear e também pela divisão celular oocitária, é um método simples e com boa reprodutibilidade. Assim, hipotetizamos que um dos possíveis fatores relacionados à sugerida piora da qualidade oocitária em pacientes com SOP possa ser a maior incidência de anomalias meióticas, o que, se confirmado, ajudaria a esclarecer os possíveis fatores responsáveis por uma menor taxa de fertilização e uma maior freqüência de abortamentos entre as portadoras de SOP.

A utilização de oócitos humanos maduros para pesquisa, provenientes de ciclos estimulados para ICSI, acarretaria custos e riscos para a paciente e se depararia com a grande dificuldade de doação e a conseqüente escassez de material. Por isso, optamos por utilizar oócitos imaturos obtidos após captação ovariana em ciclos estimulados com gonadotrofinas endógenas, não utilizados na prática clínica, e maturá-los *in vitro* previamente à análise morfológica do fuso celular e distribuição cromossômica.

Assim, no presente estudo-piloto, nós propomos avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com SOP e fatores masculino e/ou tubário de infertilidade, apresentando os dados preliminares obtidos e o cálculo do número amostral necessário para suportar os dados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a associação potencial entre Síndrome dos Ovários Policísticos e anomalias morfológicas do fuso meiótico e da distribuição cromossômica de oócitos humanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados, de mulheres inférteis com SOP e com fatores de infertilidade masculina e/ou tubário (grupo controle).

2.2.2 Calcular o número de amostras necessário para que os resultados obtidos no presente estudo possam ter significância estatística, considerando-se um poder de 80% e um nível de significância (β) de 5%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e pacientes

Este estudo foi conduzido prospectivamente no laboratório do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP no período de abril de 2006 a agosto de 2007 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clinicas. 74 mulheres inférteis que concordaram em participar da pesquisa através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO A**) foram submetidas a ciclos estimulados para captação de oócitos inseminados por Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI). Estas pacientes foram selecionadas prospectivamente e consecutivamente e divididas em:

- Grupo de estudo (portadoras de SOP) onde foram incluídas pacientes com idade inferior a 38 anos, índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m^2, valor de FSH basal menor que 10mUI/ml e sem resistência insulínica avaliada pelo índice de QUICKI (análise logarítimica da razão entre glicemia em mg/dl e insulinemia em pmol/l, sendo valores superiores a 0,34 considerados normais). O diagnóstico de SOP foi baseado nos critérios utilizados pelo consenso revisto de Rotterdam (2003) (dois dentre os três seguintes critérios: oligo ou amenorréia, sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ovários policísticos a ultrassonografia que seriam 12 ou mais folículos com até 9mm e/ou volume de pelo menos um ovário superior a 10 cm^3, excluindo-se outras causas de hiperandrogenismo);
- Grupo controle (portadores de fator masculino e/ou tubário, excluindo hidrossalpinge), onde foram incluídas pacientes com idade inferior a 38 anos, índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m^2 e valor de FSH basal menor que

10mUI/ml, que tenham realizado laparoscopia diagnóstica para a exclusão de demais causas de infertilidade.

A seleção das pacientes e do material de estudo das mesmas está representada no diagrama abaixo (**Figura 1**).

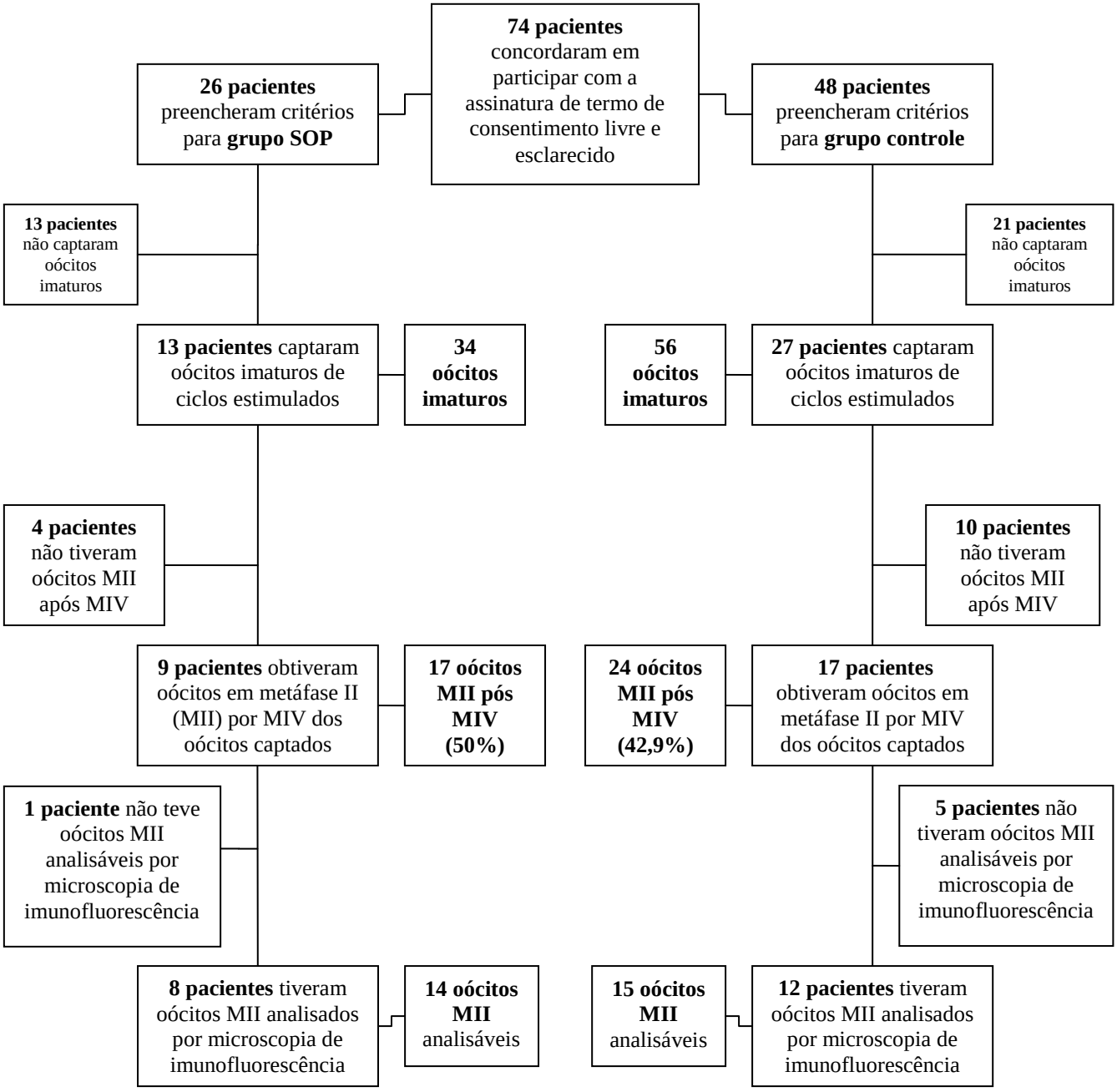


Figura 1 – Fluxograma de pacientes participantes e do respectivo material utilizado no projeto de pesquisa

A caracterização das pacientes dos grupos de estudo (SOP) e controle quanto à idade, índice de massa corporal e FSH basal está representada na **Tabela 1.** Os grupos foram considerados homogêneos segundo estas variáveis.

Tabela 1 - Caracterização das pacientes, que apresentaram oócitos analisados, dos grupos de estudo (SOP) e controle quanto à idade, índice de massa corporal e FSH basal.

Variável	**Grupo SOP**	**Grupo controle**
Número de pacientes	8	12
Mediana da Idade (anos)	33 (28 a 37)	35 (24 a 38)
Índice de Massa Corporal (Kg/m^2)*	24,5 ± 3,9	23,6 ± 3,1
*FSH basal (mUI/ml)**	5,4 ± 2,5	4,75 ± 2,0

NOTA - * Valores expressos em média + Desvio-Padrão
SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos.

3.2 Métodos

Os oócitos macroscopicamente MII (caracterizados pela extrusão do primeiro corpúsculo polar por microscopia ótica) após MIV tiveram seu fuso meiótico e sua distribuição cromossômica analisadas por microscopia de imunofluorescência conforme protocolo descrito a seguir:

3.2.1 Protocolo de Estimulação:

A programação da menstruação para o início do ciclo de estimulação ovariana controlada foi realizada pela administração de anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciada no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana, suspendendo esta administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincida com a realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal para se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que possam interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular.

O bloqueio hipofisário com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) foi iniciado 10 dias antes do dia de realização da USTV basal (protocolo longo), no período vespertino, por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil) na dose de 0,5mg/dia (10 UI), por via subcutânea, mantida durante todo o período de estimulação ovariana controlada até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada, entre o segundo e o quarto dia do ciclo menstrual. As pacientes receberam 150 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), via intramuscular (IM), nos primeiros 6 dias da indução. A partir do sétimo dia da indução da ovulação, a dose foi ajustada ou introduziu-se HMG purificada (Menopur®, Serono, Brasil) na dose de 150 UI/dia de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foi administrada 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi feita com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Enila, Brasil) por via oral na dose de 200mg, três vezes ao dia, a partir do dia da captação oocitária e mantida até a décima segunda semana da gestação, nas pacientes que engravidaram.

3.2.2 Captação Oocitária:

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil), associado ao citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples padrão, com 300mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bizel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para uma maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra).

Todo o manuseio dos oócitos foi realizado sob capela de fluxo laminar (Veco Modelo HLFS 12), com a finalidade de manter o meio estéril.

Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus, o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C. Depois de identificados, os complexos oócito-cumulus foram isolados do fluido folicular (FF) e lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific) suplementado com 10% Soro Sintético Substituto (SSS) previamente equilibrado à 37ºC, para a remoção de sangue e debris. A seguir foram

colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio de cultura HTF-SSS e cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich), e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%) por um período de 2 a 4 horas. Após este período, para realizarmos a remoção do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*, os complexos oócito-cumulus foram colocados em micro-gotas de 25µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific), por 30 segundos e, então, lavados 2 ou 3 vezes com o meio HTF-SSS. A remoção mecânica das células da granulosa foi feita com o auxílio de uma pipeta Stripper (130µm - Denuding Pipette, Cook).

Imediatamente após a realização do desnudamento oocitário, realizamos a análise morfológica para identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao microscópio de luz.

Os oócitos que atingiram a Metáfase II (MII - caracterizada morfologicamente pela presença de 1 corpúsculo polar (CP) extruso) foram considerados maduros e incubados em gotas de 25 µL de HTF + SSS 10% por 1 a 2 horas, para, então, serem inseminados por meio da realização da ICSI.

Os oócitos que estavam em estágio de Vesícula Germinativa (VG) (ausência de CP extruso e presença de VG) ou de Metáfase I (MI) (ausência do CP e da VG) foram considerados imaturos, e, portanto, sem utilidade clínica para a realização de ICSI, sendo submetidos à Maturação *In Vitro* (MIV), para utilização no presente estudo, conforme descrito a seguir.

Os oócitos que apresentaram sinais de danos mecânicos ou sinais de atresia (citoplasma irregular, escuro ou granulado) foram descartados.

3.2.3 Maturação in vitro:

Os oócitos imaturos são, então, imediatamente transferidos para as placas de cultivo, colocados em micro-gotas de 50 µL do meio HTF + SSS 10%, e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%), por período previamente definido. Os oócitos no estágio de vesícula germinativa são mantidos nestas condições de cultivo por um período de 19 horas + ou – 1 hora e aqueles em metáfase I, por 4 horas + ou – 30 minutos de acordo com curva de maturação previamente estabelecida neste serviço, utilizando os meios e condições de cultura descritos previamente, onde 36 oócitos em Metáfase I foram submetidos a MIV após ciclo estimulado com taxa de maturação de 83% e tempo de maturação entre 210 e 420 minutos com mediana de 240 minutos (4 horas) e 28 oócitos em VG com taxa de maturação de 71% e tempo de maturação entre 18 e 24 horas com mediana de 19 horas (**APÊNDICE A**). Após este período pré-estabelecido de cultivo, foi realizada novamente a análise do grau de maturação oocitária, sendo que os oócitos que atingiram MII são fixados para a análise por microscopia de imunofluorescência para identificação do fuso celular e distribuição cromossômica. Os oócitos que não atingiram a metáfase II após o período descrito, assim como os que degeneraram, foram descartados.

3.2.4 Microscopia de imunofluorescência para visualização do fuso meiótico e da distribuição cromossômica:

Os oócitos maturados *in vitro* são fixados e corados para microscopia de fluorescência, conforme previamente descrito (ALLWORTH; ALBERTINI, 1993). Na preparação para a imunofluorescência, o fixador MTSB XF, composto por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de Cloreto de Magnésio Hexahidratado e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Apronitina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 μM de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ) foi aquecido a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram fixados a 37°C por 30 minutos e lavados 4 vezes em solução tampão de lavagem (15 minutos cada) composta por 0,02% de NaN_3, 0,01% de Triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de Soro Normal de Cabra, 0,1M de Glicina, 2% de BSA(V) e PBS, onde ficaram por 2 horas a 37°C. Após esse período, os oócitos foram lavados 1 vez na solução tampão de lavagem para incubação com o anticorpo primário (beta-tubulina de camundongo, diluição 1:1000 em solução de PBS com 0,02% de NaN_3 e 0,1% de BSA(V)) por 4 h a 37°C. Em seguida, foram lavados mais 3 vezes (15 min cada) e incubados com o anticorpo secundário (Imunoglobulina de cabra anti-camundongo FITC-conjugada, Zymed Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:200 na mesma solução de diluição acima descrita) por 2 horas a 37°C. Após mais três lavagens de 15 min cada, os oócitos foram corados com Hoechst 33342 em meio suporte por 10 min a temperatura ambiente, montados entre lâmina e lamínula, estocados a 4°C e mantidos no escuro até observação em Microscópio de Imunofluorescência (Zeiss Axiovert 100TV), realizada dentro de 1 semana do preparo da lâmina.

3.2.5 Análise morfológica do fuso meiótico e da distribuição cromossômica do oócito em Metáfase II:

O fuso meiótico foi considerado normal quando apresentou a forma de barril e estava disposto em posição centrípeta em relação ao corpúsculo polar. Os cromossomos apresentaram distribuição normal quando estavam reunidos na placa metafásica e bem alinhados no equador do fuso celular oocitário (**Figuras 2a e 2b**).

Consideramos como telófase I, os oócitos que apresentaram fuso celular alongado e perpendicular à membrana oocitária, com cromossomos distribuídos nas suas extremidades. Foi considerada ativação partenogenética aqueles que apresentavam extrusão do segundo corpúsculo polar (**Figura 2d**).

Se os cromossomos apresentavam-se dispersos, desalinhados ou fragmentados, se a cromatina feminina encontrava-se aglomerada com microtúbulos interfásicos, se o formato do fuso não estava normal (forma de barril), ou se o mesmo apresentava ruptura, este foi considerado anormal (**Figura 2c**).

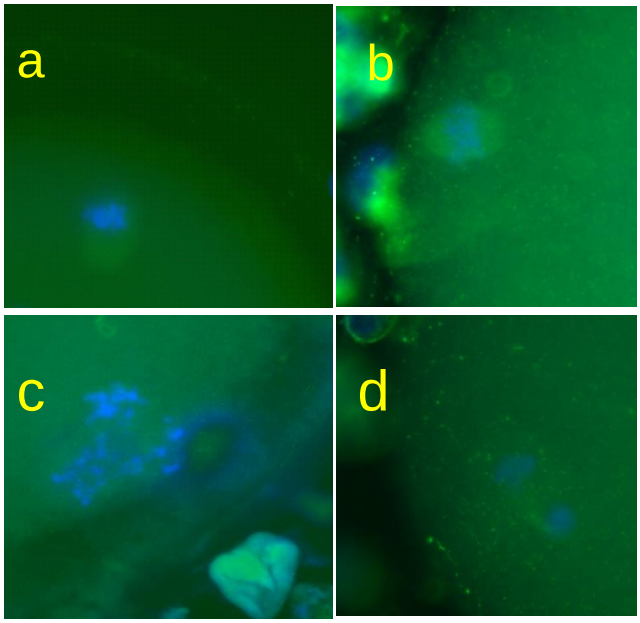


Figura 2 - Imagens representativas de fusos e cromossomos de oócitos de portadoras de SOP e controle por microscopia de imunofluorescência. Fusos meióticos em metáfase II foram corados por anticorpo anti-b-tubulina e cromossomos corados por Hoechst 33342. **a** e **b**) Oócitos de pacientes controle com fusos meióticos normais e cromossomos alinhados na placa metafásica do fuso; **c**) Oócito de paciente portadora de SOP com ruptura de fuso meiótico e istribuição cromossômica anormal; **d**) Oócito de paciente controle que sofreu ativação partenogenética.

