

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**Maturação *in Vitro* de Oócitos de Mulheres com Síndrome dos  
Ovários Policísticos: Comparação entre dois Meios de Cultivo**

**Carlos Henrique Medeiros de Araujo**

**Ribeirão Preto**  
**2007**

**CARLOS HENRIQUE MEDEIROS DE ARAUJO**

**Maturação *in Vitro* de Oócitos de Mulheres com Síndrome dos  
Ovários Policísticos: Comparaçao entre dois Meios de Cultivo**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia - Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profª.Drª. Rosana Maria dos Reis.

**Ribeirão Preto  
2007**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Carlos Henrique Medeiros de

Maturação *in Vitro* de Oócitos de Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos: Comparação entre dois Meios de Cultivo. Ribeirão Preto, 2007.

108 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia - Biologia da Reprodução.

Orientadora: Reis, Rosana Maria dos

1. Técnicas de Reprodução Assistida. 2. Maturação *in Vitro*.
3. Síndrome dos Ovários Policísticos. 4. Meios de Cultivo

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Carlos Henrique Medeiros de Araujo

Maturação *in Vitro* de Oócitos de Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos: Comparação entre dois Meios de Cultivo.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia - Biologia da Reprodução.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Maria dos Reis

Aprovado em:

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**À minha família, Maria Cristina e Júlia pelo  
incentivo, carinho e companheirismo no  
cumprimento de mais uma etapa de minha formação  
acadêmica e científica.**

**Aos meus pais Alzira e Edílson.**  
*In memorium*

**Ao Antônio Carlos e Maria Lúcia pelo apoio e  
incentivo aos meus projetos.**

**À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Maria dos Reis pela  
orientação, oportunidade e aprendizado  
ao longo da realização desse trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

A todas as mulheres que colaboraram com esse estudo.

A todas as pessoas que compõem o Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pelo apoio na realização desse estudo e pela oportunidade do aprendizado.

Aos meus professores da Pós - Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela dedicação e orientações.

Em especial a Bióloga Maria Cristina Picinato Medeiros de Araujo, pelo apoio técnico no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pelo apoio técnico, em especial a Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos e Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Taisa Abade, Sandra Cavichiollo Vianna, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Maria Albina Verceze Bortolieiro, Roberta Cristina Giorgenon, Ilza Alves de Rezende Mazzocato, Reinaldo Vicente Tavares e Ricardo Perussi e Silva.

À Daniela Nogueira pelo apoio em várias etapas da realização desse trabalho, com orientações, conhecimentos científicos e amizade.

Aos doutores Luís Alberto Manetta e Stael Porto Leite pela realização dos procedimentos de ultra-som das mulheres.

Aos amigos dos cursos de Pós Graduação em especial a Fernanda Vieira Rodovalho Callegari, pelo apoio em várias etapas da nossa caminhada acadêmica e científica e Wellington de Paula Martins pela amizade e colaboração em várias etapas desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá pelo apoio, orientação e acompanhamento desde o início da realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani pela oportunidade de realização desse trabalho no Setor de Reprodução Humana e pelas orientações nos cursos da Pós - Graduação e pela participação da banca de doutorado.

Ao Prof. Dr. Gustavo Salata Romão pelo apoio e orientações desde a etapa inicial da elaboração do projeto de pesquisa, pela participação na banca de qualificação e pelas sugestões valiosas no desenvolvimento desse estudo.

Aos professores Adriano Bueno Tavares, George Dantas de Azevedo, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Rui Alberto Ferriani, Rosana Maria dos Reis pela participação da banca de doutorado e pelas valiosas contribuições na elaboração final dessa tese.

## RESUMO

**Araujo, C.H.M.** Maturação *in Vitro* de Oócitos de Mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos: Comparação entre dois Meios de Cultivo. 2007. 108p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

**Objetivo:** Comparar a eficácia dos meios de cultivo HTF (Human Tubal Fluid) e TCM 199 (Tissue Culture Medium) na maturação *in vitro*.

**Métodos:** Estudo experimental controlado e randomizado no qual foram avaliadas as taxas de maturação oocitária, fertilização, clivagem e produção de embriões de boa qualidade em 23 ciclos não estimulados de maturação oocitária, com 119 oócitos coletados, de 13 mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. Os oócitos de cada paciente foram transferidos randomicamente para cada um dos meios de cultivo sendo que, 61 (51%) foram colocados no meio TCM 199 e 58 (49%) no meio HTF. Os dois meios de cultivo receberam suplementação hormonal.

**Resultados:** Diferenças significativas foram encontradas entre os meios de cultivo TCM 199 e HTF em relação à taxa de maturação oocitária (82% vs. 56.9%, p = 0.005), taxa de fertilização (70% vs. 39.4%, p = 0.007) e taxa de produção de embriões de boa qualidade (81.3% vs. 41.7%, p= 0.023).

**Conclusão:** O meio de cultivo HTF embora seja utilizado para manutenção de embriões em técnicas de fertilização assistida e em procedimentos de maturação *in vitro* com ciclos estimulados, não é o meio mais apropriado para maturação de oócitos obtidos de mulheres com Síndrome dos Ovários policísticos em ciclos não estimulados.

**Palavras Chave:** Técnicas de Reprodução Assistida, Maturação *in Vitro*, Meios de Cultivo, Injeção Intra-Citoplasmática de Espermatozóides; Síndrome dos Ovários Policísticos e Síndrome da Hiperestimulação Ovariana.

## ABSTRACT

**ARAUJO, C.H.M.** Oocytes *In Vitro* Maturation of Women with Polycystic Ovarian Syndrome: Comparison Between Two Culture Medium. 2007. 108p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

**Objective:** Compare oocytes human culture in human tubal fluid (HTF) and Tissue Culture Medium (TCM 199) in *vitro* maturation cycles.

**Methods:** Randomized controlled trial which oocyte maturation, fertilization, cleavage rates and embryo quality in 23 *in vitro* maturation cycles no stimulation were evaluated, resulting in 119 oocytes retrieved from 13 patients with polycystic ovarian syndrome. The oocytes from each patient were assigned randomly to the two culture media, 61 (51%) to the TCM 199 and 58 (49%) to the HTF using the same hormonal supplementation.

**Results:** Significant differences were observed between TCM 199 and HTF regarding maturation rate (82% vs. 56.9%, p = 0.005), fertilization rate (70% vs. 39.4%, p = 0.007) rates and embryo quality (81.3% vs. 41.7%, p= 0.023).

**Conclusion:** The HTF medium, although widely employed for oocyte fertilization and embryo maintenance in IVF techniques, is not an appropriated medium to maturation oocytes obtained from PCOS patients in non - stimulated cycles.

**Keywords:** assisted reproductive techniques; *in vitro* maturation; culture medium, intracytoplasmatic sperm injection; polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Variação do acúmulo intracelular do complexo MPF ao longo do processo de maturação oocitária .....	17
<b>Figura 2:</b> Subfases da prófase I: Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno, Diplóteno e Diacinese .....	19
<b>Figura 3:</b> Processo de maturação folicular: Do folículo primordial ao folículo pré – ovulatório.....	21
<b>Figura 4:</b> Diferentes estágios de maturação folicular (folículo primordial e folículo antral) e os cortes histológicos dos mesmos.....	22
<b>Figura 5:</b> Folículo pré - ovulatório e o corte histológico do mesmo .....	22
<b>Figura 6:</b> Fertilização do oócito secundário pelo espermatozóide .....	25
<b>Figura 7:</b> Esquema da gametogênese: (a) oogênese e (b) espermatogênese para células germinativas diplóides.....	26
<b>Figura 8:</b> Classificação dos embriões de acordo com Scott et al., 2000 .....	41
<b>Figura 9:</b> Protocolo dos procedimentos de Maturação <i>in Vitro</i> .....	42

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>Tabela 1:</b> Composição química dos meios de cultivo HTF e TCM 199 .....	43
<b>Tabela 2:</b> Comparação entre os meios de cultivo para taxa de maturação, fertilização e clivagem .....	46
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre a qualidade dos embriões provenientes de oócitos maturados nos dois meios de cultivo.....	47
<b>Tabela 4:</b> Comparações entre a taxa de formação de embriões de boa qualidade e de transferência de embriões .....	48
<b>Tabela 5:</b> Resultados obtidos em diferentes estudos avaliando ciclos não estimulados de MIV em mulheres com SOP .....	54
<b>Gráfico 1:</b> Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos procedimentos de Maturação <i>in Vitro</i> para os meios de cultivo HTF e TCM 199 .....	48

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.**

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de ética em Pesquisa
HTF	Human Tubal Fluid - Fluido Tubário Humano
TCM 199	Tissue Culture Médium – Meio para Cultura de Tecidos
MPF	Fator Promotor da Maturação
Cdc	Proteína Quinase
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
ATP	Adenosina Trifosfato
CP	Corpúsculo Polar
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
MIV	Maturação Oocitária <i>In Vitro</i>
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
ICSI	Injeção Intra-Citoplasmática de Espermatozóides
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
mm Hg	Milímetros de Mercúrio
mm	Milímetro
°C	Graus Celsius
UI/mL	Unidades Internacionais por Mililitro
WHO	Organização Mundial de Saúde
HEPES	Hydroxy Ethyl Piperazine Ethane Sulfonic Acid

µL	Microlitro
SSS	Soro Sintético Substituto
US	Ultra – Sonografia
M	Menstruação
CO	Captação Oocitária
TE	Transferência Embrionária
µg/mL	Microgramas por Mililitro
mg/mL	Miligramas por Mililitro
NS	Não Significativo Estatisticamente
IL	Interleucinas

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>CASUÍSTICA e MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>
1- Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CEP .....	70
2- Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo CONEP .....	71
3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	73
4- Artigo 1: Human tubal fluid is not an appropriate medium to be used during oocyte maturation .....	75
5- Artigo 2: Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana.....	93

---

---

# **INTRODUÇÃO**

---

A gametogênese humana é o fenômeno biológico de formação dos gametas femininos e masculinos. Pode ser caracterizada por três etapas distintas denominadas multiplicação, crescimento e maturação, que se diferenciam em vários aspectos na gametogênese feminina e masculina.

## Oogênese

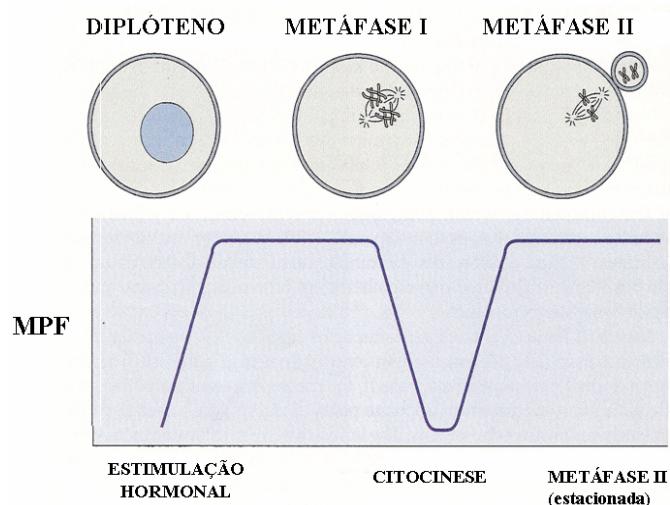
A gametogênese feminina é denominada oogênese ou ovogênese e inicia-se no interior dos folículos ovarianos, que são as unidades funcionais e fundamentais dos ovários. Tem início ainda na vida intra-uterina, quando as células germinativas, derivadas do embrião feminino, passam pela fase de multiplicação até aproximadamente a 15<sup>a</sup> semana da vida fetal (HOUILLON, 1972), sofrendo divisões mitóticas dando origem as oogônias. As oogônias a seguir passam por uma fase de crescimento dando origem aos oócitos primários. Os oócitos primários passarão pelas fases de maturação que correspondem às divisões meióticas. Nas recém-nascidas, parte deste processo de maturação já ocorreu, isto é, a primeira divisão da meiose já se iniciou e o oóцитio primário encontra-se estacionado em prófase I na subfase de diplóteno (BUCCIONE, 1990).

Alguns estudos sugerem que o processo meiótico fica inibido pela ação de um fator inibidor da maturação do oóbito.

Além deste fator, também é importante à ação do fator promotor da maturação (MPF), que é um complexo protéico formado por duas subunidades denominado Cdc (proteína quinase) e ciclina, esta última proteína reguladora que controla a capacidade da Cdc fosforilar proteínas - alvo (SCOTT e HODGEN, 1990).

A atividade do MPF é controlada pelo padrão cíclico de acúmulo e degradação da ciclina, que é um de seus componentes. A montagem do dímero Cdc-ciclina, sua ativação e

posterior degradação são processos centrais que controlam o ciclo celular. A **Figura 1** mostra a variação do complexo MPF desde o estágio de diplóteno até a metáfase II, que são dois estágios em que a meiose fica estacionada ao longo do processo de maturação oocitária. A continuidade do ciclo celular a partir do estágio estacionário do diplóteno da prófase I é dependente de ação hormonal, assim como do aumento da concentração do complexo MPF. Ao final da primeira divisão da meiose a concentração do MPF diminui novamente e a meiose fica estacionada no estágio de metáfase II. A continuidade do processo ocorrerá com a fertilização e um novo aumento da concentração do MPF.



**Figura 1.** Variação do acúmulo intracelular do complexo MPF ao longo do processo de maturação oocitária.

No diplóteno da prófase I, os cromossomos estão duplicados e apresentam duas cromátides. Nessa fase podem ser observados os quiasmas (pontos de cruzamentos entre cromátides não - irmãs), devido à ocorrência do *crossing - over*.

O oócito neste estágio é identificado morfológicamente pela visualização da vesícula germinativa, que possui núcleo bem desenvolvido, imaturo e em final de prófase I.

A quebra da vesícula germinativa marcará a continuidade da meiose e do processo de maturação oocitária (VEECK, 1999). Os oócitos ficam neste estágio de prófase I (diplóteno)

até a mulher atingir a puberdade, sendo que o processo de maturação poderá se completar apenas a partir da adolescência por influência das gonadotrofinas hipofisárias.

Os ovários apresentam, nas mulheres recém – nascidas, uma média de um a dois milhões de folículos primordiais (SALHA *et al.*, 1998). Os folículos primordiais são unidades formadas por uma camada de células da granulosa achatadas que envolvem o oócito primário. A partir do folículo primordial formam-se o folículo primário, o secundário e o pré - antral, este último caracterizado pela proliferação de células da granulosa, que ficam evolvidas pelas células da teca.

Com o crescimento folicular, entre as células da granulosa é secretado um fluido que se acumula no espaço intersticial promovendo a formação da cavidade antral, caracterizando o folículo antral. Com a formação do antro, o oócito primário passa a ocupar uma posição deslocada para um dos lados do folículo, ficando rodeado por várias camadas de células, formando o *cumulus oophorus*.

O fluido folicular acumulado na cavidade antral é importante para a nutrição das células da granulosa e do oócito.