3.3 Análise estatística:

A comparação entre a proporção de anormalidades do fuso celular e distribuição cromossômica oocitários entre os dois grupos estudados foi realizada pelo teste exato de Fisher. O grau de significância (alpha) foi definido em 0,05 (bicaudal), sendo o valor de $p<0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Para a determinação do tamanho do número de amostras necessário para que a diferença obtida entre as proporções de anormalidades meióticas no grupo de estudo e no grupo controle seja estatisticamente comprovada utilizamos teste de hipótese bicaudal para 2 proporções com um poder de teste de 80% e um nível de significância (β) de 5%, preconizado pela Organização Mundial de Saúde (LWANGA; LEMESHOW, 1991).

4 RESULTADOS

4.1 Taxas de Maturação *In Vitro* (MIV) entre as pacientes dos grupos SOP e controle

Segundo classificação de maturidade oocitária realizada por microscopia óptica, no grupo de estudo, dos 34 oócitos imaturos submetidos a MIV, 17 oócitos atingiram a metáfase II (taxa de MIV de 50%). Dos 56 oócitos imaturos submetidos a MIV no grupo controle, 24 oócitos atingiram a MII (taxa de MIV de 42,8%).

Não observamos diferença significativa nas taxas de MIV (utilizando como critério a extrusão do primeiro corpúsculo polar, observada por microscopia óptica) entre os dois grupos avaliados (50% e 42,8%, respectivamente, para os grupos SOP e controle) (Tabela 2).

Na análise por microscopia de imunofluorescência, detectaram-se 3 e 2 oócitos, respectivamente, no grupo de estudo e no grupo controle, em estágio de Telófase I e 3 oócitos ativados partenogeneticamente no grupo controle (Figura 3), ou seja, não em metáfase II, como classificado pela microscopia óptica. Ocorreu a impossibilidade de análise de 4 oócitos do grupo controle em virtude de dificuldades técnicas durante o processo de imunocoloração, o que impossibilita o cálculo adequado da taxa de MIV neste grupo, segundo a classificação pela microscopia de imunofluorescência. Desta forma, foram analisados por microscopia de imunofluorescência, respectivamente, 14 oócitos em MII de 8 pacientes do grupo de estudo (taxa de MIV de 41,2%; 14 MII/34 oócitos imaturos) e 15 oócitos MII de 12 pacientes do grupo controle (Figura 3). A respectiva análise de cada oócito está descrita no APÊNDICE B e APÊNDICE C.

Tabela 2 – Taxa de maturação *in vitro*, segundo análise por microscopia óptica, nos grupos SOP e Controle.

Oócitos	Grupo SOP		Grupo Controle	
	Número	%	Número	%
Imaturos submetidos a MIV	34	100	56	100
MII provenientes de MIV	17	50,0*	24	42,9*

NOTA: MII – Oócito em estágio de metáfase II; MIV – Maturação *In Vitro*; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo). ***** Valor de p = 0,522 (sem significância estatística)

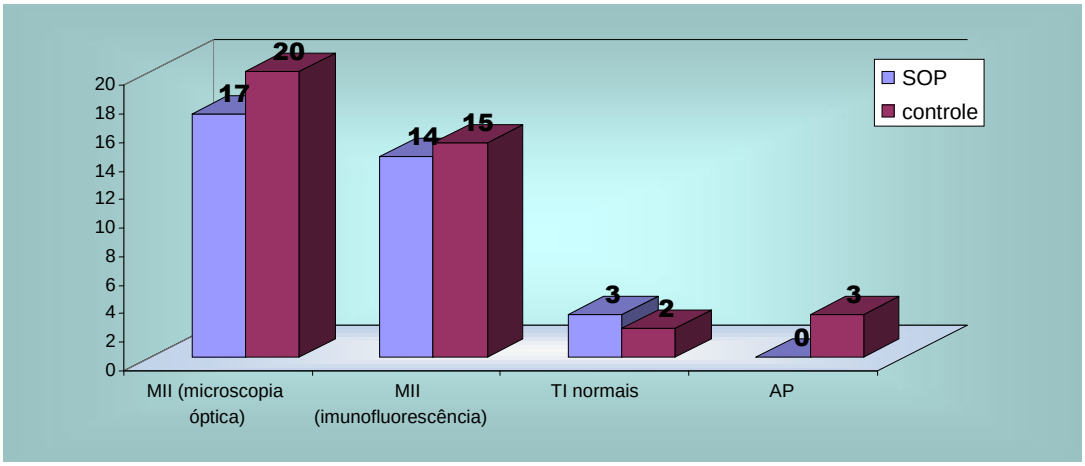


Figura 3 -Distribuição dos oócitos em metáfase II,segundo classificação por microscopia óptica, após Maturação *In Vitro*, analisados por microscopia de imunofluorescência, entre portadoras de SOP e controle.
Nota - MII – Oócito em estágio de metáfase II; TI – Telófase I; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo). *Valor de p = 0,70 (sem significância estatística)

4.2 Análise do fuso meiótico e distribuição cromossômica dos oócitos em metáfase II, após MIV, nos grupos SOP e controle.

No grupo de estudo, dos 14 oócitos MII analisados, foram observados 6 oócitos em metáfase II (MII) normais (42,9%) e 8 MII anormais (57,1%). No grupo controle, dos 15

oócitos MII analisados, foram observados 8 MII normais (53,3%) e 7 MII anormais (46,7%) **(Tabela 4).** Não houve diferença significativa nas proporções de anomalias meióticas entre os grupos SOP e controle (57,1 e 46,7%, respectivamente).

Tabela 4 – Distribuição dos oócitos em metáfase II após Maturação *In Vitro* entre portadoras de SOP e controle quanto à normalidade meiótica.

Oócitos	Grupo SOP		Grupo Controle	
	Número	%	Número	%
MII analisáveis após MIV	14	100	15	100
MII normais	6	42,9*	8	53,3*
MII anormais	8	57,1*	7	46,7*

NOTA: MII – Oócito em estágio de metáfase II; MIV – Maturação *In Vitro*; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo). *Valor de p = 0,71 (sem significância estatística)

4.3 Cálculo do tamanho amostral

O tamanho de amostras necessário para que a diferença de 10,4% obtida entre as proporções de anormalidades meióticas do grupo de estudo (pacientes portadoras de SOP) e do grupo controle, respectivamente 57,1% e 46,7%, seja estatisticamente significativa, baseado em um teste de hipótese bicaudal, com um poder de 80% e um nível de significância (β) de 5%, é de 322 para cada grupo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro na literatura que avaliou as proporções de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, comparando-as aos de mulheres com fatores tubário e/ou feminino de infertilidade. Os dados preliminares do presente estudo não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes dois grupos estudados. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas nos oócitos de mulheres com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se confirmados, os referidos achados poderão contribuir para a elucidação de um dos mecanismos envolvidos na sugerida piora da qualidade oocitária em portadoras desta afecção, quando submetidas à estimulação ovariana para a realização de TRA de alta complexidade. Um estudo publicado recentemente (WOOD et al., 2007), utilizando análise comparativa da expressão gênica oocitária (*microarrays analysis),* de portadoras de SOP e mulheres normo-ovulatórias, evidenciou diferenças nos perfis de expressão gênica entre estes dois grupos avaliados. Estes autores sugeriram que esta expressão gênica alterada poderia culminar com defeitos na meiose ou desenvolvimento embrionário inicial, contribuindo para a reduzida competência desenvolvimental observada em oócitos de mulheres com SOP. Se confirmada a tendência observada no nosso estudo de maior proporção de anomalias meióticas nos oócitos de mulheres com SOP, poderemos elaborar uma relação entre a expressão gênica alterada descrita por Wood et al. (2007) e os potenciais danos meióticos oocitários em fuso celular e/ou distribuição cromossômica neste grupo.

A imensa escassez de oócitos humanos maduros disponíveis e passíveis de serem doados para a realização de pesquisas utilizando metodologias invasivas, que inviabilizam o uso clínico do referido material, como é o caso da microscopia de imunofluorescência, justificou a utilização, no presente estudo, de oócitos imaturos, obtidos em ciclos estimulados por gonadotrofinas para a realização de ICSI, que atingissem a metáfase II após a realização

de maturação *in vitro*. Todavia, as baixas proporções de oócitos imaturos obtidos em ciclos estimulados, bem como a necessidade de que sofressem MIV (taxas de MIV de 50% e 42,9%, respectivamente, nos grupos SOP e controle), dificultou a obtenção de oócitos maturados *in vitro*, justificando a pequena casuística obtida após dezessete meses de inclusão de pacientes elegíveis para participarem do presente estudo. Não encontramos na literatura estudos que tenham utilizado o mesmo meio de cultivo usado no presente estudo. Contudo, Ebner et al. (2006), avaliaram a maturação *in vitro* em meio de cultura BM1 (Biomedical Medium stage one, NMS Biomedical, Praroman, Suíça), com condições de cultivo similares às empregadas no nosso estudo, de 75 oócitos em ciclos estimulados, demonstrando taxa de maturação de 44,7%, semelhante à taxa observada no nosso grupo controle. É importante ressaltar que a heterogeneidade nos resultados das taxas de maturação não depende unicamente do meio e das condições de cultivo utilizadas, mas também, das diferenças intrínsicas entre oócitos captados de folículos de tamanhos diferentes, que podem variar a sua capacidade evolutiva devido ao crescimento anormal ou incompleto (COMBELLES et al., 2002).

Existem evidências na literatura que suportam que não só a resistência insulínica (PALOMBA et al., 2005; STADTMAUER et al., 2001) como a obesidade (WANG, J. et al., 2001; FEDORCSÁK et al., 2001), quando presentes nas pacientes portadoras de SOP, poderiam afetar a qualidade do oócito e, conseqüentemente, influenciar os resultados das TRA, reduzindo as taxas de fertilização e elevando os índices de abortamento (HEIJNEN et al., 2006; LUDWIG et al., 1999). Todavia o hiperandrogenismo intra-ovariano, principal suspeito da captura e excesso foliculares (JONARD; DEWAILLY, 2004), característico da SOP, parece ser também decorrente da produção androgênica pelas células da teca por uma via independente de insulina (DIAMANTI-KANDARAKIS; PAPAVASSILIOU, 2006). Ainda não existe uma hipótese formada de como tais alterações endócrinas e metabólicas poderiam interferirir no processo de maturação e qualidade oocitárias, mas um microambiente

folicular composto por substâncias como Hormônio Anti-Mulleriano (AMH), insulina, IGF-1, fatores de crescimento, citocinas, agentes oxidantes entre outros, em quantidades sub ou supra-fisiológicas poderiam, hipoteticamente, agir via interações folículo-folículo (JONARD; DEWAILLY, 2004) e granulosa-oócito (GOSDEN, 2002), afetando a dinâmica microtubular e o aparelho meiótico (LAROSA; DOWNS, 2006; ZHANG et al., 2006; LUBERDA, 2005).

Sabe-se que o fuso celular oocitário é uma estrutura celular altamente dinâmica e extremamente sensível à ação de diversos fatores, como o envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura, a manipulação oocitária, a exposição ambiental a diversos agentes tóxicos, entre outros (MULLEN et al., 2004; HU et al., 2001; NAVARRO et al., 2004; EICHENLAUB-RITTER et al., 2002). Tais fatores podem afetar o fuso, causando uma despolimerização da tubulina e o deslocamento de cromossomos do equador metafásico, gerando anomalias meióticas. Alguns autores evidenciaram que o tempo de cultivo, após a maturação nuclear estar completa, poderia promover o envelhecimento oocitário metafásico, que também seria um dos fatores relacionados ao aumento da incidência de anormalidades meióticas (LIU; KEEFE, 2002), o que justificou a realização de uma curva-padrão de MIV (**APÊNDICE A**), no sentido de estabelecermos o tempo médio de cultivo, nas condições e meio de cultura utilizados no presente estudo, no qual a maioria dos oócitos atingiria a metáfase II. Desta forma, apenas os oócitos imaturos que atingiram a metáfase II após o tempo de cultivo pré-definido (19 +/- 1 hora e 4 +/- 0,5 hora, respectivamente para oócitos em estágio de vesícula germinativa e metáfase I), foram utilizados e analisados no presente estudo.

Ressaltamos que os nossos dados evidenciaram um elevado percentual de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, tanto no grupo controle (46,7%), como no grupo de estudo (57,1%). Não dispomos de dados na

literatura avaliando a incidência de anomalias meióticas em oócitos humanos, maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.

Alguns autores realizando análise citogenética de oócitos em metáfase II, não fertilizados após a realização de fertilização *in vitro* convencional (FIV), não observaram diferença entre a incidência de aneuploidias, diploidias e cromossomos prematuramente condensados quando compararam pacientes com SOP (24,6 % de anormalidades) e com infertilidade secundária a fator tubário (27% de anomalias cromossômicas) (SENGOKU; TAMATE, 1997). Apesar da incidência de anomalias cromossômicas oocitárias nas portadoras de SOP encontrada por Sengoku e Tamate (1997) (24,6 %) ser inferior à observada no nosso estudo (57,1%), ressaltamos que, tanto o material utilizado quanto a metodologia empregada foram distintos, impossibilitando a adequada comparação dos dados obtidos. A não realização da análise do fuso meiótico oocitário pode ter resultado na subestimativa da proporção de anomalias meióticas, o que precisa ser avaliado melhor.

Encontramos um único estudo publicado avaliando a incidência de anomalias do fuso meiótico e configuração cromossômica em oócitos humanos maturados *in vitro*, obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas, evidenciando, respectivamente, 43,7% e 33,3% de anormalidades (LI et al., 2006). Todavia, estes oócitos analisados foram obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas. Como se postula um potencial papel deletério da estimulação ovariana com gonadotrofinas, na dinâmica do citoesqueleto e competência oocitária (LEE et al., 2007), é possível que a incidência de anomalias meióticas seja maior em oócitos maturados *in vitro* em ciclos estimulados do que naqueles não estimulados, o que precisa ser mais bem avaliado por meio de estudos utilizando metodologia pertinente. Este mesmo estudo comparou a incidência de anormalidades meióticas entre os oócitos maturados *in vitro*, oriundos de ciclos não estimulados, com os maturados *in vivo*, obtidos em ciclos estimulados, objetivando determinar a possível influência da MIV no fuso meiótico e

distribuição cromossômica oocitária de pacientes com SOP. Detectou-se uma proporção significativamente maior de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro,* sugerindo que a MIV tenha um efeito deletério sobre a organização do fuso celular e o alinhamento cromossômico oocitário. Desta forma, é provável que a incidência de anomalias meióticas obtidas no presente estudo (57,1%), no qual analisamos oócitos maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas, seja superior tanto à observada nos oócitos maturados *in vitro*, utilizados rotineiramente nas TRA, como à evidenciada em oócitos maturados *in vitro*, porém provenientes de ciclos não estimulados (LI et al., 2006). Todavia, como comparamos oócitos de pacientes com SOP com os de pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade (grupo controle), ambos maturados *in vitro,* e encontramos uma tendência a maior incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, estes achados sugerem um possível comprometimento da qualidade oocitária ralacionada à SOP, e não apenas à MIV, o que deverá ser mais bem analisado aumentando a presente casuística. Neste sentido, o cálculo do número amostral necessário para suportar ou afastar a referida tendência a aumento da freqüência de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro*, obtidos em ciclos estimulados de portadoras de SOP, definido a partir da realização do presente estudo piloto, assume importância no sentido de podermos elucidar esta importante questão.

Os dados do presente estudo piloto não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes os oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, quando comparados aos de mulheres com fator tubário e/ou masculino de infertilidade. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, nos oócitos de pacientes com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se forem confirmados, estes achados podem apontar um possível papel destas anormalidades relacionadas à maturação nuclear oocitária, nas

controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida. Se não confirmados, sugerirão o possível envolvimento de fatores relacionados à maturação citoplasmática em detrimento da nuclear na etiopatogênese da piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

6 CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo piloto não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades no fuso meiótico e/ou distribuição cromossômica, entre estes os oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, quando comparados aos de mulheres com fator tubário e/ou masculino de infertilidade.

Contudo, nossos achados sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas, nos oócitos de pacientes com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística, conforme cálculo amostral elaborado a partir dos dados do presente estudo piloto. Se forem confirmados, estes achados podem apontar um possível papel destas anormalidades relacionadas à maturação nuclear oocitária, nas controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida. Se não confirmados, sugerirão o possível envolvimento de fatores relacionados à maturação citoplasmática em detrimento da nuclear na etiopatogênese da piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 1997;68(6):1017-21.

Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HS. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. Lancet 1985;2(8469-70):1375-9.

Albertini DF. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. Mutat Res 1992;296(1-2):57-68.

Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. Dev Biol 1993;158(1):101-12.

Ashkenazi J, Farhi J, Orvieto R, Homburg R, Dekel A, Feldberg D, Ben Rafael Z. Polycystic ovary syndrome patients as oocyte donors: the effect of ovarian stimulation protocol on the implantation rate of the recipient. Fertil Steril 1995;64(3):564-7.

Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. Hum Reprod 1996;11(10):2217-22.

Bedford JM, Kim HH. Sperm/egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in-vitro. Hum Reprod 1993;8(3):453-63.

Chamow SM, Hedrick JL. Subunit structure of a cortical granule lectin involved in the block to polyspermy in Xenopus laevis eggs. FEBS Lett 1986;206(2):353-7.

Charrasse S, Lorca T, Doree M, Larroque C. The Xenopus XMAP215 and its human homologue TOG proteins interact with cyclin B1 to target p34cdc2 to microtubules during mitosis. Exp Cell Res 2000;254(2):249-56.

Collas P. Sequential PKC- and Cdc2-mediated phosphorylation events elicit zebrafish nuclear envelope disassembly. J Cell Sci 1999;112 (6):977-87.

Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2002;17(4):1006-16.

Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. Dev Biol 1998;200(1):103-15.

De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. Reprod Biomed Online 2005;11(1):36-42.

Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Trends Mol Med 2006;12(7):324-32.

Doldi N, Marsiglio E, Destefani A, Gessi A, Merati G, Ferrari A. Elevated serum progesterone on the day of HCG administration in IVF is associated with a higher pregnancy rate in polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 1999;14(3):601-5.

Dor J, Shulman A, Levran D, Ben-Rafael Z, Rudak E, Mashiach S. The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in-vitro fertilization and embryo transfer: a comparison of results with those of patients with tubal infertility. Hum Reprod 1990;5(7):816-8.

Ducibella T, Duffy P, Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. Biol Reprod 1994;50(3):467-73.

Ducibella T, Duffy P, Reindollar R, Su B. Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. Biol Reprod 1990;43(5):870-6.

Ducibella T, Kurasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and bem activator of protein kinase C. Biol Reprod 1993;48(6):1251-7.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Shebl O, Tews G. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development. Hum Reprod 2006;21(11):2972-7.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. Fertil Steril 1999;72(4):599-603.

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

Farquhar C, Vandekerckhove P, Lilford R. Laparoscopic “drilling“ by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev [CD001122]; 2001.

Fauser BCJM. Molecular biology in reproductive medicine. 1ª ed. Nova York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 2001;16(6):1086-91.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. Hum Reprod 2006;21(9):2319-28.

Frank S, Roberts R, Hardy K. Gonadotrofin regimens and oocyte quality in women with polycystic ovarian syndrome. Reprod Biomed Online 2003;6(2):181-4.

Gosden RG. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. Mol Cell Endocrinol 2002;186(2):149-53.

Grochowski D, Kulikowski M, Wolczynski S, Kuczynski W, Szamatowicz M. The outcome of an in vitro fertilization program in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol 1997;11(4):259-62.

Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez MG, Sánchez-García JF, Egozcue J, Navarro J, Munné S. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. Hum Reprod 2004;19(12):2859-68.

Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, Wicks R, Franks S, Winston RM. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. Hum Reprod 1995;10(8):2125-35.

Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. Dev Biol 1988;126(2):242-52.

Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update 2006;12(1):13-21.

Homburg R, Howles CM. Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. Hum Reprod Update 1999;5(5):493-9. Erratum in: Hum Reprod Update 2000;6(1):106.

Homburg R, Levy T, Berkovitz D, Farchi J, Feldberg D, Ashkenazi J, Bem-Rafael Z. Gonadotropin-releasing hormone agonist reduces the miscarriage rate for pregnancies achieved in women with polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 1993;59(3):527-31.

Howles CM, Macnamee MC, Edwards RG, Goswamy R, Steptoe PC. Effect of high tonic levels of luteinising hormone on outcome of in-vitro fertilisation. Lancet 1986;2(8505):521-2.

Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O2 and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. Hum Reprod 2001;16(4):737-48.

Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, Coulson C, Lambert PA, Watt EM, Desai KM. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J (Clin Res Ed) 1985;291:1693–7.

Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. Hum Reprod Update 2004;10(2):107-17.

Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz C, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 2000;15(11):2390-3.

Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. Biol Reprod 1993;48(6):1320-5.

Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. Hum Reprod 1998;13(8):2217-22.

Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y and Tanaka T High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1995;10:1962–1967.

LaRosa C, Downs SM. Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. Biol Reprod 2007;76(3):476-86.

Lee ST, Han HJ, Oh SJ, Lee EJ, Han JY, Lim JM. Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. Mol Reprod Dev 2006;73(8):1022-33.

Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S, Critser JK, Chen ZJ. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. Fertil Steril 2006;85(4):827-32.

Liu L, Keefe DL. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. Hum Reprod 2002;17(10):2678-85.

Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe DL. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. Biol Reprod 2000;63(1):251-8.

Lord JM, Flight IH and Norman RJ Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev [Relatório Nº CD003053] 2003.

Luberda Z. The role of gluthatione in mammalian gametes. Reprod biol 2005;5(1):5-17.

Ludwig M, Finas DF, al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. Hum Reprod 1999;14(2):354-8.

Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Genebra, Organização Mundial de Saúde, 1991.

Mandelbaum J, Anastasiou O, Lèvy R, Guèrin JF, Larouzière V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. Eur J Obst Gyn Rep Biol 2004;113:17-23.

Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. Mol Reprod Dev 1990;25(4):374-83.

Mitwally MF, Casper RF. Use of an aromatase inhibitor for induction of ovulation in patients with an inadequate response to clomiphene citrate. Fertil Steril 2001;75:305–309.

Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, LeMeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P. Multiparameter analysis of human oocytes at Metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. Hum Reprod 2003;18(7):1494-503.

Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. Hum Reprod 2003;18(4):817-20.

Mulders AG, Eijkemans MJ, Imani B, Fauser BC. Prediction of chances for success or complications in gonadotrophin ovulation induction in normogonadotrophic anovulatory infertility. Reprod Biomed Online 2003;7(2):170-8.

Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. Hum Reprod 2004;19(5):1148-54.

Navara CS, Simerly C, Schatten G. Imaging motility during fertilization. Theriogenology 1995;44(8):1099-114.

Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL. Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. Fertil Steril 2006;85 Suppl 1:1187-94.

Navarro PA, Liu L, Trimarchi JR, Ferriani RA, Keefe DL. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. Fertil Steril 2005;83 Suppl 1:1197-205.

Navarro PAAS, Liu L, Keefe DL. *In vivo* effects of arsenite on meiosis, preimplantation development and apoptosis in the mouse. Biol Reprod 2004;70:980-985**.**

Ookata K, Hisanaga S, Okano T, Tachibana K, Kishimoto T. Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. EMBO J 1992;11(5):1763-72.

Palomba S, Falbo A, Orio F Jr, Manguso F, Russo T, Tolino A, Annamaria C, Dale B, Zullo F. A randomized controlled trial evaluating metformin pre-treatment and co-administration in non-obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome treated with controlled ovarian stimulation plus timed intercourse or intrauterine insemination. Hum Reprod 2005;20(10):2879-86.

Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. Lancet 1990;336(8724):1141-4.

Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. Curr Top Dev Biol 1995;30:21-62.

Sengoku K, Tamate K. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1997;12(3):474-7.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997;12(6):1267-70.

Stadtmauer LA, Toma SK, Riehl RM, Talbert LM. Metformin treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insulin-like growth factors. Fertil Steril 2001;75(3):505-9.

Stanger JD, Yovich JL. Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. Br J Obstet Gynaecol 1985;92(4):385-93.

Sun QY, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. Reprod Fertil Dev 1999;11(7-8):443-50.

Tanbo T, Dale PO, Kjekshus E, Haug E, Abyholm T. Stimulation with human menopausal gonadotropin versus follicle-stimulating hormone after pituitary suppression in polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 1990;53(5):798-803.

Tarlatzis BC, Grimbizis G, Pournaropoulos F, Bontis J, Lagos S, Spanos E, Mantalenakis S. The prognostic value of basal luteinizing hormone:follicle-stimulating hormone ratio in the treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by assisted reproduction techniques. Hum Reprod 1995;10(10):2545-9.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004; 81:19–25.

Urman B, Fluker MR, Yuen BH, Fleige-Zahradka BG, Zouves CG, Moon YS. The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. Fertil Steril 1992;57(6):1269-73.

Urman B, Tiras B, Yakin K. Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome. Reprod Biomed Online 2004;8(4):419-30.

Valbuena D, Jasper M, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. Hum Reprod. 1999;14 Suppl 2:107-11.

Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. Hum Peprod 2001;16(4):757-64.

Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. Hum Reprod 1992;7(3):379-90.

Verde F, Dogterom M, Stelzer E, Karsenti E, Leibler S. Controlo f microtubule dynamics and length by cyclin A- and cyclin B-dependent kinases in Xenopus egg extracts. J Cell Biol 1992;118(5):1097-108.

Verde F, Labbe JC, Doree M, Karsenti E. Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of Xenopus eggs. Nature 1990;343(6255):233-8.

Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. Hum Reprod 1998;13(1):154-60.

Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. Hum Reprod 2001;16(12):2606-9.

Wang WH, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among *in vitro* matured human oocytes by spindle imaging with the Polscope. Fertil Steril 2002;78(5):1077-81.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. Hum Reprod 2001;16(7):1464-8.

Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF 3º. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(2):705-13.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod 1997;12(8):1750-5.

Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management. 4ª ed. Filadélfia-Londres: W. B. Sounders company; 1999.

Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. Biol Reprod 1993;49(1):89-94.

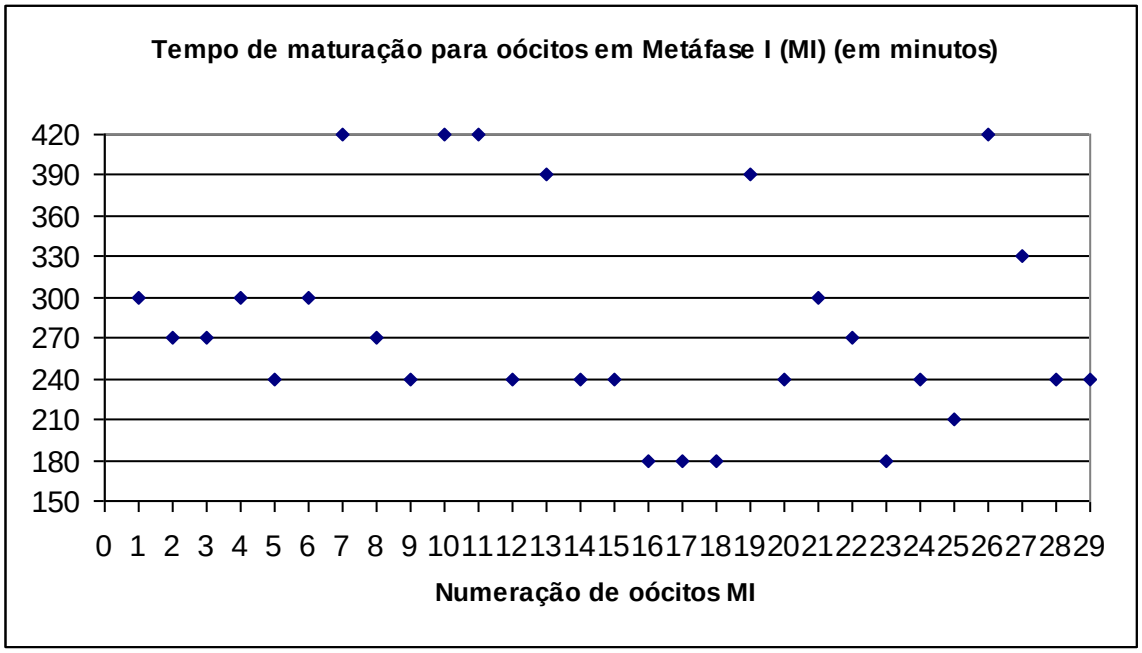
Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma, X. Deficit of mitochondria- derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. Cell Res 2006;16:841-50.

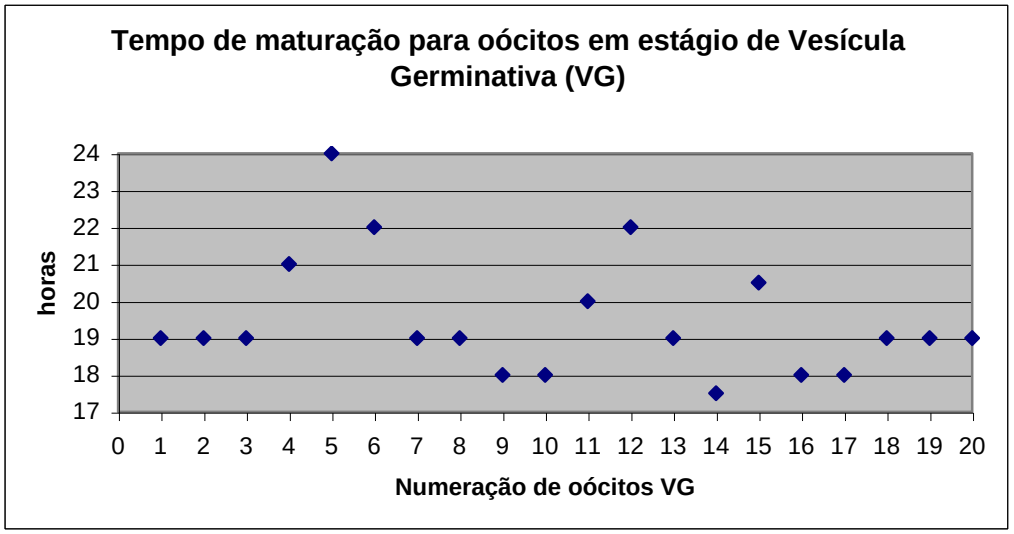
---

* De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References. Vancouver, 2003.
As abreviaturas dos periódicos seguem o *Index Medicus*, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curva de maturação In Vitro





APÊNDICE B - Descrição dos oócitos incluídos na pesquisa do grupo SOP

Oócitos Grupo SOP	paciente	procedência	Após MIV p/ microscopia óptica	Após MIV p/ imunofluorescência	Fuso/ distribuição cromossômica
01	I	VG	MII	MII	anormal
02	II	MI	MII	MII	normal
03	II	MI	MII	MII	anormal
04	II	MI	MII	MII	anormal
05	III	MI	MII	MII	anormal
06	III	VG	MII	MII	anormal
07	III	VG	MII	TI	normal
08	IV	VG	MII	MII	normal
09	V	MI	MII	MII	normal
10	V	MI	MII	MII	anormal
11	VI	MI	MII	MII	anormal
12	VI	VG	MII	MII	normal
13	VI	VG	MII	MII	normal
14	VII	MI	MII	MII	normal
15	VIII	MI	MII	MII	anormal
16	VIII	VG	MII	TI	normal
17	IX	MI	MII	TI	normal

Nota: VG – Oócito em estágio de Vesícula Germinativa; MI – oócito em estágio de metáfase I; MII –Oócito em Metáfase II; TI – Oócito em Telófase I; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo).