Em ciclos naturais, o desenvolvimento dos folículos antrais sofre influência do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), secretado pela hipófise anterior. Nesta fase os folículos tornam-se gonadotrofina - dependentes para seu desenvolvimento.

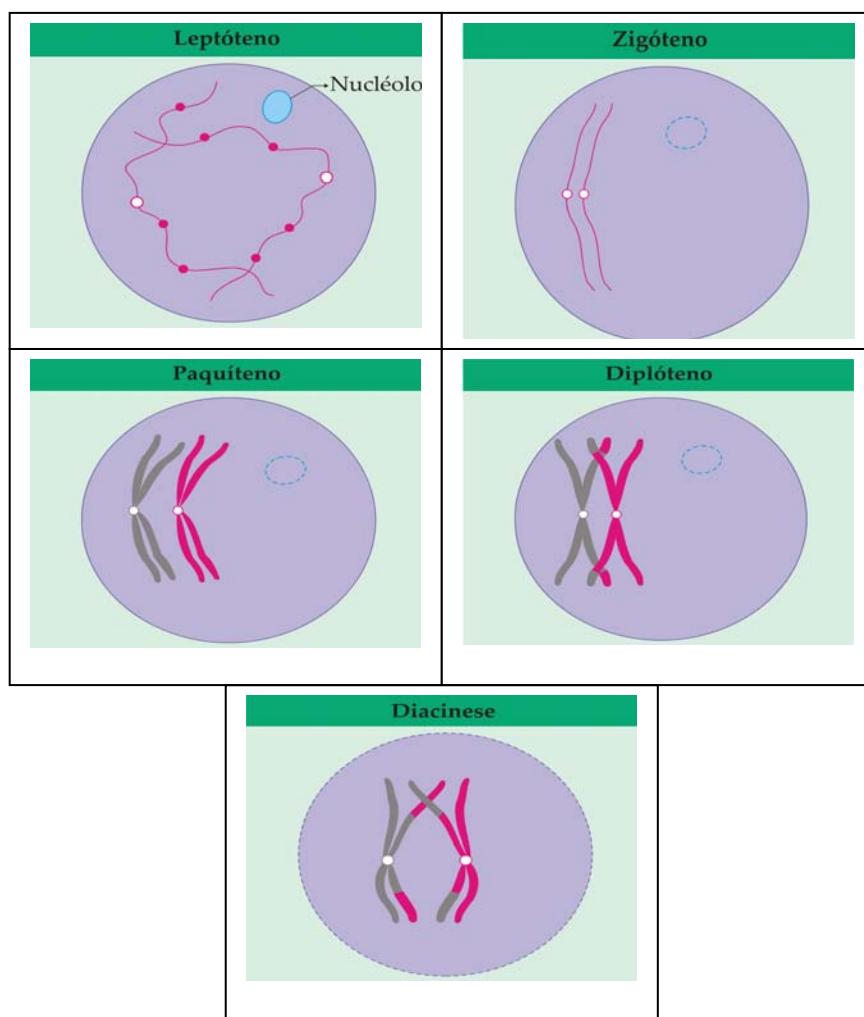
Sob a ação das gonadotrofinas, o folículo ovariano experimenta um crescimento exponencial, passando da fase antral à fase pré - ovulatória. Próxima à ovulação, o pico do Hormônio Luteinizante (LH) induz a quebra da vesícula germinativa e o processo de meiose é reiniciado (ADASHI, 1995).

O oócito primário que estava estacionado em diplóteno, que é a fase mais longa da prófase I, podendo durar ao redor de 40 anos, entra em diacinese, finalizando a prófase I. Os cromossomos passam para metáfase I e telófase I, terminando a primeira divisão da meiose com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do oócito secundário (MOORE e PERSAUD, 2000).

A **figura 2** mostra o comportamento dos cromossomos e do nucléolo nas subfases da prófase I, que é subdividida em leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese.

No *leptóteno*, os cromossomos estão duplicados e pouco condensados. No *zigóteno*, os cromossomos homólogos pareiam-se e ainda estão pouco espiralizados. No *paquíteno*, os cromossomos estão totalmente pareados, mais espiralizados e pode ocorrer o fenômeno de *crossing-over*, que é uma importante fonte de variabilidade genética nas populações. No *diplóteno*, os cromossomos estão mais condensados e cada par de homólogos aparece como quatro cromátides (tétrade ou bivalentes).

A visualização dos cromossomos é maior, assim como dos quiasmas. Nesta fase, observa-se a vesícula germinativa. Na *diacinese*, ocorre a terminalização dos quiasmas.



**Figura 2. Subfases da prófase I: Leptóteno, Zigóteno, Paquíteno, Diplóteno e Diacinese.**

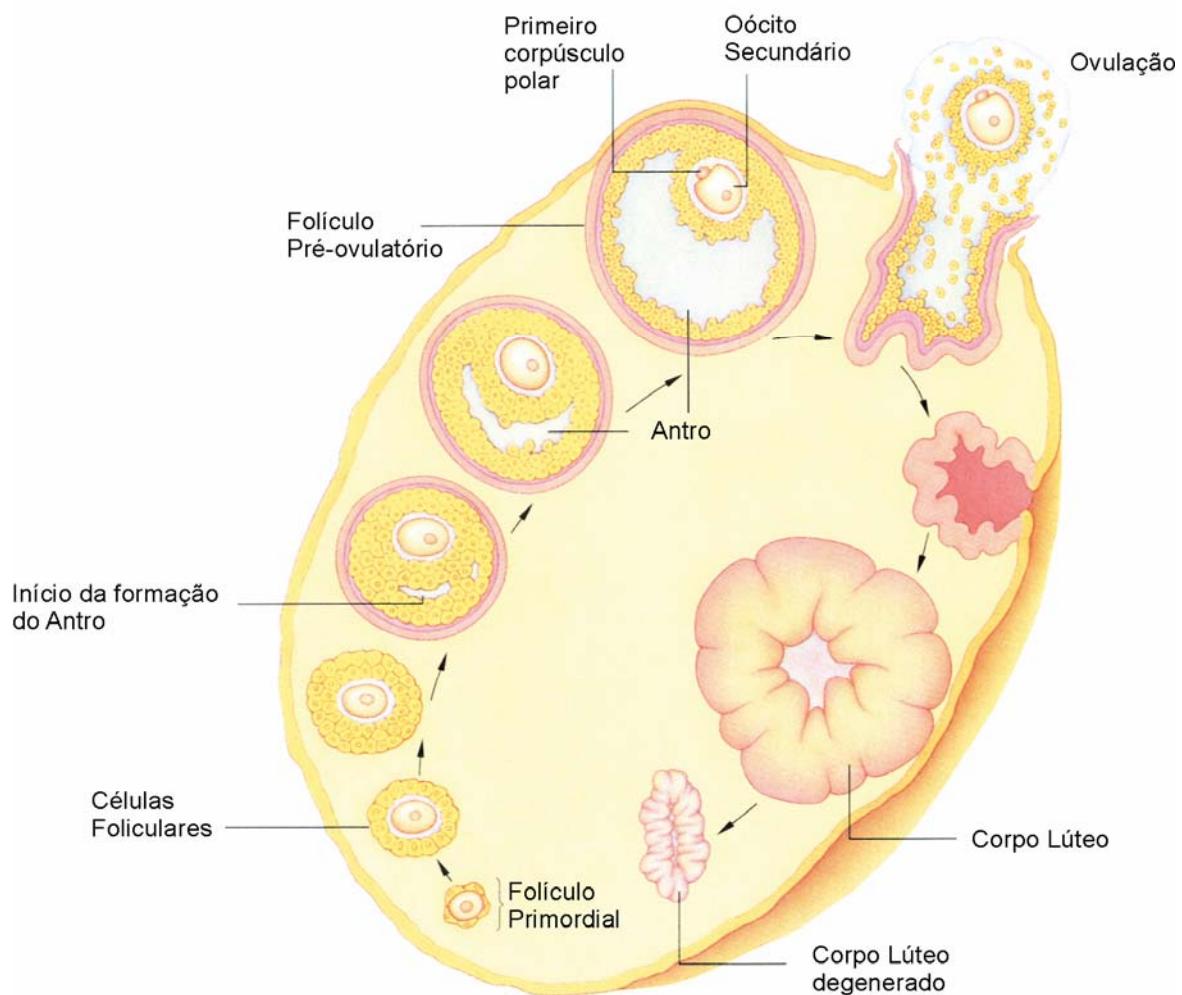
A seguir o oócito primário atinge a metáfase I em que os pares de cromossomos homólogos duplicados e pareados, num grau de condensação maior se distribuem na placa equatorial da célula.