APÊNDICE C - Descrição dos oócitos incluídos na pesquisa do grupo controle

Oócitos Grupo controle	paciente	procedência	Após MIV p/ microscopia óptica	Após MIV p/ imunofluorescência	Fuso/ distribuição cromossômica
01	I	VG	MII	NV	NV
02	II	MI	MII	MII	normal
03	II	MI	MII	NV	NV
04	II	VG	MII	MII	normal
05	II	VG	MII	TII	AP
06	III	VG	MII	MII	anormal
07	IV	MI	MII	MII	normal
08	IV	VG	MII	TI	normal
09	V	MI	MII	MII	normal
10	V	MI	MII	MII	normal
11	VI	VG	MII	MII	normal
12	VII	VG	MII	MII	anormal
13	VIII	VG	MII	TII	AP
14	IX	MI	MII	NV	NV
15	IX	MI	MII	NV	NV
16	XI	MI	MII	MII	normal
17	X	MI	MII	MII	anormal
18	XI	MI	MII	MII	anormal
19	XII	MI	MII	TII	AP
20	XIII	MI	MII	MII	normal

21	XIV	VG	MII	TI	normal
22	XV	VG	MII	MII	anormal
23	XVI	VG	MII	MII	anormal
24	XVII	VG	MII	MII	anormal

Nota: VG – Oócito em estágio de Vesícula Germinativa; MI – oócito em estágio de metáfase I; MII –Oócito em Metáfase II; TI – Oócito em Telófase I; TII – Oócito em Telófase II; AP – Ativação Partenogenética; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo).

ANEXOS

ANEXO A -Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar - Ribeirão Preto-SP - CEP 14049- 900
Fone (016) 3602-2231 - Fax (016)3633-0946
Setor de Reprodução Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para oócitos imaturos)

1. NOME DA PESQUISA: **"Efeitos da Síndrome dos Ovários Policísticos sobre o fuso meiótico oocitário: estudo piloto"**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro

Você e o seu marido estão sendo convidados a participar da pesquisa "Efeitos da Síndrome dos Ovários Policísticos sobre o fuso meiótico oocitário";

3. ESCLARECIMENTOS: A Síndrome dos Ovários Policísticos é uma causa bastante comum de irregularidade menstrual e de dificuldade para engravidar (denominada infertilidade). Questiona-se se um dos motivos responsáveis tanto pela maior dificuldade em engravidar, como pela chance aumentada de abortamento nas mulheres portadoras desta síndrome, seja a inadequada qualidade de seus óvulos (oócitos), que poderão produzir embriões também de má qualidade e, conseqüentemente, gerar uma gestação menos viável. Contudo, na atualidade, não se realiza a avaliação adequada da qualidade oocitária nestas e em outras pacientes, devido à ausência de métodos bem estabelecidos capazes de predizer se os óvulos são bons ou não. A identificação da presença de alterações nos óvulos de pacientes portadoras desta síndrome e de outras causas de infertilidade, não somente ajudaria a elucidar o mecanismo causador da infertilidade e da maior chance de abortamento, como também abriria perspectivas futuras de tratamento para este grupo de pacientes.

Uma forma indireta de avaliarmos a qualidade dos seus óvulos, sem lhe causar qualquer risco adicional ou prejuízo do sucesso de você engravidar durante este procedimento de reprodução assistida, seria utilizar os óvulos que não amadureceram o suficiente para serem inseminados (denominados óvulos imaturos) e que, portanto, serão descartados, não sendo úteis para o seu tratamento. Estes óvulos imaturos serão amadurecidos '*in vitro'* (ou seja, no laboratório), para que seja estudada uma estrutura microscópica em seu interior chamada de "fuso celular", um dos possíveis responsáveis pela qualidade dos seus oócitos. Devemos, portanto, ressaltar que este estudo e a doação dos seus oócitos que não amadureceram não vão interferir no seu tratamento para engravidar, assim como não causarão prejuízo algum para a sua saúde, nem para a do futuro bebê.

Sua colaboração, portanto, na doação de seus óvulos imaturos será imprescindível para um melhor conhecimento da qualidade dos oócitos de pacientes com dificuldade para engravidar e para levar uma gravidez adiante devido a Síndrome dos Ovários Policísticos. Este conhecimento no futuro poderá ser usado no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz da infertilidade associada à Síndrome dos Ovários Policísticos. É importante ressaltarmos que este estudo não trará nenhuma despesa para você e seu companheiro. Todos os oócitos imaturos doados serão utilizados exclusivamente para a avaliação de seus fusos celulares (não poderão ser utilizados para outros fins que não os desta pesquisa).

4. INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Todos as dúvidas com relação ao estudo que, porventura, possam ocorrer durante o seu tratamento para engravidar, serão prontamente esclarecidas pelos pesquisadores responsáveis pelo presente estudo. Você e seu companheiro têm a liberdade de retirarem o vosso consentimento e de deixarem de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Asseguramos o total sigilo em relação aos nomes dos integrantes deste estudo, bem como garantimos que será mantido o caráter confidencial de toda informação relacionada a vossa privacidade. Temos o compromisso de que serão prestadas informações atualizadas durante todo o estudo, ainda que isto possa afetar a vossa vontade de continuar dele participando. Asseguramos o compromisso de que você será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação neste projeto, bem como de que será garantida a continuidade do seu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Eu, _____, RG nº:_____ e meu marido,_____, RG nº:_____, abaixo assinados, declaramos que fomos informados e estamos inteiramente de acordo com o exposto acima e aceitamos livremente participar do estudo em questão, doando os oócitos imaturos que não serão utilizados em nosso tratamento de infertilidade e autorizamos os pesquisadores abaixo mencionados a utilizá-los para a pesquisa : "Efeitos da Síndrome dos Ovários Policísticos sobre o fuso meiótico oocitário: estudo piloto", estando cientes que teremos a liberdade de retirar o nosso consentimento e de deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo à continuidade do nosso tratamento.

Ribeirão Preto _____ / _____ / _____

_____ _____

Assinatura- Paciente Assinatura- Marido

_____

Assinatura do Pesquisador

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dra. Paula Andrea de A. Salles Navarro – CRM: 84930 – SP

PG Rodolpho Cruz Vieira – CRM: 107054 - SP

Telefone de contato: 16-36022231

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900 - 1º andar (Hospital das Clínicas- Setor de Reprodução Humana), Ribeirão Preto – SP. CEP: 14049-900.

ANEXO B - Protocolo de pesquisa

F:_____ R:_____ ____/____/_____

Protocolo de pesquisa: "Efeitos da Síndrome dos Ovários Policísticos sobre o fuso meiótico oocitário: estudo piloto"

Nome: _____ Registro: _____

Marido: _____ Registro: _____

Dados Clínicos e Laboratoriais

Infertilidade: □ Primária □ Secundária

SOMP □ Fator tubário □

Fator masculino: Leve □ Outro □

Laparoscopia □ Sim □ Não

Idade: _____ FSH Basal:_____

Peso:_____ Estatura:_____ IMC:_____

Glicemia:_____ Insulinemia:_____ QUICK:_____

Terapia de Reprodução Assistida prévia: □ Sim □ Não Nº de ciclos:_____

□ IUI _____ □ FIV- ICSI: _____

Em uso de Metformina: □ Sim □ Não

Dose:_____ Tempo de uso:_____

Dados da indução

FSH-r (total UI): _____(dose diária):_____Nº dias de indução:_____

hMG-hp (total UI): _____(dose diária):_____Nº dias de indução:_____

Nº total de dias de indução: _____

Total folículos ≥ 14mm no dia hCG: _____

OD: _____ OE: _____

Total folículos ≥ 18mm no dia hCG: _____

OD: _____ OE: _____

Dados da captação, fertilização e MIV

Nº de oócitos captados: _____ Nº de folículos puncionados: _____

Taxa de captação (em relação ao nº de folículos puncionados): _____%

(em relação ao nº de folículos >ou= 14mm no dia do hCG): ____%

No de oócitos degenerados:

Maturidade oocitária GV: _____ MI: _____ MII: _____

Nº oócitos inseminados:_____ N° de oócitos MII doados:_____

Nº de oócitos fertilizados:_____ Taxa de fertilização:_____%

Nº de oócitos MII após MIV: de GV: _____t: (%) de MI: _____t: (%)

Taxa de Maturação total: _____%

Nº de embriões formados:_____ No embriões clivados:_____

Taxa de Clivagem: _____%

Qualidade dos embriões

	DII							DIII						
	No Céls	Simetria Sim	Simetria Não	< 20%	20%-50%	> 50%	Tipo	No Céls	Simetria Sim	Simetria Não	< 20%	20%-50%	> 50%	Tipo
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														

Dados de Transferência

Dia da transferência: DII □ DIII □

No embriões transferidos: _____ Numeração dos embriões transferidos:_____

Qualidade dos embriões transferidos

	No Céls	Simetria Sim	Simetria Não	< 20%	20%-50%	> 50%	Tipo	No Céls	Simetria Sim	Simetria Não	< 20%	20%-50%	> 50%	Tipo
1														
2														
3														

Dados da Gestação:

βHCG □ Positivo □ Negativo Valor:_____

Gravidez clínica: Sim □ Não □

Taxa de implantação: _____%

Nº de sacos gestacionais:_____

Perdas gestacionais: Sim:≤ 22 semanas ou ≤ 500g: 1 □ 2 □ 3 □ 4 ou + □ Não□

Nº de Nascidos vivos: 1 □ 2 □ 3 □ Não □

Anomalia de fuso celular

□ Sim □ Não

Lesão de fuso celular completa □ parcial □

Anomalia de distribuição cromossômica:

Sim □ Não □

□ Desalinhamento □ Condensação □ Espalhamento

OBSERVAÇÃO:

ANEXO C - Artigo aceito para publicação pela Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Avaliação do fuso meiótico e distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* de portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à estimulação ovariana: resultados preliminares.

Analysis of the spindle and chromosome configurations of *in vitro* matured oocytes from Polycystic Ovary Syndrome patients submitted to ovarian stimulation: preliminary results.

Rodolpho Cruz Vieira[1], Ionara Diniz Evangelista S. Barcelos[1], Elisa Melo Ferreira[1], Maria Cristina Picinato Medeiros de Araújo[2], Rosana Maria dos Reis[3], Rui Alberto Ferriani[4], Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro[5].

Trabalho realizado no Laboratório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil.

1 Pós-graduando do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil;

2 Bióloga responsável pelo Laboratório de reprodução Assistida do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil;

3 Professora Associada do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil;

4 Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil.

5 Professora Doutora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP- Ribeirão Preto(SP), Brasil

RESUMO

Objetivos: Avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e fator masculino e/ou tubário de infertilidade. **Métodos:** Cinco pacientes inférteis com SOP e 8 pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade, submetidas a ciclos estimulados para captação oocitária para injeção intracitoplasmática de espermatozóide, foram selecionadas prospectiva e consecutivamente e divididas em grupos de estudo e controle, respectivamente. Oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG) e em metáfase I (MI) foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV), respectivamente, por 19 horas ± 1 hora (VG) e 4 horas ± 30 minutos (MI), conforme curva de MIV previamente realizada no presente serviço. Oócitos em metáfase II (MII) após MIV foram fixados, submetidos a imunocoloração e microscopia de fluorescência para avaliação morfológica do fuso e da distribuição cromossômica. **Resultados:** Respectivamente 6 dos 10 oócitos (60%) em MII analisados do grupo de estudo e 4 dos 12 oócitos(33.3%) MII analisados do grupo controle apresentaram anomalias meióticas, caracterizadas por anomalias do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias. Observou-se ausência de diferença significativa entre as proporções de anomalias meióticas entre os dois grupos analisados. **Conclusões:** Os dados preliminares do presente estudo, apesar de não demonstrarem aumento significativo na incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, sugerem uma tendência a maior ocorrência de

anomalias meióticas nos oócitos deste grupo de pacientes, quando comparados aos de portadoras de fator masculino e/ou tubário de infertilidade, o que deverá ser melhor avaliado em estudos com maiores casuísticas. Estes achados têm potencial clínico para apontar uma possível explicação para as controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome dos Ovários Policísticos, fuso meiótico, qualidade oocitária, Maturação In Vitro, ICSI, ciclos estimulados.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the meiotic spindle and the chromosome distribution of *in vitro* matured oocytes obtained during stimulated cycles from infertile women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and with male factor and/or tubal infertility. **Methods:** Five infertile patients with PCOS and 8 patients with infertility due to tubal and/or male factor, submitted to stimulated cycles for oocyte retrieval for intracytoplasmic sperm injection, were selected prospectively and consecutively and respectively assigned to the study group and the control group. Oocytes in the germinative vesicle (GV) and metaphase I (MI) stages were submitted to *in vitro* maturation (IVM) for 19 hours ± 1 hour (GV) and 4 hours ± 30 minutes (MI) according to the IVM curve previously constructed in the present service. After IVM, oocytes in metaphase II (MII) were fixed and submitted to immunostaining and fluorescence microscopy for morphological evaluation of the spindle and of chromosome distribution. **Results:** Six of the 10 MII oocytes (60%) from the study group and 4 of the 12 MII oocytes (33.3%) from the control group presented meiotic anomalies of the spindle and/or anomalous chromosome distribution. The difference in the proportions of meiotic anomalies between the two groups was not statistically significant. **Conclusions:** The present preliminary data,

although not showing a significant increase in the incidence of meiotic anomalies in women with PCOS, suggest a tendency to a higher occurrence of meiotic anomalies in the oocytes of this group of patients compared to women with male and/or tubal infertility, a fact to be better evaluated in studies on larger patient series. The present findings have the clinical potential to provide a possible explanation for the controversial lower fertilization rates observed in patients with PCOS submitted to Assisted Reproduction Techniques.

KEYWORDS: Polycystic Ovary Syndrome, meiotic spindle, human oocyte quality, In Vitro Maturation, ICSI, stimulated cycles.

INTRODUÇÃO

A despeito do uso cada vez mais freqüente das técnicas de reprodução assistida (TRA) para o tratamento da infertilidade relacionada à Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), permanece incerto se o sucesso destes procedimentos difere entre as pacientes com e sem esta síndrome. Apesar de controverso, alguns autores relatam menores taxas de fertilização e maior incidência de abortamentos após a realização de TRA neste grupo de pacientes[1,2]. Questionam-se os papéis do comprometimento da receptividade endometrial e da qualidade oocitária na gênese dos efeitos deletérios da SOP sobre a fertilidade feminina[3,4]. Postula-se que as concentrações elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, ao interferir na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de má qualidade[5]. É possível que outras alterações endócrinas e metabólicas proporcionadas por esta síndrome, também possam estar relacionadas ao comprometimento da qualidade oocitária, o que precisa ser elucidado. O comprometimento da qualidade oocitária, por sua vez, poderia contribuir para a redução das taxas de fertilização relatada por alguns autores nestas pacientes.

Os estudos que avaliaram de forma não-invasiva a qualidade oocitária em pacientes com SOP, utilizaram a análise de parâmetros como a taxa de oócitos em metáfase II[3,6] e a análise da morfologia do complexo *cumulus*-oócito[7,8,9]. Contudo, pela fraca correlação destes parâmetros com o desenvolvimento embrionário subseqüente, e, conseqüentemente, com o prognóstico da gestação[10], supõe-se que estes critérios não sejam adequados preditores da real qualidade oocitária. Entretanto, não dispomos de estudos que tenham avaliado a qualidade oocitária em portadoras de SOP por meio da análise de critérios morfológicos mais objetivos e, potencialmente, capazes de predizer a real capacidade desenvolvimental oocitária.

A qualidade oocitária é decorrente de fatores correlacionados às competências nuclear e citoplasmática. A competência citoplasmática é responsável pela capacidade do oócito de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. A competência nuclear é caracterizada pela qualidade da cromatina e do fuso meiótico oocitário, estrutura temporária e dinâmica, constituída por microtúbulos polimerizados, importante na segregação cromossômica e na divisão celular[11,12,13]. Qualquer alteração no complemento cromossômico, que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico, poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não-disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, comprometendo a fertilização e o subseqüente desenvolvimento embrionário[14,15]. Desta forma, para que o oócito maduro esteja preparado para a fertilização, é necessário que o fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de maturação e ativação oocitárias, mantenha a sua integridade e funcionabilidade. Até o presente momento, não dispomos de estudos que tenham avaliado a morfologia do fuso celular e distribuição cromossômica oocitária de pacientes com SOP, comparadas a mulheres inférteis sem esta síndrome. Ressaltamos que a avaliação da qualidade oocitária por meio do estudo morfológico da organização e distribuição estrutural do fuso meiótico, responsável pela organização do conteúdo nuclear e também pela divisão celular oocitária, é um método

simples, com boa reprodutibilidade e que ajudaria a esclarecer uma das potenciais variáveis relacionadas a piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

A utilização de oócitos humanos maduros para pesquisa, provenientes de ciclos estimulados para ICSI, acarretaria custos e riscos para a paciente e se depararia com a grande dificuldade de doação e a conseqüente escassez de material. Por isso, optamos por utilizar oócitos imaturos obtidos após captação ovariana em ciclos estimulados com gonadotrofinas endógenas, não utilizados na prática clínica, e maturá-los *in vitro* previamente à análise morfológica do fuso celular e distribuição cromossômica.

Assim, no presente estudo propomos avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com SOP e fatores masculino e/ou tubário de infertilidade, apresentando os dados preliminares obtidos.

MÉTODOS

Material e Método

Escolha da amostra

Foram incluídos no presente estudo, consecutivamente, todos os casais submetidos à indução da ovulação para a realização de ICSI, junto ao Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, no período de abril de 2006 a abril de 2007, que preencheram os critérios de inclusão abaixo descritos e manifestaram o desejo de participar do projeto, mediante a assinatura do termo de consentimento pós-informado.

Como critérios de inclusão para ambos os grupos: (a) pacientes com idade ≤ 38 anos, Índice de Massa Corpórea (IMC) < 30kg/m2, FSH basal ≤ 10mUI/ml e índice de QUICKI para a avaliação de resistência insulínica > 0,34, que foram submetidas a indução de ovulação

para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide e que não utilizaram medicamentos que pudessem interferir na foliculogênese ovariana nos dois meses que antecederam o início da estimulação ovariana (como anti-inflamatórios não esteroidais e corticosteróides); (b) presença de oócitos imaturos doados, que após maturação *in vitro*, tornaram-se maduros (atingiram a metáfase da segunda divisão meiótica, morfologicamente identificada pela presença da extrusão do primeiro corpúsculo polar).

Como critérios de inclusão para o grupo controle: 23 pacientes que preencheram os critérios acima, cujo procedimento (ICSI) foi indicado devido à presença exclusiva de fator masculino e/ou fator tubário (excluindo-se a presença de hidrossalpinge).

Para o grupo de estudo (Síndrome dos Ovários Policísticos - SOP) foram admitidas 12 pacientes que preencheram os critérios de inclusão descritos acima, cujo procedimento de reprodução assistida foi indicado pela presença exclusivamente de SOP, diagnosticada segundo os critérios definidos pelo Consenso de Rotterdam (dois dentre os três seguintes critérios: oligo ou amenorréia, sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ovários policísticos a ultrassonografia que seriam 12 ou mais folículos com até 9mm e/ou volume de pelo menos um ovário superior a 10 cm3, excluindo-se outras causas de hiperandrogenismo)[16].

Desenho do estudo

Dos 50 oócitos imaturos, colhidos após estimulação ovariana controlada com gonadotrofinas, como descrito a seguir, sendo 29 oócitos provenientes do grupo controle e 21, do grupo de estudo, maturaram, respectivamente, 13 (oriundos de 8 pacientes) e 10 oócitos (oriundos de 5 pacientes), analisados no presente estudo. Os fusos meióticos e a distribuição cromossômica dos oócitos imaturos que, após o processo de maturação *in vitro*, atingiram a metáfase da segunda divisão meiótica (extrusão do primeiro corpúsculo polar visualizada ao

estéreo-microscópio), foram avaliados morfologicamente por imuno-fluorescência, conforme descrito a seguir, e as taxas de normalidade e anormalidade foram comparadas entre os grupos.

Protocolo de Estimulação

Com o objetivo de sincronizar e programar o início do ciclo de estimulação ovariana controlada, foi realizada a programação da menstruação, que consiste em se administrar anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciados no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana, suspendendo sua administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincida com a realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal para se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que possam interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular.

O bloqueio hipofisário com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) foi iniciado 10 dias antes do dia de realização da USTV basal (protocolo longo), no período vespertino, por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil) na dose de 0,5mg/dia (10 UI), por via subcutânea, que foi mantida durante todo o período de estimulação ovariana controlada até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada, preferencialmente, entre o segundo e o quarto dia do ciclo menstrual. As pacientes receberam 200 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), via intramuscular (IM), nos primeiros 6 dias da indução. A partir do sétimo dia da indução da ovulação, a dose foi ajustada de acordo com o crescimento folicular e a espessura

endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foi administrada 250µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às 22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi feita com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Enila, Brasil) por via oral na dose de 200mg, três vezes ao dia, a partir do dia da captação oocitária e mantida até a décima segunda semana da gestação, nas pacientes que engravidaram.

Captação Oocitária

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil), associado ao citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples padrão, com 300mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bizel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para uma maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra).

Todo o manuseio dos oócitos foi realizado sob capela de fluxo laminar (Veco Modelo HLFS 12), com a finalidade de manter o meio estéril.

Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus, o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C. Depois de identificados, os complexos oócito-cumulus foram isolados do fluido folicular (FF) e lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific) suplementado com 10% Soro Sintético Substituto

(SSS) previamente equilibrado à 37ºC, para a remoção de sangue e debris. A seguir foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio de cultura HTF-SSS e cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich), e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%) por um período de 2 a 4 horas. Após este período, para realizarmos a remoção do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*, os complexos oócito-cumulus foram colocados em micro-gotas de 25µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific), por 30 segundos e, então, lavados 2 ou 3 vezes com o meio HTF-SSS. A remoção mecânica das células da granulosa foi feita com o auxílio de uma pipeta Stripper (130µm - Denuding Pipette, Cook).

Imediatamente após o desnudamento oocitário, realizamos a análise morfológica para identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao microscópio de luz.

Os oócitos que atingiram a Metáfase II (MII - caracterizada morfologicamente pela presença de 1 corpúsculo polar extruso) foram considerados maduros e incubados em gotas de 25 µL de HTF + SSS 10% por 1 hora, para, então, serem inseminados por meio da realização da ICSI.

Os oócitos que estavam em estágio de Vesícula Germinativa (VG) (ausência de CP extruso e presença de VG) ou de Metáfase I (MI) (ausência do CP e da VG) foram considerados imaturos, e, portanto, sem utilidade clínica para a realização de ICSI, sendo submetidos à Maturação *In Vitro* (MIV), para utilização no presente estudo, conforme descrito a seguir.

Os oócitos que apresentaram sinais de danos mecânicos ou sinais de atresia (citoplasma irregular, escuro ou granulado) foram descartados.

Maturação *In Vitro* (MIV)

Imediatamente após o desnudamento e caracterização do grau de maturação oocitária, os oócitos imaturos foram transferidos para placas de cultivo em micro-gotas de 25 µL do meio HTF + SSS 10% (meio previamente equilibrado por período ≥4h), e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%), por período previamente definido. Os oócitos no estágio de vesícula germinativa foram mantidos nestas condições de cultivo por um período de 19 +/- 1 hora e aqueles em metáfase I, por 4 +/- 0,5 hora, conforme curva de maturação previamente realizada neste serviço utilizando os meios e condições de cultura previamente descritos. Após este período pré-estabelecido de cultivo, foi realizada novamente a análise do grau de maturação oocitária, sendo que os oócitos que atingiram o estágio de M II foram fixados para a análise por microscopia de imunofluorescência para caracterização do fuso celular e distribuição cromossômica. Os oócitos que não atingiram a metáfase II após o período descrito, assim como os que degeneraram, foram descartados.

Microscopia de Imunofluorescência para Visualização do Fuso Meiótico e Distribuição Cromossômica

Os oócitos maturados *in vitro* foram fixados e corados para microscopia de fluorescência, conforme previamente descrito[17,18]. Na preparação para a imunofluorescência, o fixador MTSB XF, composto por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de Cloreto de Magnésio Hexahidratado e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Apronitina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 µM de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ) foi aquecido a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram fixados a 37°C por 30 minutos e lavados 4 vezes em solução tampão de lavagem (15 minutos cada) composta por 0,02% de NaN_3, 0,01% de Triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de Soro Normal de Cabra, 0,1M de Glicina, 2% de BSA(V) e PBS, onde ficaram por 2 horas a

37°C. Após esse período, os oócitos foram lavados 1 vez na solução tampão de lavagem para incubação com o anticorpo primário (beta-tubulina de camundongo, diluição 1:1000 em solução de PBS com 0,02% de NaN_3 e 0,1% de BSA(V)) por 4 h a 37°C. Em seguida, foram lavados mais 3 vezes (15 min cada) e incubados com o anticorpo secundário (Imunoglobulina de cabra anti-camundongo FITC-conjugada, Zymed Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:200 na mesma solução de diluição acima descrita) por 2 horas a 37°C. Após mais três lavagens de 15 min cada, os oócitos foram corados com Hoechst 33342 em meio suporte por 10 min a temperatura ambiente, montados entre lâmina e lamínula, estocados a 4°C e mantidos no escuro até observação em Microscópio de Imunofluorescência (Zeiss Axiovert 100TV), realizada dentro de 1 semana do preparo da lâmina.

Análise Morfológica do Fuso Meiótico e da Distribuição Cromossômica

O fuso meiótico foi considerado normal quando apresentou a forma de barril e estava disposto em posição centrípeta em relação ao corpúsculo polar. Os cromossomos apresentaram distribuição normal quando estavam reunidos na placa metafásica e bem alinhados no equador do fuso celular oocitário.

Consideramos como telófase I, os oócitos que apresentaram fuso celular alongado, perpendicular à membrana oocitária, com cromossomos distribuídos nas suas extremidades. Foi considerada ativação partenogenética aqueles que apresentavam extrusão do segundo corpúsculo polar.

Se os cromossomos apresentavam-se dispersos, desalinhados ou fragmentados, se a cromatina feminina encontrava-se aglomerada com microtúbulos interfásicos, se o formato do fuso não estava normal (forma de barril), ou se o mesmo apresentava ruptura, este foi considerado anormal.

Análise Estatística

A comparação entre a proporção de anormalidades do fuso celular e distribuição cromossômica, bem como a comparação da taxa de maturação entre os dois grupos estudados, foi realizada pelo teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher. O grau de significância (alpha) foi definido em 0,05 (bicaudal), sendo que o valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Do grupo de estudo foram captados 169 oócitos de 14 ciclos estimulados (mediana de 12 oócitos captados por ciclo) de 12 pacientes, sendo 148 oócitos maduros (taxa de maturação de 87,6%) e 21 imaturos (14 MI e 7 VG). Dos 21 oócitos imaturos submetidos a MIV, 10 atingiram a metáfase II (4 oriundos de MI e 6 de VG), atingindo taxa de MIV de 60,35% (35% para MI e 85,7% para VG).

Do grupo controle foram captados 174 oócitos de 30 ciclos estimulados (mediana de 5 oócitos por ciclo) de 23 pacientes, sendo 145 maduros (taxa de maturação de 83,3%) e 29 imaturos (15 MI e 14 VG). Após MIV, 13 oócitos (5 MI e 8 VG) atingiram a MII, com taxa de maturação de 45,2%.

No grupo de estudo, dos 10 oócitos MII analisados, provenientes de 5 pacientes, foram observados 3 MII normais (30%), 6 MII anormais (60%) e 1 em estágio de telófase 1 normal (10%). No grupo controle, dos 12 oócitos MII analisados, oriundos de 8 pacientes, foram observados 4 MII normais (33,3%), 4 MII anormais (33,3%), 1 oócito em telófase 1 normal (8,4%) e 3 sofreram ativação partenogenética (25%)(Tabela 1). Por dificuldades técnicas durante a execução do protocolo de imunofluorescência, 1 oócito MII do grupo controle não

pôde ser analisado. Os dados demonstraram ausência de diferença significativa na incidência de anomalias meióticas entre os dois grupos avaliados.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro na literatura que avaliou as proporções de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, comparando-as aos de mulheres com fatores tubário e/ou feminino de infertilidade. Os dados preliminares do presente estudo não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes dois grupos estudados. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas nos oócitos de mulheres com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se confirmados, os referidos achados poderão contribuir para a elucidação de um dos mecanismos envolvidos na sugerida piora da qualidade oocitária em portadoras desta afecção, quando submetidas a estimulação ovariana para a realização de TRA de alta complexidade.

A imensa escassez de oócitos humanos maduros disponíveis e passíveis de serem doados para a realização de pesquisas utilizando metodologias invasivas, que inviabilizam o uso clínico do referido material, como é o caso da microscopia de imunofluorescência, justificou a utilização, no presente estudo, de oócitos imaturos, obtidos em ciclos estimulados por gonadotrofinas para a realização de ICSI, que atingissem a metáfase II após a realização de maturação *in vitro*. Todavia, as baixas proporções de oócitos imaturos obtidos em ciclos estimulados (16,7% e 12,4% de oócitos imaturos, respectivamente, nos grupos controle e SOP), bem como a necessidade de que sofressem MIV (taxas de MIV de 45,2% e 60,35%, respectivamente, nos grupos controle e SOP), dificultou a obtenção de oócitos maturados *in vitro*, obtidos em ciclos estimulados, justificando a pequena casuística obtida após um ano de inclusão de pacientes elegíveis para participarem do presente estudo.

Sabe-se que o fuso celular oocitário é uma estrutura celular altamente dinâmica e extremamente sensível à ação de diversos fatores, como o envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura, a manipulação oocitária, a exposição ambiental a diversos agentes tóxicos, entre outros[19,20,21,22]. Tais fatores podem afetar o fuso, causando uma despolimerização da tubulina e o deslocamento de cromossomos do equador metafásico, gerando anomalias meióticas. Alguns autores evidenciaram que o tempo de cultivo, após a maturação nuclear estar completa, também seria um dos fatores relacionados ao aumento da incidência de anormalidades meióticas[23], o que justificou a realização de uma curva-padrão de MIV (dados não apresentados), no sentido de estabelecermos o tempo médio de cultivo, nas condições e meio de cultura utilizados no presente estudo, no qual a maioria dos oócitos atingiria a metáfase II. Desta forma, apenas os oócitos imaturos que atingiram a metáfase II após o tempo de cultivo pré-definido (19 +/- 1 hora e 4 +/- 0,5 hora, respectivamente para oócitos em estágio de vesícula germinativa e metáfase I), foram utilizados e analisados no presente estudo.

Ressaltamos que os nossos dados evidenciaram um elevado percentual de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, tanto no grupo controle (33,3%), como no grupo de estudo (60%). Não dispomos de dados na literatura avaliando a incidência de anomalias meióticas em oócitos humanos, maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.

Alguns autores realizando análise citogenética de oócitos em metáfase II, não fertilizados após a realização de fertilização *in vitro* convencional (FIV), não observaram diferença entre a incidência de aneuploidias, diploidias e cromossomos prematuramente condensados quando compararam pacientes com SOP (24,6 % de anormalidades) e com infertilidade secundária a fator tubário (27% de anomalias cromossômicas)[4]. Apesar da incidência de anomalias cromossômicas oocitárias nas portadoras de SOP encontrada por

estes autores[4] (24,6 %) ser inferior à observada no nosso estudo (60%), ressaltamos que tanto o material utilizado, quanto as metodologias empregadas foram distintas, impossibilitando a adequada comparação dos dados obtidos. A não realização da análise do fuso meiótico oocitário pode ter resultado na subestimativa da proporção de anomalias meióticas, o que precisa ser avaliado melhor.