A continuidade da maturação oocitária é caracterizada pela chegada do oócito primário na anáfase I. Nesta fase os pares de cromossomos homólogos que estão pareados migram para os pólos opostos da célula. A orientação da disjunção dos cromossomos homólogos para os pólos da célula é realizada pelo encurtamento das fibras do fuso meiótico. Esta separação dos cromossomos homólogos na anáfase I caracteriza a meiose como um processo reducional em que a ploidia da célula é reduzida à metade, de cromossomos 46 para 23 cromossomos, na espécie humana.

A redução do número de cromossomos à metade da ploidia nos gametas é fundamental para a estabilidade do número de cromossomos da espécie. A ploidia é reconstituída no momento da fecundação.

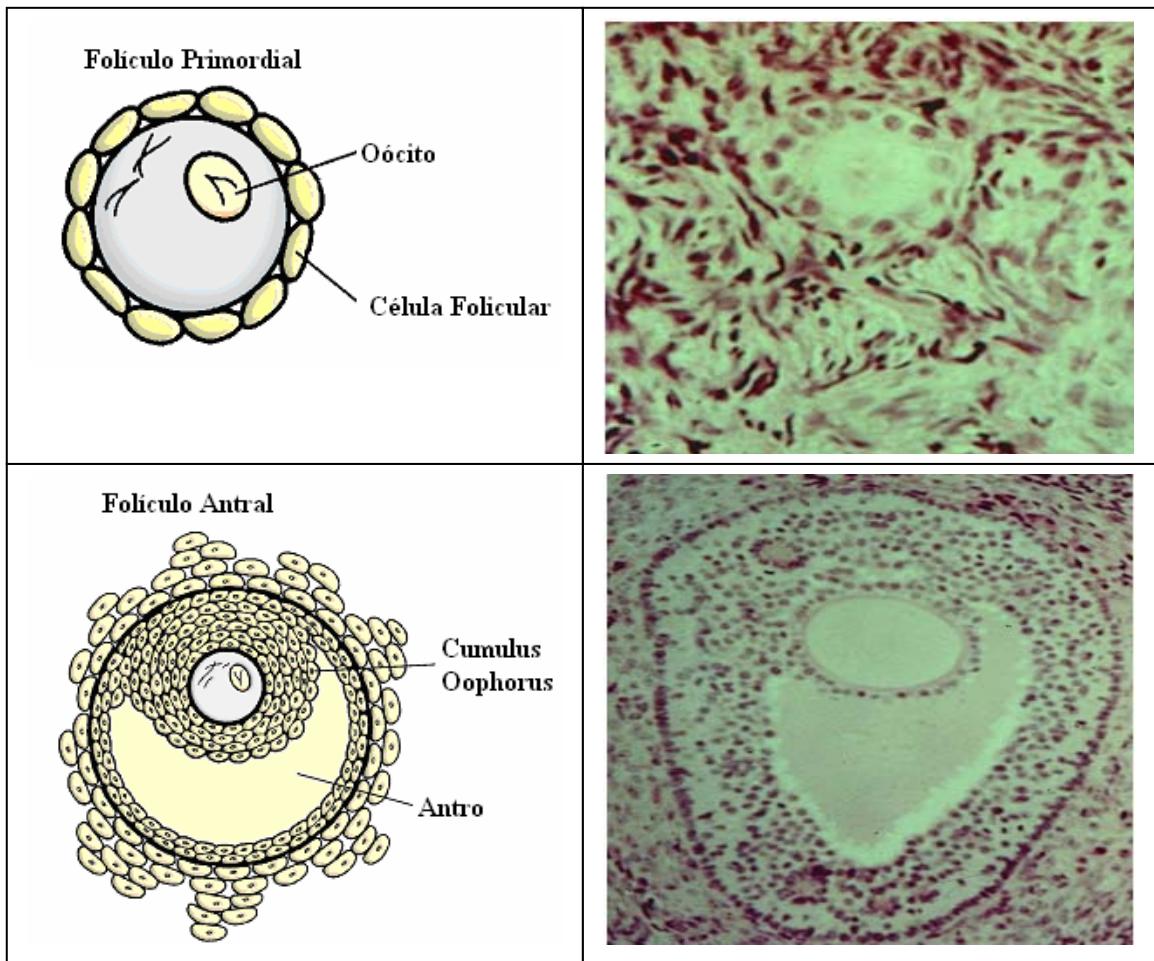
Quando o oócito primário atinge a telófase I, estará terminada a primeira divisão da meiose sendo formado o oócito secundário e um corpúsculo polar.

Além da ação na reinicialização da meiose, o LH também é importante para a formação do corpo lúteo a partir do folículo ovulatório (CHIAN *et al.*, 2003) que sofre degeneração se não ocorrer à fecundação. A **figura 3** mostra os vários estágios do processo de maturação folicular desde o folículo primordial, o crescimento folicular, a formação da cavidade antral (folículo antral), o folículo pré-ovulatório até a liberação do oócito secundário no fenômeno da ovulação.

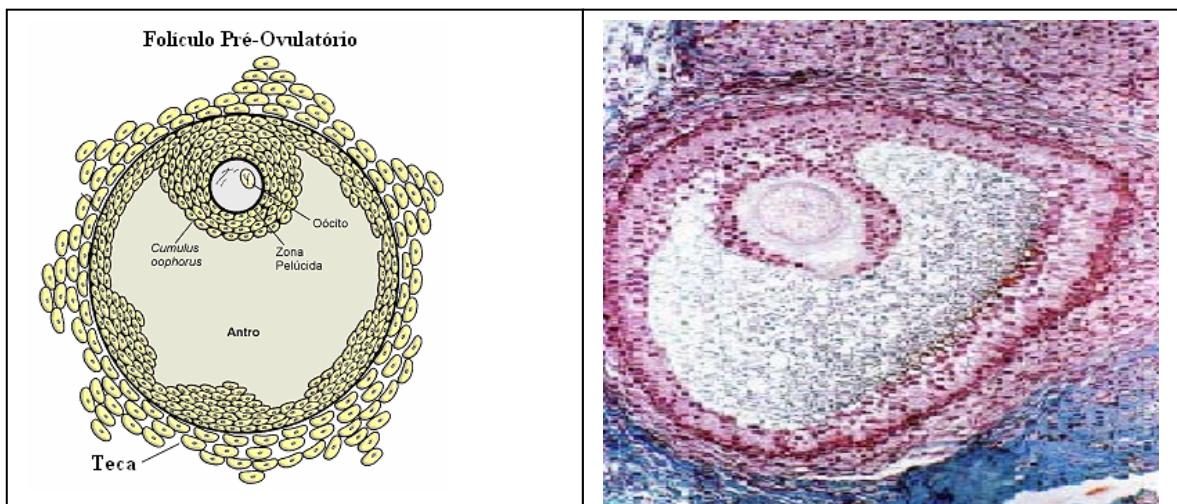


**Figura 3. Processo de maturação folicular: Do folículo primordial ao folículo pré - ovulatório, que em seguida passa pelo fenômeno da ovulação com a liberação do oócito secundário.** Adaptado de Biology a Human Emphasis. 3<sup>a</sup> edição, p. 606. Cecie Starr.