Encontramos um único estudo publicado avaliando a incidência de anomalias do fuso meiótico e configuração cromossômica em oócitos humanos maturados *in vitro*, obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas, evidenciando, respectivamente, 43,7% e 33,3% de anormalidades[24]. Todavia, estes oócitos analisados foram obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas. Como se postula um potencial papel deletério da estimulação ovariana com gonadotrofinas, na dinâmica do citoesqueleto e competência oocitária[25], é possível que a incidência de anomalias meióticas seja maior em oócitos maturados *in vitro* em ciclos estimulados do que naqueles não estimulados, o que precisa ser mais bem avaliado por meio de estudos utilizando metodologia pertinente. Este mesmo estudo comparou a incidência de anormalidades meióticas entre os oócitos maturados *in vitro*, oriundos de ciclos não estimulados, com os maturados *in vivo*, obtidos em ciclos estimulados, objetivando determinar a possível influência da MIV no fuso meiótico e distribuição cromossômica oocitária de pacientes com SOP. Detectou-se uma proporção significativamente maior de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro*, sugerindo que a MIV tenha um efeito deletério sobre a organização do fuso celular e o alinhamento cromossômico oocitário. Desta forma, é provável que a incidência de anomalias meióticas obtidas no presente estudo (60%), no qual analisamos oócitos maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas, seja superior tanto à observada nos oócitos maturados *in vitro*, utilizados rotineiramente nas TRA, como à evidenciada em oócitos maturados *in vitro*, porém provenientes de ciclos não estimulados[24]. Todavia, como comparamos oócitos de

pacientes com SOP com os de pacientes com fatores tubário e/ou masculino de infertilidade (grupo controle), ambos maturados *in vitro,* e encontramos uma tendência a maior incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, estes achados sugerem um possível comprometimento da qualidade oocitária ralacionada à SOP, e não apenas à MIV, o que deverá ser mais bem analisado aumentando-se a presente casuística.

Os dados preliminares do presente estudo não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes os oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, quando comparados aos de mulheres com fatores tubário e/ou masculino de infertilidade. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, nos oócitos de pacientes com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se forem confirmados, estes achados podem apontar um possível papel destas anormalidades, relacionadas à maturação nuclear oocitária, nas controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida. Se não confirmados, sugerirão o possível envolvimento de fatores relacionados à maturação citoplasmática e não nuclear, na etiopatogênese da piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a contribuição das funcionárias do laboratório de reprodução assistida: Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Yamada Dantas, Roberta Cristina Giorgenon, Maria Auxiliadora Pádua Rosa e Sandra Viana, pelo apoio técnico dispensado para a realização do presente artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Hughes EG, Laven JSE, Macklon NS, Fauser BCJM. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update 2006;12(1):13-21.

2 Homburg R. Pregnancy complications in PCOS. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2006;20(2): 281-92.

3 Ludwig M, Finas DF, Al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. Hum Reprod 1999;14(2):354-8.

4 Sengoku K, Tamate K, Takuma N, Yoshida T, Goishi K, Ishikawa M. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1997;12(3):474-7.

5 Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. Lancet 1990;336(8724):1141-4.

6 Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 1997;68(6):1017-21.

7 Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1995;10:1962–1967.

8 Tanbo T, Dale PO, Kjekshus E, Haug E, Abyholm T. Stimulation with human menopausal gonadotropin versus follicle-stimulating hormone after pituitary suppression in polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 1990;53(5):798-803.

9 Tarlatzis BC, Grimbizis G, Pournaropoulos F, Bontis J, Lagos S, Spanos E, Mantalenakis S. The prognostic value of basal luteinizing hormone:follicle-stimulating hormone ratio in the treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by assisted reproduction techniques. Hum Reprod 1995;10(10):2545-9.

10 Fauser BCJM. Molecular biology in reproductive medicine. 1ª ed. Nova York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

11 Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe DL. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. Biol Reprod 2000;63(1):251-8.

12 Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. Hum Reprod 2001;16(7):1464-8.

13 Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. Hum Reprod 2003;18(4):817-20.

14 Navarro PAAS, Liu L, Trimarchi JR, Ferriani RA, Keefe DL. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. Fertil Steril 2005;83 Supl 1:1197-205.

15 Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, LeMeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P. Multiparameter analysis of

human oocytes at Metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. Hum Reprod 2003;18(7):1494-503.

16 The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004;81:19–25.

17 Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. Dev Biol 1993;158(1):101-12.

18 Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, Keefe DL. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. Nat Biotechnol 2000;18(2):223-5.

19 Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. Hum Reprod 2004;19(5):1148-54.

20 Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O2 and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. Hum Reprod 2001;16(4):737-48.

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

22 Navarro PAAS, Liu L, Keefe DL. *In vivo* effects of arsenite on meiosis, preimplantation development and apoptosis in the mouse. Biol Reprod 2004;70:980-985**.**

23 Liu L, Keefe DL. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. Hum Reprod 2002;17(10):2678-85.

24 Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. Fertil Steril 2006;85(4):827-32.

25 Lee ST, Han HJ, Oh SJ, Lee EJ, Han JY, Lim JM. Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. Mol Reprod Dev 2006;73(8):1022-33.

Tabela 1 – Resultados da análise do fuso celular e configuração cromossômica de oócitos maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) e infertilidade por fatores masculino e/ou tubário (Grupo Controle).

Grupos	**MII analisados**			**MII Normais**				**MII anormais**				**Telófase 1 normal**		**Ativação Partenogenética**	
	VG	MI	Total	VG	MI	Total	**%**	VG	MI	Total	**%**	Total	**%**	Total	**%**
SOP	4	6	10	1	2	3	**30**[a]	2	4	6	**60**[b]	1	**10**	0	**0**
Controle	7	5	12	1	3	4	**33,3**[a]	3	1	4	**33,3**[b]	1	**8,4**	3	**25**

Mesmos sobrescritos [a,b] dentro da mesma coluna indicam ausência de diferença significativa ($p > 0,05$)

MII – Oócitos em Metáfase II; MI – Oócito em Metáfase I; VG – Oócito em estágio de vesícula germinativa.

ANEXO D - Artigo enviado para publicação pelo periódico Fertility and Esterility

Analysis of the spindle and chromosome configurations of *in vitro* matured oocytes from Polycystic Ovary Syndrome patients submitted to ovarian stimulation: a pilot study.

Análise do fuso e de configurações cromossômicas de oócitos maturados in vitro de pacientes portadoras da Síndrome dos Ovários Policísticos submetidas à estimulação ovariana: estudo piloto.

Rodolpho Cruz Vieira, MD, Ionara Diniz Evangelista S. Barcelos, MD, Elisa Melo Ferreira, Rosana Maria dos Reis, MD, PhD, Rui Alberto Ferriani, MD, PhD, Paula Andréa de Albuquerque Salles Navarro, MD, PhD*.

Departmento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

***Correspondência para:**

Paula A. A. S. Navarro

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

Fax: 55-16-3633 0946

E-mail: paasnavarro@uol.com.br

SUPORTE FINANCEIRO

Rodolpho Cruz Vieira é bolsista pela Comissão Nacional de Ensino e Pesquisa – Brasil

CÁPSULA

Dados preliminaries de estudos controlados prospectivos sugerem uma tendência de uma alta, porém, insignificante incidência de anormalidades meióticas em oócitos de portadoras de SOP submetidas a Técnicas de Reprodução Assistida.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the meiotic spindle and the chromosome configuration of *in vitro* matured oocytes obtained from stimulated cycles of infertile women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and male and/or tubal factor of infertility.

Design: Prospective study.

Setting: Assisted conception unit, university hospital.

Patient(s): Patients aged up to 38 years were selected prospectively and consecutively and divided into PCOS Group (26 patients) and Control Group (48 patients).

Intervention(s): Ninety immature oocytes were obtained, respectively, from 13 and 27 patients of PCOS (34 oocytes) and control (56 oocytes) groups, and submitted to *in vitro* maturation(IVM).

Main Outcome Measure(s): Meiotic anomalies were assessed using immunofluorescence microscopy.

Results: IVM rates were similar between groups. Spindle and chromosome organization was observed in 29 MII oocytes (14 and 15 oocytes, respectively, from PCOS and control groups).

The difference in the proportions of meiotic anomalies between groups was not statistically significant (57.1 e 46.7%, respectively, in PCOS e control groups).

Conclusions: The present preliminary data, although not showing a significant increase in the incidence of meiotic anomalies in women with POS, suggest a tendency to a higher occurrence of meiotic anomalies in the PCOS oocytes, a fact to be better evaluated in studies on larger patient series.

KEYWORDS: Polycystic Ovary Syndrome, meiotic spindle, human oocyte quality, In Vitro Maturation, ICSI, stimulated cycles.

Introdução

A despeito do uso cada vez mais freqüente das técnicas de reprodução assistida (TRA) para o tratamento da infertilidade relacionada à Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), permanece incerto se o sucesso destes procedimentos difere entre as pacientes com e sem esta síndrome. Apesar de controverso, alguns autores relatam menores taxas de fertilização e maior incidência de abortamentos após a realização de TRA neste grupo de pacientes (1,2). Questionam-se os papéis do comprometimento da receptividade endometrial e da qualidade oocitária na gênese dos efeitos deletérios da SOP sobre a fertilidade feminina (3,4). Postula-se que as concentrações elevadas de hormônio luteinizante (LH) na fase folicular, ao interferir na foliculogênese, poderiam resultar em oócitos de má qualidade (5). É possível que outras alterações endócrinas e metabólicas proporcionadas por esta síndrome, também possam estar relacionadas ao comprometimento da qualidade oocitária, o que precisa ser elucidado. O comprometimento da qualidade oocitária, por sua vez, poderia contribuir para a redução das taxas de fertilização relatada por alguns autores nestas pacientes.

Os estudos que avaliaram de forma não-invasiva a qualidade oocitária em pacientes com SOP, utilizaram a análise de parâmetros como a taxa de oócitos em metáfase II (3,6) e a análise da morfologia do complexo *cumulus*-oócito (7,8,9). Contudo, pela fraca correlação destes parâmetros com o desenvolvimento embrionário subseqüente, e, conseqüentemente, com o prognóstico da gestação (10), supõe-se que estes critérios não sejam adequados preditores da real qualidade oocitária. Entretanto, não dispomos de estudos que tenham avaliado a qualidade oocitária em portadoras de SOP por meio da análise de critérios morfológicos mais objetivos e, potencialmente, capazes de predizer a real capacidade desenvolvimental oocitária.

A qualidade oocitária é decorrente de fatores correlacionados às competências nuclear e citoplasmática. A competência citoplasmática é responsável pela capacidade do oócito de suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial. A competência nuclear é caracterizada pela qualidade da cromatina e do fuso meiótico oocitário, estrutura temporária, dinâmica, constituída por microtúbulos polimerizados, importante na segregação cromossômica e na divisão celular (11,12,13). Qualquer alteração no complemento cromossômico, que possa ser originada por uma alteração do fuso meiótico, poderia conduzir a um estado de aneuploidia por não-disjunção, junção desbalanceada ou disjunção prematura das cromátides e perda de cromossomos, comprometendo a fertilização e o subseqüente desenvolvimento embrionário (14,15). Desta forma, para que o oócito maduro esteja preparado para a fertilização, é necessário que o fuso meiótico, estrutura fundamental no processo de maturação e ativação oocitárias, mantenha a sua integridade e funcionabilidade. Até o presente momento, não dispomos de estudos que tenham avaliado a morfologia do fuso celular e distribuição cromossômica oocitária de pacientes com SOP, comparadas a mulheres inférteis sem esta síndrome. Ressaltamos que a avaliação da qualidade oocitária por meio do estudo morfológico da organização e distribuição estrutural do fuso meiótico, responsável pela organização do conteúdo nuclear e também pela divisão celular oocitária, é um método simples, com boa

reprodutibilidade e que ajudaria a esclarecer uma das potenciais variáveis relacionadas a piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

A utilização de oócitos humanos maduros para pesquisa, provenientes de ciclos estimulados para ICSI, acarretaria custos e riscos para a paciente e se depararia com a grande dificuldade de doação e a conseqüente escassez de material. Por isso, optamos por utilizar oócitos imaturos obtidos após captação ovariana em ciclos estimulados com gonadotrofinas endógenas, não utilizados na prática clínica, e maturá-los *in vitro* previamente à análise morfológica do fuso celular e distribuição cromossômica.

Assim, no presente estudo propomos avaliar o fuso meiótico e a distribuição cromossômica de oócitos maturados *in vitro* obtidos de ciclos estimulados de mulheres inférteis com SOP e fatores masculino e/ou tubário de infertilidade, apresentando os dados preliminares obtidos.

Material e Métodos

Seleção de pacientes

Este estudo foi conduzido prospectivamente no laboratório do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)-USP no período de abril de 2006 a agosto de 2007 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clinicas. 74 mulheres inférteis que concordaram em participar da pesquisa através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram submetidas a ciclos estimulados para captação de oócitos inseminados por Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI). Estas pacientes foram selecionadas prospectivamente e consecutivamente e divididas em:

- Grupo de estudo (portadoras de SOP) onde foram incluídas pacientes com idade inferior a 38 anos, índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m^2, valor de FSH basal menor que 10mUI/ml e sem resistência insulínica avaliada pelo índice de QUICKI (análise logarítimica da razão entre glicemia em mg/dl e insulinemia em pmol/l, sendo valores superiores a 0,34 considerados normais). O diagnóstico de SOP foi baseado nos critérios utilizados pelo consenso revisto de Rotterdam (2003) (dois dentre os três seguintes critérios: oligo ou amenorréia, sinais clínicos ou laboratoriais de hiperandrogenismo e ovários policísticos a ultrassonografia que seriam 12 ou mais folículos com até 9mm e/ou volume de pelo menos um ovário superior a 10 cm^3, excluindo-se outras causas de hiperandrogenismo) (16);
- Grupo controle (portadores de fator masculino e/ou tubário, excluindo hidrossalpinge), onde foram incluídas pacientes com idade inferior a 38 anos, índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m^2 e valor de FSH basal menor que 10mUI/ml, que tenham realizado laparoscopia diagnóstica para a exclusão de demais causas de infertilidade.

A seleção das pacientes e do material de estudo das mesmas está representada no diagrama abaixo (Figura 1). A caracterização das pacientes dos grupos de estudo (SOP) e controle quanto à idade, índice de massa corporal e FSH basal está representada na Tabela 1. Os grupos foram considerados homogêneos segundo estas variáveis.

Métodos

Os oócitos macroscopicamente MII (caracterizados pela extrusão do primeiro corpúsculo polar por microscopia ótica) após MIV tiveram seu fuso meiótico e sua distribuição cromossômica analisadas por microscopia de imunofluorescência conforme protocolo descrito a seguir.

Protocolo de Estimulação

A programação da menstruação para o início do ciclo de estimulação ovariana controlada foi realizada pela administração de anticoncepcionais orais combinados diariamente, iniciada no período menstrual do ciclo precedente até cinco dias antes do previsto para o início da estimulação ovariana, suspendendo esta administração de tal forma que o início do sangramento menstrual coincida com a realização da ultrassonografia transvaginal (USTV) basal para se observar o padrão endometrial e afastar a presença de cistos ovarianos que possam interferir na resposta à administração das gonadotrofinas exógenas e na monitorização ultrassonográfica do crescimento folicular.

O bloqueio hipofisário com análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHa) foi iniciado 10 dias antes do dia de realização da USTV basal (protocolo longo), no período vespertino, por meio da administração de acetato de leuprolide (Lupron®, Abott, Brasil) na dose de 0,5mg/dia (10 UI), por via subcutânea, mantida durante todo o período de estimulação ovariana controlada até o dia da administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Ovidrel®, Serono, Brasil).

A hiperestimulação ovariana controlada foi iniciada, entre o segundo e o quarto dia do ciclo menstrual. As pacientes receberam 150 a 300 UI por dia de FSH recombinante (FSHr) (Gonal-F®, Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil), via intramuscular (IM), nos primeiros 6 dias da indução. A partir do sétimo dia da indução da ovulação, a dose foi ajustada ou introduziu-se HMG purificada (Menopur®, Serono, Brasil) na dose de 150 UI/dia de acordo com o crescimento folicular e a espessura endometrial, monitorados com USTV diariamente ou em dias alternados. Quando pelo menos dois folículos atingiram 18 mm de diâmetro médio, foi administrada 250 µg de hCG recombinante (Ovidrel®, Serono, Brasil) às

22:00. A captação dos oócitos foi realizada 34 a 36h após a administração do hCG recombinante.

A suplementação da fase lútea foi feita com progesterona natural micronizada (Utrogestan®, Enila, Brasil) por via oral na dose de 200mg, três vezes ao dia, a partir do dia da captação oocitária e mantida até a décima segunda semana da gestação, nas pacientes que engravidaram.