As figuras 4 e 5 mostram esquemas dos folículos em diferentes estágios de maturação, assim como seus cortes histológicos.



**Figura 4.** Diferentes estágios de maturação folicular (folículo primordial e folículo antral) e os cortes histológicos dos mesmos. Adaptado de Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility. 5<sup>a</sup> edição, p. 185 Leon Speroff; Robert H. Glass; Nathan Kase.



**Figura 5.** Folículo pré - ovulatório e o corte histológico do mesmo. Adaptado de Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility. 5<sup>a</sup> edição, p. 185 Leon Speroff; Robert H. Glass; Nathan Kase.

No ciclo ovariano, muitos folículos podem passar pelos processos de crescimento e diferenciação, mas é comum que apenas um deles chegue à ovulação na espécie humana, ocorrendo o processo de atresia para os folículos menores. Ao longo da vida da mulher, o processo de atresia é responsável pela redução de milhões de folículos. Uma mulher durante a vida reprodutiva produz a partir da menarca um oócito secundário a cada ciclo de ovulação, que em média ocorre a cada 28 dias, assim, aproximadamente 400 folículos vão efetivamente liberar o oócito secundário no período entre a menarca e a menopausa (SALHA *et al.*, 1998).

O oócito secundário, agora com um conjunto haplóide de cromossomos inicia a segunda divisão da meiose passando pela prófase II, atingindo a metáfase II.

A segunda divisão da meiose é novamente bloqueada em metáfase II e será concluída com a fertilização.

Ao longo da maturação oocitária a formação do primeiro corpúsculo polar é um sinal da finalização da meiose I, e a formação do segundo corpúsculo polar é um indicativo da fertilização do oócito.

## **Espermatogênese**

A gametogênese masculina é denominada espermatogênese e ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. É um processo contínuo na vida do homem após ser atingida a puberdade. A maturação das células germinativas para formação dos espermatozoides ocorre até o final da vida do indivíduo, em que cada espermatogônia dará origem a quatro espermatozoides.

As espermatogônias que foram formadas durante a vida fetal e estavam dormentes nos túbulos seminíferos, entram em fase de multiplicação na puberdade dando origem a muitas espermatogônias por mitoses sucessivas (MOORE e PERSAUD, 2000).

Após a fase de multiplicação, cada espermatogônia formada entra na fase de crescimento e dá origem a dois espermatócitos primários. Em seguida os espermatócitos primários passam pela fase de maturação, que corresponde às divisões de meiose.

Cada espermatócito primário ao sofrer a primeira divisão da meiose dá origem a dois espermatócitos secundários.

Esta primeira divisão da meiose é reducional, assim os espermatócitos secundários passam a ter metade do número de cromossomos, isto é, cada espermatócito secundário é uma célula haplóide, ao contrário dos estágios anteriores de espermatogônias e espermatócitos primários que são diplóides.

A continuidade do processo de maturação ocorre com a segunda divisão da meiose nos espermatócitos secundários que darão origem as espermátides, que também são células haplóides.

Cada espermátilde passa pelo fenômeno da espermogênese, que corresponde ao processo de diferenciação celular para formação dos gametas masculinos em sua forma final.

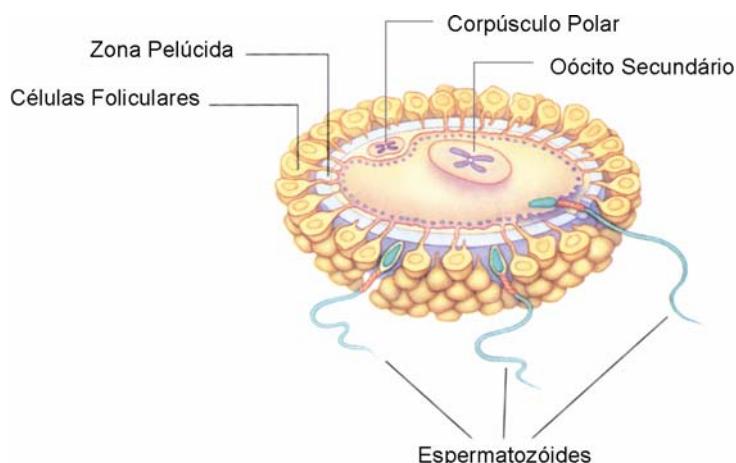
Durante a espermogênese as espermátides ganham o acrossoomo e a cauda. O acrossoomo está localizado na região anterior da cabeça do espermatozóide e corresponde a uma aglomeração de vesículas secretadas a partir do complexo de Golgi.

No acrossoomo, estão presentes várias enzimas, entre elas a hialuronidase que têm papel fundamental no momento da fecundação, pois a atividade dessa enzima favorece a entrada do espermatozóide através corona radiata e da zona pelúcida durante o processo de fertilização.

A cauda do espermatozóide é fundamental para a mobilidade do gameta masculino até o local da fertilização. Para a movimentação da cauda do espermatozóide, as mitocôndrias da cauda fornecem ATP (adenosina trifosfato), que é fonte de energia para a locomoção (OURA e TOSHIMORI, 1990).

A espermatogênese desde a origem das espermatogônias até a formação dos espermatozóides, passando pela espermatoxênese, ocorre em aproximadamente dois meses (MOORE e PERSAUD, 2000).

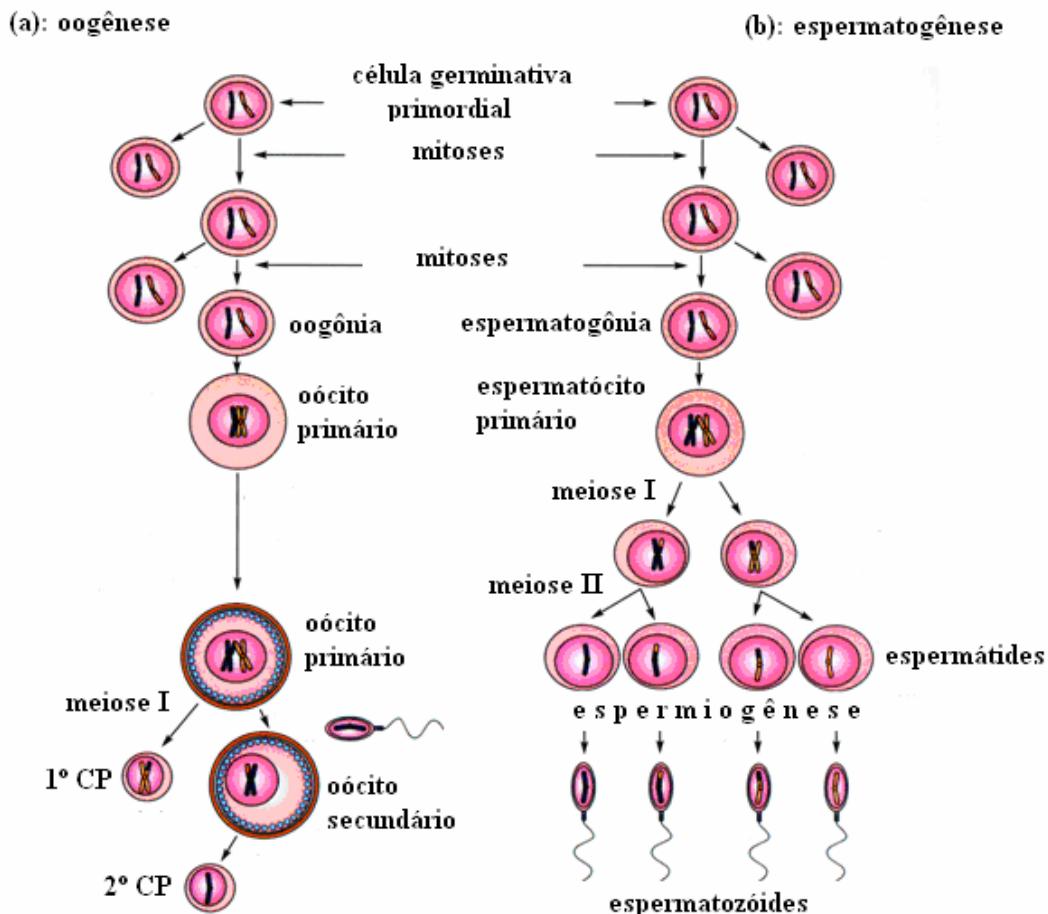
A **figura 6** mostra o momento da fertilização do oócito secundário com a penetração do espermatozóide através das células foliculares.



**Figura 6.** Fertilização do oócito secundário pelo espermatozóide. Adaptado de Biology a Human Emphasis 3<sup>a</sup> edição p. 609. Cecie Starr.

A gametogênese masculina diferencia-se da feminina em vários aspectos como na ocorrência do processo ao longo da vida do indivíduo, no número de gametas formados, nas etapas de multiplicação, crescimento e maturação, assim como nas diferenciações e maturações citoplasmáticas e nucleares dos gametas. Na oogênese, após o 5º mês de vida intra-uterina não ocorre mais à fase de multiplicação nem há formação de oócitos primários, em contraste com a formação de espermatócitos primários nos homens após a puberdade (MOORE e PERSAUD, 2000).

A **figura 7** mostra o processo da gametogênese para uma célula germinativa diplóide. Podem-se notar diferenças na maturação (meiose I e meiose II) entre oogênese (a) e espermatogênese (b), em relação ao número de gametas formados.



**Figura 7.** Esquema da gametogênese: (a) oogênese e (b) espermatogênese para células germinativas diplóides. O segundo corpúsculo polar (CP) será formado se ocorrer fertilização. Baseado em A célula 2001, cap. 21, p.255. Shirlei M. Recco - Pimentel, Odair Aguiar Junior.

## MIV e SOP

Nem sempre a gametogênese feminina ocorre como descrita anteriormente, pois existem vários casos de infertilidade na espécie humana.

Erros na ovulação causam inúmeros transtornos durante a vida reprodutiva da mulher, desde ciclos menstruais irregulares, sangramentos uterinos anormais e infertilidade conjugal.

A anovulação crônica hiperandrogênica, também denominada Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP) é a endocrinopatia ginecológica mais freqüente no menárgue, atingindo de 6 a 10% das mulheres nesta fase da vida. (FRANKS, 1995; FUTTERWEIT e MECHANICK

1988; ASUNCION *et al.*, 2000). A SOP representa 75% das causas de infertilidade por anovulação (Hull, 1987). Essa síndrome foi descrita inicialmente há 70 anos por Stein e Leventhal.

Em 1935, esses pesquisadores reconheceram e descreveram pela primeira vez a associação entre ovários policísticos bilaterais e o conjunto de sintomas constituídos por amenorréia, hirsutismo e obesidade, como uma entidade clínica única e a denominaram na época de Síndrome de Stein e Leventhal (STEIN e LEVENTHAL, 1935). A SOP tem inúmeras consequências clínicas entre as quais a infertilidade, alterações menstruais que podem variar de amenorréia a sangramento uterino disfuncional, hirsutismo e acne.

Com o passar do tempo, esta síndrome pode aumentar os riscos de aparecimento de doença cardiovascular e diabetes mellitus tipo 2, principalmente em mulheres com hiperinsulinemia e até mesmo risco elevado para o desenvolvimento de câncer de endométrio e de mama (SPEROFF *et al.*, 1994).

Na SOP, as mulheres apresentam uma resposta excessiva à estimulação ovariana devido ao fato dos ovários policísticos apresentarem vários folículos parcialmente desenvolvidos que estariam prontos para a estimulação propiciando uma típica resposta multifolicular. Os folículos ovarianos seriam altamente sensíveis ao FSH o que favorece um aumento dos receptores devido à alta concentração local de estrógenos e, como resultado haveria um desenvolvimento multifolicular associado com uma alta concentração de estrógenos circulante (BRINSDEN *et al.* 1995).

Mulheres quando submetidas a procedimentos de Reprodução Assistida que envolve indução de ovulação com gonadotrofinas e hCG correm o risco de manifestarem a Síndrome da Hiperestimulação Ovariana (SHO). A SHO compreende um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos e achados laboratoriais. A incidência dessa síndrome é bastante variável e podem ocorrer de forma leve com manifestações de distensão abdominal e desconforto,

náuseas, vômitos e diarréia, entre 8 a 23% das mulheres. As formas graves com manifestações de ascite, comprometimento respiratório, hipovolemia, hemoconcentração, distúrbios de coagulação e insuficiência renal, são menos freqüentes, entre 0,5 e 2% das mulheres.

A SHO é um achado freqüente em mulheres com SOP que são submetidas à superestimulação ovariana controlada em ciclos de FIV (REIS *et al.*, 2004; COSTELLO *et al.*, 2006; JABARA *et al.*, 2003; BALEN, 2000). Esse fenômeno é mediado por substâncias vaso ativas que provocam alterações no compartimento vascular.

O estímulo com hCG é um dos principais responsáveis pelo aumento da permeabilidade, levando a um extravasamento do líquido intravascular para o terceiro espaço.

Dentre os mediadores responsáveis por essa reação vascular em cascata destacam-se: a concentração sérica de estradiol elevada, de prostaglandinas, de histaminas, do sistema renina angiotensina sobre a esteroidogênese, das interleucinas (IL-6, IL-8, IL-2), das alterações do fator de crescimento endotelial vascular, da endotelina-1, da insulina sérica elevada e do sistema ovariano cinina-calicreína.

Pelo fato das mulheres com SOP apresentarem alto risco de manifestarem a SHO quando submetidas a indução da ovulação para os procedimentos tradicionais de Reprodução Assistida, como a Fertilização *in vitro* (FIV), o desenvolvimento de técnicas e de meios de cultivo para maturação oocitária *in vitro* (MIV) passaram a ser uma alternativa de tratamento para essas mulheres.

Os procedimentos de MIV apresentam vantagens sobre os programas de FIV. Os protocolos para MIV são mais simples para a paciente e para o médico, pois são reduzidos os números de consultas, o período de tratamento, as intervenções farmacológicas e os custos são menores para as mulheres do que os procedimentos tradicionais de Reprodução Assistida.

Pode-se realizar a captação de oócitos para a MIV sem o uso de drogas indutoras da ovulação. No entanto, a administração de hCG previamente a aspiração dos oócitos tem

proporcionado melhores resultados de maturação oocitária. A aplicação do hCG favorece a quebra da vesícula germinativa do oócito, isto é, a reinicialização da meiose e consequentemente a maturação oocitária. (CHIAN *et al.*, 2000).