Captação Oocitária

A captação dos oócitos foi realizada mediante prévia anestesia geral endovenosa com propofol (Diprivan®, Astra-Zeneca, Brasil), associado ao citrato de fentanil (Fentanil®, Janssen-Cilag, Brasil). A aspiração dos folículos por via endovaginal guiada por transdutor ultrassonográfico transvaginal, foi realizada utilizando-se uma agulha de lúmen simples, padrão, com 300mm de comprimento, 1,1 mm de diâmetro interno, duplo bizel cortante, ranhurado nos dois centímetros terminais para uma maior ecogenicidade (Laboratório CCD, França), com pressão aspirativa artificial constante de 100 mmHg, por meio de bomba de sucção com controle eletrônico (Craft® Suction Pump, Rocket Medical, Inglaterra).

Todo o manuseio dos oócitos foi realizado sob capela de fluxo laminar (Veco Modelo HLFS 12), com a finalidade de manter o meio estéril.

Para a identificação e o isolamento dos complexos oócito-cumulus, o material aspirado foi transferido para placas de Petri com 10 cm de diâmetro, previamente aquecidas em platina térmica a 37°C. Depois de identificados, os complexos oócito-cumulus foram isolados do fluido folicular (FF) e lavados cuidadosamente em meio de cultura Human Tubal Fluid-HEPES (HTF, Irvine Scientific) suplementado com 10% Soro Sintético Substituto (SSS) previamente equilibrado à 37ºC, para a remoção de sangue e debris. A seguir foram colocados em placas NUNC (Multidish 4 wells Nuclon, Delta SI), preenchidas com o meio

de cultura HTF-SSS e cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich), e levados à incubadora em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%) por um período de 2 a 4 horas. Após este período, para realizarmos a remoção do *cumulus oophorus* e da *corona radiata*, os complexos oócito-*cumulus* foram colocados em micro-gotas de 25µL de hialuronidase (H4272 tipo IV-S, Sigma), na diluição de 80 UI/mL de HTF/HEPES (Irvine Scientific), por 30 segundos e, então, lavados 2 ou 3 vezes com o meio HTF-SSS. A remoção mecânica das células da granulosa foi feita com o auxílio de uma pipeta Stripper (130µm - Denuding Pipette, Cook).

Imediatamente após a realização do desnudamento oocitário, foi realizada a análise morfológica para identificação do grau de maturidade dos oócitos, sob visualização ao microscópio de luz.

Os oócitos que atingiram a Metáfase II (MII - caracterizada morfologicamente pela presença de 1 corpúsculo polar (CP) extruso) foram considerados maduros e incubados em gotas de 25 µL de HTF + SSS 10% por 1 a 2 horas, para, então, serem inseminados por meio da realização da ICSI.

Os oócitos que estavam em estágio de Vesícula Germinativa (VG) (ausência de CP extruso e presença de VG) ou de Metáfase I (MI) (ausência do CP e da VG) foram considerados imaturos, e, portanto, sem utilidade clínica para a realização de ICSI, sendo submetidos à Maturação *In Vitro* (MIV), para utilização no presente estudo, conforme descrito a seguir.

Os oócitos que apresentaram sinais de danos mecânicos ou sinais de atresia (citoplasma irregular, escuro ou granulado) foram descartados.

Maturação in vitro

Os oócitos imaturos foram, então, imediatamente transferidos para as placas de cultivo, colocados em micro-gotas de 50 µL do meio HTF + SSS 10%, e levados à incubadora

em mistura gasosa de CO_2 a 5%, sob condições ideais de temperatura (37ºC) e umidade (95%), por período previamente definido. Os oócitos no estágio de vesícula germinativa foram mantidos nestas condições de cultivo por um período de 19 horas + ou – 1 hora e aqueles em metáfase I, por 4 horas + ou – 30 minutos de acordo com curva de maturação previamente estabelecida neste serviço, utilizando meios e condições de cultura descritos previamente, onde 36 oócitos em Metáfase I foram submetidos a MIV após ciclo estimulado com taxa de maturação de 83% e tempo de maturação entre 210 e 420 minutos com mediana de 240 minutos (4 horas) e 28 oócitos em VG com taxa de maturação de 71% e tempo de maturação entre 18 e 24 horas com mediana de 19 horas. Após este período pré-estabelecido de cultivo, foi realizada novamente a análise do grau de maturação oocitária, sendo que os oócitos que atingiram MII são fixados para a análise por microscopia de imunofluorescência para identificação do fuso celular e distribuição cromossômica. Os oócitos que não atingiram a metáfase II após o período descrito, assim como os que degeneraram, foram descartados.

Microscopia de imunofluorescência para visualização do fuso meiótico e da distribuição cromossômica

Os oócitos maturados *in vitro* são fixados e corados para microscopia de fluorescência, conforme previamente descrito (17). Na preparação para a imunofluorescência, o fixador MTSB XF, composto por 1X de Tampão Estabilizador (0,1M de Pipes, 5mM de Cloreto de Magnésio Hexahidratado e 2,5mM de EGTA), 50% de Óxido de Deutério, 0,01% de Apronitina de pulmão bovino, 1 mM de DTT, 1 μM de Taxol, 0,5% de Triton-X, 2% de Formaldeído e água de MilliQ) foi aquecido a 37°C por 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram fixados a 37°C por 30 minutos e lavados 4 vezes em solução tampão de lavagem (15 minutos cada) composta por 0,02% de NaN_3, 0,01% de Triton-X, 0,2% de leite desnatado, 2% de Soro Normal de Cabra, 0,1M de Glicina, 2% de BSA(V) e PBS, onde ficaram por 2 horas a

37°C. Após esse período, os oócitos foram lavados 1 vez na solução tampão de lavagem para incubação com o anticorpo primário (beta-tubulina de camundongo, diluição 1:1000 em solução de PBS com 0,02% de NaN_3 e 0,1% de BSA(V)) por 4 h a 37°C. Em seguida, foram lavados mais 3 vezes (15 min cada) e incubados com o anticorpo secundário (Imunoglobulina de cabra anti-camundongo FITC-conjugada, Zymed Laboratories, Invitrogen Corporation, Calsbad, CA, USA, diluição 1:200 na mesma solução de diluição acima descrita) por 2 horas a 37°C. Após mais três lavagens de 15 min cada, os oócitos foram corados com Hoechst 33342 em meio suporte por 10 min a temperatura ambiente, montados entre lâmina e lamínula, estocados a 4°C e mantidos no escuro até observação em Microscópio de Imunofluorescência (Zeiss Axiovert 100TV), realizada dentro de 1 semana do preparo da lâmina.

Análise morfológica do fuso meiótico e da distribuição cromossômica do oócito em Metáfase II

O fuso meiótico foi considerado normal quando apresentou a forma de "barril" e estava disposto em posição centrípeta em relação ao corpúsculo polar. Os cromossomos apresentavam distribuição normal quando estavam reunidos na placa metafásica e bem alinhados no equador do fuso celular oocitário.

Consideramos como em telófase I, os oócitos que apresentaram fuso celular alongado perpendicular à membrana oocitária com cromossomos distribuídos nas suas extremidades. Foi considerada ativação partenogenética aqueles que apresentavam extrusão do segundo corpúsculo polar.

Se os cromossomos apresentavam-se dispersos, desalinhados ou fragmentados, se a cromatina feminina encontrava-se aglomerada com microtúbulos interfásicos, se o formato do fuso não estava normal (forma de "barril"), ou se o mesmo apresentava ruptura, este foi considerado anormal.

Análise estatística

A comparação entre a proporção de anormalidades de fuso celular e distribuição cromossômica oocitários entre os dois grupos estudados foi realizada pelo teste exato de Fisher. O grau de significância (alpha) foi definido em 0,05 (bicaudal), sendo o valor de $p<0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Para a determinação do tamanho do número de amostras necessário para que a diferença obtida entre as proporções de anormalidades meióticas no grupo de estudo e no grupo controle seja estatisticamente comprovada utilizamos teste de hipótese bicaudal para 2 proporções com um poder de teste de 80% e um nível de significância (β) de 5%, preconizado pela Organização Mundial de Saúde (18).

Resultados

Taxas de Maturação *In Vitro* (MIV) entre pacientes dos grupos SOP e controle

Segundo classificação de maturidade oocitária realizada por microscopia óptica, no grupo de estudo, dos 34 oócitos imaturos submetidos a MIV, 17 oócitos atingiram a metáfase II (taxa de MIV de 50%). No grupo controle, de 56 oócitos imaturos submetidos a MIV, 24 atingiram MII (taxa de MIV de 42,8%).

Não observamos diferença significativa nas taxas de MIV (utilizando como critério a extrusão do primeiro corpúsculo polar, observada por microscopia óptica) entre os dois grupos avaliados (50% e 42,8%, respectivamente, para os grupos SOP e controle) (Tabela 2).

Na análise por microscopia de imunofluorescência, detectaram-se 3 e 2 oócitos, respectivamente, no grupo de estudo e no grupo controle, em estágio de Telófase I e 3 oócitos ativados partenogeneticamente no grupo controle (Figura 3), ou seja, não em metáfase II, como classificados pela microscopia óptica. Ocorreu a impossibilidade de análise de 4 oócitos do grupo controle em virtude de dificuldades técnicas durante o processo de imunocoloração,

o que impossibilita o cálculo adequado da taxa de MIV neste grupo, segundo a classificação pela microscopia de imunofluorescência. Desta forma, foram analisados por microscopia de imunofluorescência, respectivamente, 14 oócitos em MII de 8 pacientes do grupo de estudo (taxa de MIV de 41,2%; 14 MII/34 oócitos imaturos) e 15 oócitos MII de 12 pacientes do grupo controle.

Análise do fuso meiótico e distribuição cromossômica dos oócitos em metáfase II, após MIV, nos grupos SOP e controle

No grupo de estudo, dos 14 oócitos MII analisados, foram observados 6 oócitos em metáfase II (MII) normais (42,9%) e 8 MII anormais (57,1%). No grupo controle, dos 15 oócitos MII analisados, foram observados 8 MII normais (53,3%) e 7 MII anormais (46,7%) (Tabela 3). Não houve diferença significativa nas proporções de anomalias meióticas entre os grupos SOP e controle (57,1 e 46,7%, respectivamente) (Figura 2).

Cálculo do tamanho amostral

O tamanho de amostras necessário para que a diferença de 10,4% obtida entre as proporções de anormalidades meióticas do grupo de estudo (pacientes portadoras de SOP) e do grupo controle, respectivamente 57,1% e 46,7%, seja estatisticamente significativa, baseado em um teste de hipótese bicaudal, com um poder de 80% e um nível de significância (β) de 5%, é de 322 para cada grupo.

Discussão

O presente estudo foi o primeiro na literatura que avaliou as proporções de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, comparando-as aos de mulheres com fatores tubário e/ou feminino de

infertilidade. Os dados preliminares do presente estudo não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes dois grupos estudados. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas nos oócitos de mulheres com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se confirmados, os referidos achados poderão contribuir para a elucidação de um dos mecanismos envolvidos na sugerida piora da qualidade oocitária em portadoras desta afecção, quando submetidas à estimulação ovariana para a realização de TRA de alta complexidade. Um estudo publicado recentemente (19), utilizando análise comparativa da expressão gênica oocitária (*microarrays analysis),* de portadoras de SOP e mulheres normo-ovulatórias, evidenciou diferenças nos perfis de expressão gênica entre estes dois grupos avaliados. Estes autores sugeriram que esta expressão gênica alterada poderia culminar com defeitos na meiose ou no desenvolvimento embrionário inicial, contribuindo com a menor competência para o desenvolvimento, observada nos oócitos de mulheres com SOP. Se confirmada a tendência observada no nosso estudo, de maior proporção de anomalias meióticas nos oócitos de mulheres com SOP, poderemos elaborar uma relação entre a expressão gênica alterada, descrita por Wood et al. (2007), e os potenciais danos meióticos oocitários em fuso celular e/ou distribuição cromossômica neste grupo.

A imensa escassez de oócitos humanos maduros disponíveis e passíveis de serem doados para a realização de pesquisas utilizando metodologias invasivas, que inviabilizam o uso clínico do referido material, como é o caso da microscopia de imunofluorescência, justificou a utilização, no presente estudo, de oócitos imaturos, obtidos em ciclos estimulados por gonadotrofinas para a realização de ICSI, que atingissem a metáfase II após a realização de maturação *in vitro*. Todavia, as baixas proporções de oócitos imaturos obtidos em ciclos estimulados, bem como a necessidade de que sofressem MIV (taxas de MIV de 50% e 42,9%, respectivamente, nos grupos SOP e controle), dificultou a obtenção de oócitos maturados *in*

vitro, justificando a pequena casuística obtida após dezessete meses de inclusão de pacientes elegíveis para participarem do presente estudo. Não encontramos na literatura estudos que tenham utilizado o mesmo meio de cultivo usado no presente estudo. Contudo, Ebner et al. (2006), avaliaram a maturação *in vitro* em meio de cultura BM1 (Biomedical Medium stage one, NMS Biomedical, Praroman, Suíça), com condições de cultivo similares às empregadas no nosso estudo, de 75 oócitos em ciclos estimulados, demonstrando taxa de maturação de 44,7% (20), semelhante àquela observada em nosso grupo controle. É importante ressaltar que a heterogeneidade nos resultados das taxas de maturação não depende unicamente de meio e condições de cultivo utilizados, mas também, de diferenças intrínsicas entre oócitos captados de folículos de tamanhos diferentes, que podem variar a sua capacidade evolutiva devido ao crescimento anormal ou incompleto (21).

Existem evidências na literatura que suportam que não só a resistência insulínica (22), mas também, a obesidade (23,24), quando presentes nas pacientes portadoras de SOP, poderiam afetar a qualidade do oócito e, conseqüentemente, influenciar os resultados das TRA, reduzindo as taxas de fertilização e elevando os índices de abortamento (1,2). Todavia o hiperandrogenismo intra-ovariano, principal suspeito da captura e excesso foliculares (25), características da SOP, parece ser também decorrente da produção androgênica pelas células da teca por uma via independente de insulina (26). Ainda não existe uma hipótese formada de como tais alterações endócrinas e metabólicas poderiam interferirir no processo de maturação e qualidade oocitárias, mas um microambiente folicular composto por substâncias como Hormônio Anti-Mulleriano (AMH), insulina, IGF-1, fatores de crescimento, citocinas, agentes oxidantes entre outros, em quantidades sub ou supra-fisiológicas poderiam, hipoteticamente, agir via interações folículo-folículo (25) e granulosa-oócito (27), afetando a dinâmica microtubular e o aparelho meiótico (28,29,30).

Sabe-se que o fuso celular oocitário é uma estrutura celular altamente dinâmica e extremamente sensível à ação de diversos fatores, como o envelhecimento, as mudanças térmicas, o suporte insuficiente de oxigênio durante o tempo de cultura, a manipulação oocitária, a exposição ambiental a diversos agentes tóxicos, entre outros (31,32,33,34). Tais fatores podem afetar o fuso, causando uma despolimerização da tubulina e o deslocamento de cromossomos do equador metafásico, gerando anomalias meióticas. Alguns autores evidenciaram que o tempo de cultivo após a maturação nuclear estar completa poderia promover o envelhecimento oocitário metafásico, que também seria um dos fatores relacionado ao aumento da incidência de anormalidades meióticas (35), o que justificou a realização de uma curva-padrão de MIV no sentido de estabelecermos o tempo médio de cultivo nas condições e meio de cultura utilizados no presente estudo, no qual a maioria dos oócitos atingiria a metáfase II. Desta forma, apenas os oócitos imaturos que atingiram a metáfase II após o tempo de cultivo pré-definido (19 +/- 1 hora e 4 +/- 0,5 hora, respectivamente para oócitos em estágio de vesícula germinativa e metáfase I) foram utilizados e analisados no presente estudo.

Ressaltamos que os nossos dados evidenciaram um elevado percentual de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, tanto no grupo controle (46,7%), como no grupo de estudo (57,1%). Não dispomos de dados na literatura avaliando a incidência de anomalias meióticas em oócitos humanos, maturados *in vitro,* obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas.