O hCG e o LH apresentam semelhanças estruturais e no mecanismo de ação na esteroidogênese ovariana. Pelo fato do hCG apresentar um período de ação maior do que o LH, e interagir com receptores específicos de LH nas células da teca e da granulosa, sua utilização têm a finalidade de favorecer a produção e ativação de enzimas que atuam no processo de maturação oocitária.

Foi demonstrado que em células do *cumulus oophorus* de folículos antrais de bovinos com menos de 5 mm de diâmetro ocorre transcrição de RNA mensageiro para receptor de LH e que as mesmas podem responder ao estímulo de hCG (JIN *et al.*, 2005).

Esse achado dá mais credibilidade para o mecanismo de que o hCG inicia o processo de maturação de folículos antrais pequenos *in vivo* e facilita a reinicialização da meiose *in vitro*.

Muitas pesquisas são realizadas com objetivos de melhorar a eficiência e o potencial de maturação de oócitos *in vitro*.

Muitas informações sobre os procedimentos com oócitos humanos são obtidas a partir do tratamento de mulheres com problemas de infertilidade com drogas que provocam a estimulação de muitos folículos e a hiperovulação. (TROUNSON *et al.*, 1994).

Desde 1939 com as pesquisas de Pincus e Saunders existem registros de maturação de oócitos e em 1983 Veeck relata o nascimento do primeiro bebê gerado por meio de MIV de oócitos humanos. No Brasil, Amaral *et al.* (2003) relataram gravidez com nascimento de um bebê saudável a partir de procedimentos de MIV em paciente com infertilidade tubária.

Há diferentes meios para aspiração e para maturação de oócitos imaturos humanos como relatados por Chian *et al.* 2000, Cekleniak *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2003, Cooke *et al.*, 2002, Jaroudi *et al.*, 2001, Le Du A *et al.*, 2005.

Os meios denominados de HAM F10, TCM-199, P1, HTF, entre outros apresentam grande diversidade de fatores protéicos, energéticos, hormonais (progesterona, estrogênio, gonadotrofinas hipofisárias, hCG), soros e fatores de crescimento, assim como aminoácidos, vitaminas e sais minerais. É comum verificar que diferentes meios de cultivos utilizados para a maturação de oócitos são complementados com piruvato e antibióticos.

Pela grande diversidade dos meios de cultivo, não há um consenso sobre quais os melhores meios de cultivo ou sobre os nutrientes que devem ser adicionados a eles para garantir competência oocitária assim como seu desenvolvimento *in vitro*.

Considerando que o meio mais comumente utilizado para MIV é o TCM 199 (LE DU, 2005) e que o meio HTF é utilizado para a manutenção de embriões e também em procedimentos de FIV (JAROUDI *et al.*, 1977, CHEN SU *et al.*, 2000), o presente estudo comparou a eficácia destes dois meios de cultivo para maturação oocitária, fertilização e formação de embriões de boa qualidade, obtidos em ciclos não estimulados de mulheres com SOP.

---

---

## **JUSTIFICATIVA**

---

Os procedimentos de Reprodução Assistida exigem entre muitos requisitos o uso de medicamentos para indução da ovulação, que devido aos custos elevados, limitam o acesso de muitos casais com problemas de fertilidade conjugal a estas técnicas.

A MIV de oócitos de mulheres com SOP sem medicamentos indutores da ovulação é uma das alternativas para diminuir os custos para as mulheres nos procedimentos de Reprodução Assistida.

Além da contribuição no aspecto sócio - econômico a utilização da MIV de oócitos humanos em ciclos sem estimulação, visa contribuir com a diminuição de uma série de transtornos clínicos nas mulheres com SOP, como a Síndrome de Hiperestimulação Ovariana. As mulheres nestes casos podem apresentar aumento dos ovários e distúrbios hidroeletrolíticos, tendo como uma das principais complicações a hemoconcentração vascular e propensão a fenômenos tromboembólicos.

Deste modo, com os procedimentos de MIV utilizando técnicas de cultivo oocitário pretendemos contribuir para ampliar o acesso de casais inférteis aos procedimentos de Reprodução Assistida, com minimização de possíveis sintomas clínicos advindos da medicação para a indução de ovulação em mulheres com SOP.

---

---

## **OBJETIVOS**

---

**Objetivo Geral:**

- Comparar a eficácia dos meios de cultivo HTF e TCM199 para os procedimentos de maturação *in vitro*.

**Objetivos Específicos:**

Verificar se há diferenças entre os meios de cultivo HTF e TCM 199 em relação aos seguintes parâmetros:

- taxa de maturação dos oócitos
- taxa de fertilização dos oócitos.
- taxa de clivagem dos embriões
- qualidade dos embriões
- número de embriões transferidos

---

---

## **CASUÍSTICA e MÉTODOS**

---

### **Aspectos Éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no processo número 4060/2004 (**Anexo 1**) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde no processo 25000.81061/2004-22 (**Anexo 2**). As mulheres participantes deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participarem deste estudo (**Anexo 3**).

### **Tipo de Estudo e Cálculo Amostral**

Trata-se de um estudo experimental, com avaliação de meios de cultivo para a maturação oocitária *in vitro*. O cálculo do (**n**) amostral foi realizado utilizando uma taxa de maturação de 84% com o meio TCM 199 (CHIAN *et al.*, 2000), com alfa de 5% e um poder de teste de 80%, isto é, consideramos satisfatória uma taxa de maturação oocitária de pelo menos 64%. Para se detectar uma alteração de 20%, na taxa de maturação seriam necessários 60 oócitos por grupo.

### **Caracterização das Mulheres**

No período de agosto de 2004 a dezembro de 2005, foram realizados 23 ciclos de MIV de 13 mulheres, que apresentavam como causa de esterilidade a SOP. As mulheres apresentavam idade entre 26 e 36 anos (média de  $29,6 \pm 3,06$ ) com índices de massa corporal entre 21 e  $32,5 \text{ kg/m}^2$  (média de  $26,1 \pm 3,60$ ).

Em sete mulheres foi verificado resistência à insulina de acordo com índice QUICKI < 0,33 (CARMINA e LOBO, 2004).

As mulheres que participaram deste estudo foram selecionadas no Ambulatório de Infertilidade Conjugal do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios de inclusão e exclusão das mulheres foram os seguintes:

### **Critérios de Inclusão**

- Idade das mulheres: 18 a 38 anos.
- História clínica: Infertilidade conjugal em mulheres com SOP. O diagnóstico de SOP foi baseado nos critérios de Rotherdan 2004, com presença de pelo menos 2 dos seguintes critérios: oligo / amenorréia, hiperandrogenismo clínico e /ou laboratorial e achados ultra-sonográficos.
- Ausência de utilização de drogas indutoras da ovulação para recrutamento folicular no ciclo de obtenção de oócitos para maturação *in vitro*.
- Concordância da paciente em participar do estudo, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Critérios de Exclusão**

- Mulheres com outras doenças endócrinas que interfiram no eixo hipotálamo - hipófise - ovariano, como hiperprolactinemia, hiperplasia adrenal congênita de manifestação tardia, Síndrome de Cushing.

## **Monitorização do Ciclo Menstrual**

Para realizar a monitorização do ciclo menstrual, as mulheres foram induzidas a menstruar com a administração de acetato de medroxiprogesterona na dose de 10 mg/dia via oral por um período de 5 a 10 dias.