Alguns autores realizando análise citogenética de oócitos em metáfase II, não fertilizados após a realização de fertilização *in vitro* convencional (FIV), não observaram diferença entre a incidência de aneuploidias, diploidias e cromossomos prematuramente condensados quando compararam pacientes com SOP (24,6 % de anormalidades) e com infertilidade secundária a fator tubário (27% de anomalias cromossômicas) (4). Apesar da

incidência de anomalias cromossômicas oocitárias nas portadoras de SOP encontrada por Sengoku e Tamate (1997) (24,6 %) ser inferior à observada no nosso estudo (57,1%), ressaltamos que, tanto o material utilizado, quanto as metodologias empregadas foram distintas, impossibilitando a adequada comparação dos dados obtidos. A não realização da análise do fuso meiótico oocitário pode ter resultado na subestimativa da proporção de anomalias meióticas, o que precisa ser avaliado melhor.

Encontramos um único estudo publicado avaliando a incidência de anomalias do fuso meiótico e configuração cromossômica em oócitos humanos maturados *in vitro*, obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas, evidenciando, respectivamente, 43,7% e 33,3% de anormalidades (36). Todavia, estes oócitos analisados foram obtidos em ciclos não estimulados com gonadotrofinas. Como se postula um potencial papel deletério da estimulação ovariana com gonadotrofinas, na dinâmica do citoesqueleto e competência oocitária (37), é possível que a incidência de anomalias meióticas seja maior em oócitos maturados *in vitro* em ciclos estimulados do que naqueles não estimulados, o que precisa ser mais bem avaliado por meio de estudos utilizando metodologia pertinente. Este mesmo estudo comparou a incidência de anormalidades meióticas entre os oócitos maturados *in vitro*, oriundos de ciclos não estimulados, com os maturados *in vivo*, obtidos em ciclos estimulados, objetivando determinar a possível influência da MIV no fuso meiótico e distribuição cromossômica oocitária de pacientes com SOP. Detectou-se uma proporção significativamente maior de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro*, sugerindo que a MIV tenha um efeito deletério sobre a organização do fuso celular e o alinhamento cromossômico oocitário. Desta forma, é provável que a incidência de anomalias meióticas obtidas no presente estudo (57,1%), no qual analisamos oócitos maturados *in vitro*, obtidos de ciclos estimulados com gonadotrofinas, seja superior tanto à observada nos oócitos maturados *in vitro*, utilizados rotineiramente nas TRA, como à evidenciada em oócitos maturados *in*

vitro, porém provenientes de ciclos não estimulados (36). Todavia, como comparamos oócitos de pacientes com SOP com os de pacientes com fator tubário e/ou masculino de infertilidade (grupo controle), ambos maturados *in vitro,* e encontramos uma tendência a maior incidência de anomalias meióticas nas portadoras de SOP, estes achados sugerem um possível comprometimento da qualidade oocitária ralacionada à SOP, e não apenas à MIV, o que deverá ser mais bem analisado aumentando a presente casuística. Neste sentido, o cálculo do número amostral necessário para suportar ou afastar a referida tendência a aumento da freqüência de anomalias meióticas nos oócitos maturados *in vitro,* obtidos em ciclos estimulados de portadoras de SOP, definido a partir da realização do presente estudo piloto, assume importância no sentido de podermos elucidar esta importante questão.

Os dados do presente estudo piloto não evidenciaram diferença significativa nas freqüências de anomalias meióticas entre estes os oócitos maturados *in vitro* provenientes de ciclos estimulados de pacientes com SOP, quando comparados aos de mulheres com fator tubário e/ou masculino de infertilidade. Contudo, sugerem uma tendência a maior ocorrência de anomalias meióticas, caracterizadas por anormalidades do fuso e/ou distribuição cromossômica oocitárias, nos oócitos de pacientes com SOP, o que poderá ser elucidado ampliando-se a presente casuística. Se forem confirmados, estes achados podem apontar um possível papel destas anormalidades relacionadas à maturação nuclear oocitária, nas controversas menores taxas de fertilização observadas em pacientes com SOP submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida. Se não confirmados, sugerirão o possível envolvimento de fatores relacionados à maturação citoplasmática em detrimento da nuclear na etiopatogênese da piora da qualidade oocitária em portadoras de SOP.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a contribuição das funcionárias do laboratório de reprodução assistida do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo: Maria Cristina Picinato Medeiros de Araújo, Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Yamada Dantas, Roberta Cristina Giorgenon, Maria Auxiliadora Pádua Rosa e Sandra Viana, pelo apoio técnico dispensado para a realização do presente artigo.

Referências Bibliográficas

01 Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Hughes EG, Laven JSE, Macklon NS, Fauser BCJM. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod Update 2006;12(1):13-21.

02 Homburg R. Pregnancy complications in PCOS. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2006;20(2): 281-92.

03 Ludwig M, Finas DF, Al-Hasani S, Diedrich K, Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. Hum Reprod 1999;14(2):354-8.

04 Sengoku K, Tamate K, Takuma N, Yoshida T, Goishi K, Ishikawa M. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1997;12(3):474-7.

05 Regan L, Owen EJ, Jacobs HS. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage. Lancet 1990;336(8724):1141-4.

06 Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril 1997;68(6):1017-21.

07 Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 1995;10:1962–1967.

08 Tanbo T, Dale PO, Kjekshus E, Haug E, Abyholm T. Stimulation with human menopausal gonadotropin versus follicle-stimulating hormone after pituitary suppression in polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril 1990;53(5):798-803.

09 Tarlatzis BC, Grimbizis G, Pournaropoulos F, Bontis J, Lagos S, Spanos E, Mantalenakis S. The prognostic value of basal luteinizing hormone:follicle-stimulating

hormone ratio in the treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by assisted reproduction techniques. Hum Reprod 1995;10(10):2545-9.

10 Fauser BCJM. Molecular biology in reproductive medicine. 1st ed. New York: The Parthenon Publishing Group; 1999.

11 Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe DL. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. Biol Reprod 2000;63(1):251-8.

12 Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. Hum Reprod 2001;16(7):1464-8.

13 Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. Hum Reprod 2003;18(4):817-20.

14 Navarro PAAS, Liu L, Trimarchi JR, Ferriani RA, Keefe DL. Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation. Fertil Steril 2005;83 Suppl 1:1197-205.

15 Miyara F, Aubriot FX, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A, Herve F, Dumont-Hassan M, LeMeur A, Cohen-Bacrie P, Debey P. Multiparameter analysis of human oocytes at Metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. Hum Reprod 2003;18(7):1494-503.

16 The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2004;81:19–25.

17 Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. Dev Biol 1993;158(1):101-12.

18 Lwanga SK, Lemeshow S. Sample size determination in health studies: a practical manual. Geneva, WHO, 1991.

19 Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF 3th. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. J Clin Endocrinol Metab 2007;92(2):705-13.

20 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Shebl O, Tews G. Incomplete denudation of oocytes prior to ICSI enhances embryo quality and blastocyst development. Hum Reprod 2006;21(11):2972-7.

21 Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod 2002;17(4):1006-16.

22 Palomba S, Falbo A, Orio F Jr, Manguso F, Russo T, Tolino A, Annamaria C, Dale B, Zullo F. A randomized controlled trial evaluating metformin pre-treatment and co-administration in non-obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome treated with controlled ovarian stimulation plus timed intercourse or intrauterine insemination. Hum Reprod 2005;20(10):2879-86.

23 Wang JX, Davies MJ, Norman RJ. Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. Hum Reprod 2001;16(12):2606-9.

24 Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Tanbo T, Abyholm T. The impact of obesity and insulin resistance on the outcome of IVF or ICSI in women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod 2001;16(6):1086-91.

25 Jonard S, Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. Hum Reprod Update 2004;10(2):107-17.

26 Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. Trends Mol Med 2006;12(7):324-32.

27 Gosden RG. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. Mol Cell Endocrinol 2002;186(2):149-53.

28 LaRosa C, Downs SM. Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. Biol Reprod 2007;76(3):476-86.

29 Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma, X. Deficit of mitochondria- derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. Cell Res 2006;16:841-50.

30 Luberda Z. The role of gluthatione in mammalian gametes. Reprod biol 2005;5(1):5-17.

31 Mullen SF, Agca Y, Broermann DC, Jenkins CL, Johnson CA, Critser JK. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. Hum Reprod 2004;19(5):1148-54.

32 Hu Y, Betzendahl I, Cortvrindt R, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Effects of low O2 and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture. Hum Reprod 2001;16(4):737-48.

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

34 Navarro PAAS, Liu L, Keefe DL. *In vivo* effects of arsenite on meiosis, preimplantation development and apoptosis in the mouse. Biol Reprod 2004;70:980-985.

35 Liu L, Keefe DL. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. Hum Reprod 2002;17(10):2678-85.

36 Li Y, Feng HL, Cao YJ, Zheng GJ, Yang Y, Mullen S et al. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. Fertil Steril 2006;85(4):827-32.

37 Lee ST, Han HJ, Oh SJ, Lee EJ, Han JY, Lim JM. Influence of ovarian hyperstimulation and ovulation induction on the cytoskeletal dynamics and developmental competence of oocytes. Mol Reprod Dev 2006;73(8):1022-33.

Legendas de tabelas e ilustrações

Tabela 1 - Caracterização das pacientes, que apresentaram oócitos analisados, dos grupos de estudo (SOP) e controle quanto à idade, índice de massa corporal e FSH basal.

Variável	**Grupo SOP**	**Grupo controle**
Número de pacientes	8	12
Mediana da Idade (anos)	33 (28 a 37)	35 (24 a 38)
Índice de Massa Corporal (Kg/m^2)*	24,5 ± 3,9	23,6 ± 3,1
*FSH basal (mUI/ml)**	5,4 ± 2,5	4,75 ± 2,0

NOTA - * Valores expressos em média + Desvio-Padrão

SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos.

Tabela 2 – Taxa de maturação *in vitro,* segundo análise por microscopia óptica, nos grupos SOP e Controle.

Oócitos	Grupo SOP		Grupo Controle	
	Número	%	Número	%
Imaturos submetidos a MIV	34	100	56	100

MII provenientes de MIV	17	50,0*	24	42,9*

NOTA: MII – Oócito em estágio de metáfase II; MIV – Maturação *In Vitro*; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo).

***** Valor de p = 0,522 (sem significância estatística)

Tabela 3 – Distribuição dos oócitos em metáfase II após Maturação *In Vitro* entre portadoras de SOP e controle quanto à normalidade meiótica.

Oócitos	Grupo SOP		Grupo Controle	
	Número	%	Número	%
MII analisáveis após MIV	14	100	15	100
MII normais	6	42,9*	8	53,3*
MII anormais	8	57,1*	7	46,7*

NOTA: MII – Oócito em estágio de metáfase II; MIV – Maturação *In Vitro*; SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos (grupo de estudo). *Valor de p = 0,71 (sem significância estatística)

Figura 1 – Fluxograma de pacientes participantes e do respectivo material utilizado no projeto de pesquisa

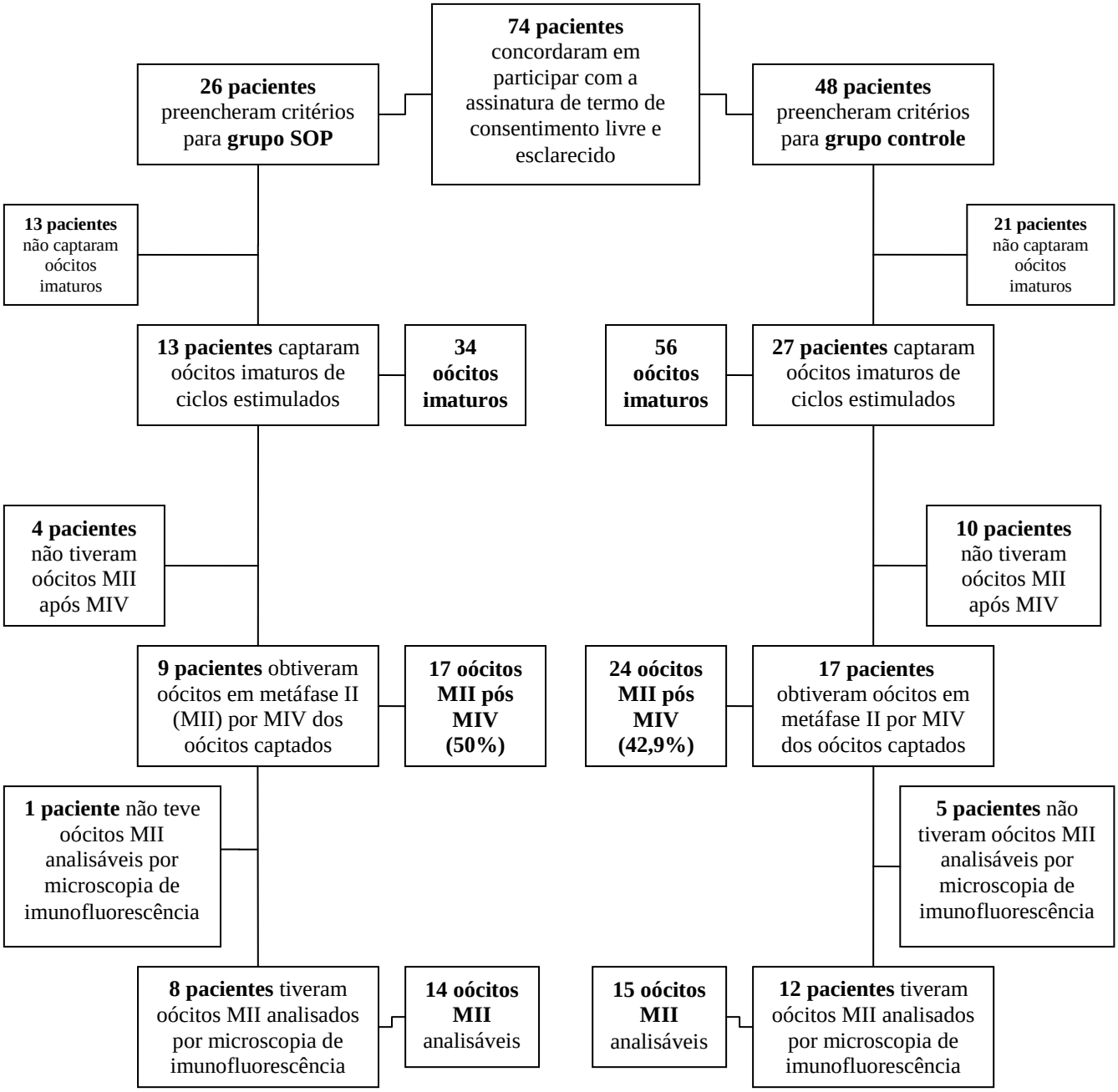
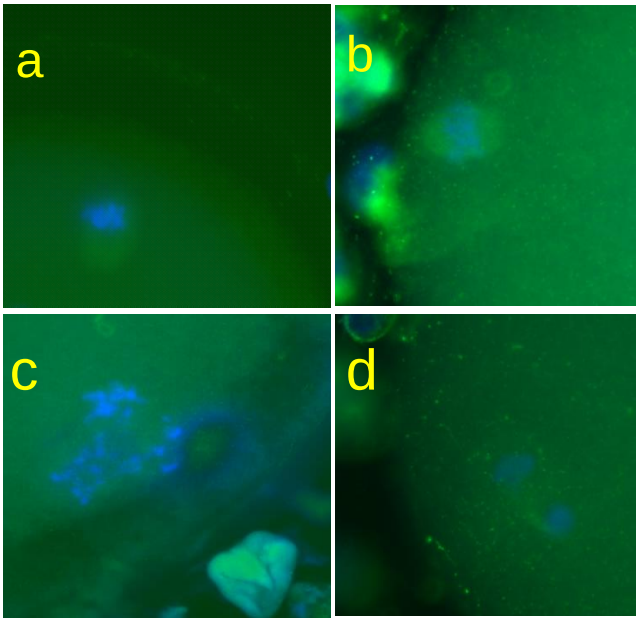



Figura 2 - Imagens representativas de fusos e cromossomos de oócitos de portadoras de SOP e controle por microscopia de imunofluorescência. Fusos meióticos em metáfase II foram corados por anticorpo anti-b-tubulina e cromossomos corados por Hoechst 33342. **a** e **b**) Oócitos de pacientes controle com fusos meióticos normais e cromossomos alinhados na placa metafásica do fuso; **c**) Oócito de paciente portadora de SOP com ruptura de fuso meiótico e distribuição cromossômica anormal; **d**) Oócito de paciente controle que sofreu ativação partenogenética.