Entre o primeiro e o terceiro dia do ciclo menstrual as mulheres foram submetidas à ultra-sonografia transvaginal para verificar a presença ou não de cistos ovarianos. Novo exame de ultra-sonografia foi realizado no oitavo dia do ciclo para excluir um possível folículo dominante, na presença desse o ciclo seria suspenso. Nos 23 ciclos realizados não foi detectado nenhum folículo dominante nas 13 mulheres que participaram desse estudo. A captação dos oócitos sempre ocorreu entre o 10º e 14º dia do ciclo menstrual, quando era identificado ao exame ultra-sonográfico pelo menos dois folículos entre 8 a 10 mm de diâmetro médio. Foi realizado a administração de gonadotrofina coriônica recombinante (r-hCG) - Ovidrel® (Serono) na dose de 250 µg, 36 horas antes da captação oocitária.

## **Suplementação Hormonal e Preparação do Endométrio**

As mulheres receberam suplementação hormonal de estrogênio (valerato de estradiol) na dose de 2 mg/dia nos 4 primeiros dias do ciclo menstrual, 4 mg/dia nos 4 próximos dias do ciclo e 6 mg/dia até o dia da captação oocitária.

No dia da aspiração dos oócitos se o endométrio tivesse espessura menor do que 8 mm, a dosagem de estrogênio aumentava para 10 mg/dia e se fosse maior que 8 mm a dosagem permanecia 6 mg/dia. A utilização do estrogênio desde o primeiro dia do ciclo teve como objetivo melhorar a espessura do endométrio para a transferência embrionária, de acordo com estudo prévio com ciclos simulados para MIV com a utilização de diferentes

doses de estrogênio (MARTINS *et al.*, 2006). A suplementação hormonal de progesterona foi realizada com diidrogestrona (Duphaston – Solvay Pharmaceuticals - Holanda) a partir da realização da ICSI, na dose de 30 mg/dia. O diagnóstico de gravidez foi realizado por meio do teste  $\beta$ -hCG quantitativo 14 dias após a transferência dos embriões.

### **Coleta e Cultivo dos Oócitos**

No momento da coleta os folículos apresentavam entre 8 e 10 mm de diâmetro médio. A captação dos oócitos foi realizada com ultra-sonografia transvaginal com pressão negativa artificial constante de 80 mm Hg, por meio de uma bomba de sucção com controle eletrônico (Craft<sup>TM</sup> Suction Pump, Rocket Medical, England), com agulha de calibre 16, lúmen duplo (Cook). O material aspirado foi coletado em tubos cônicos estéreis de polipropileno.

Os oócitos captados foram lavados com o meio de cultivo HTF Hepes (HTF-h) – (Irvine Scientific) para remoção de sangue e debris. No momento da captação os oócitos foram classificados em relação ao estágio de maturação de acordo com a expansão das células do *cumulus oophorus*.

A seguir, foram distribuídos randomicamente em placas “nunc” com 1 mL dos meios de cultura TCM 199 e HTF e levados à uma incubadora com mistura gasosa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37 °C por um período de 24 a 48 horas para maturação. Foram geradas tabelas para distribuição aleatória dos oócitos, baseadas no número de oócitos captados. Para tal, foi utilizado o programa GraphPad StatMate, versão 1.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

Após 24h de maturação, todos os oócitos foram desnudados com solução de hialuronidase (H 4272 tipo IV-S, Sigma) na diluição de 80 UI/ml no tempo máximo de 30 segundos em seguida lavados com HTF suplementado com soro sintético substituto (SSS) a

10%. Os oócitos maduros foram caracterizados pela presença do primeiro corpúsculo polar. Os oócitos desnudados que se apresentavam imaturos, identificados pela presença da vesícula germinativa, foram colocados no mesmo meio de cultivo por mais 24 até 48 horas. Após 48 horas de cultivo, os oócitos que permaneciam imaturos foram considerados como falha de maturação. Os oócitos foram submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), utilizando-se o meio HTF com HEPES (Modified HTF medium HEPES Irvine Scientific) (PALERMO *et al.*, 1995; VAN STEIRTEGHEN *et al.*, 1995).

Os espermatozóides para a ICSI foram obtidos do ejaculado por masturbação e preparados pelo gradiente descontínuo de *PureSperm* (*PureSperm* Nidacon - International AB), utilizando-se duas concentrações de 45 e 90%.

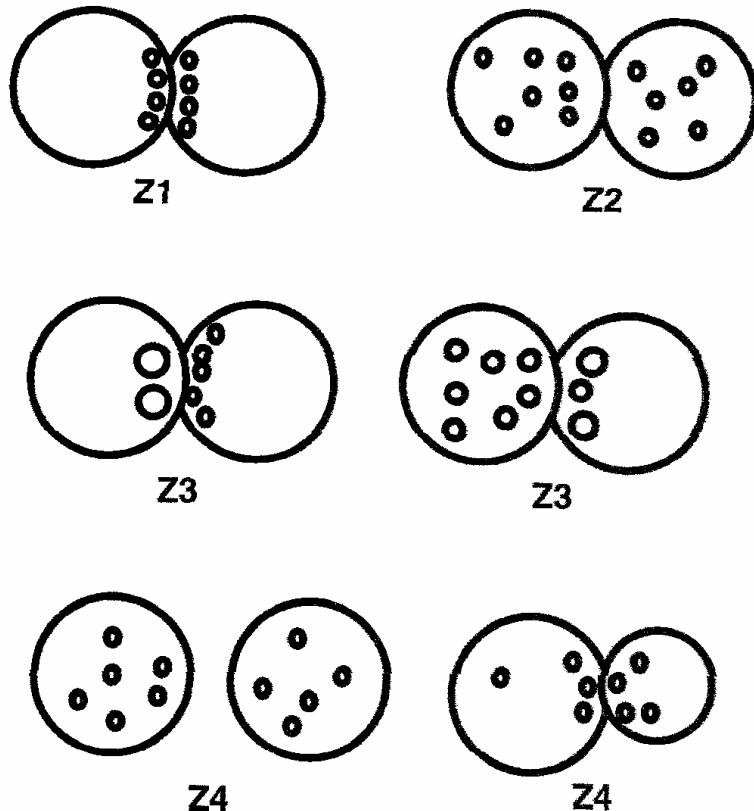
O critério de normalidade foi o estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO - 1992), com exceção da morfologia que foi avaliada pelos critérios de Kruger. (KRUGER *et al.*, 1986).

Após a ICSI, os oócitos injetados foram transferidos para uma placa de cultivo contendo microgotas de 25 µL de HTF suplementado com SSS a 10%. De 18 a 24 horas após a ICSI, era observada a ocorrência da fertilização. A fertilização é considerada normal com a identificação de dois pronúcleos.

De acordo com a classificação de Scott *et al.*, 2000, os embriões no dia da fertilização foram classificados quanto à morfologia dos pronúcleos (tamanho e justaposição) e disposição dos nucléolos sendo classificados como Z1, Z2, Z3 ou Z4. Os tipos Z1 e Z2 apresentam os pronúcleos de mesmo tamanho e justapostos. O tipo Z1 apresenta os nucléolos de mesmo tamanho e alinhados e o tipo Z2 apresenta os nucléolos de mesmo tamanho e dispersos. As características dos tipos Z1 e Z2 indicam embriões de boa qualidade. No tipo Z3 os pronúcleos aparecem de mesmo tamanho e justapostos, mas com nucléolos de tamanhos

diferentes podendo estar alinhados ou não. No tipo Z4 os pronúcleos aparecem com tamanhos iguais não justapostos ou de tamanhos diferentes e justapostos com nucléolos dispersos.

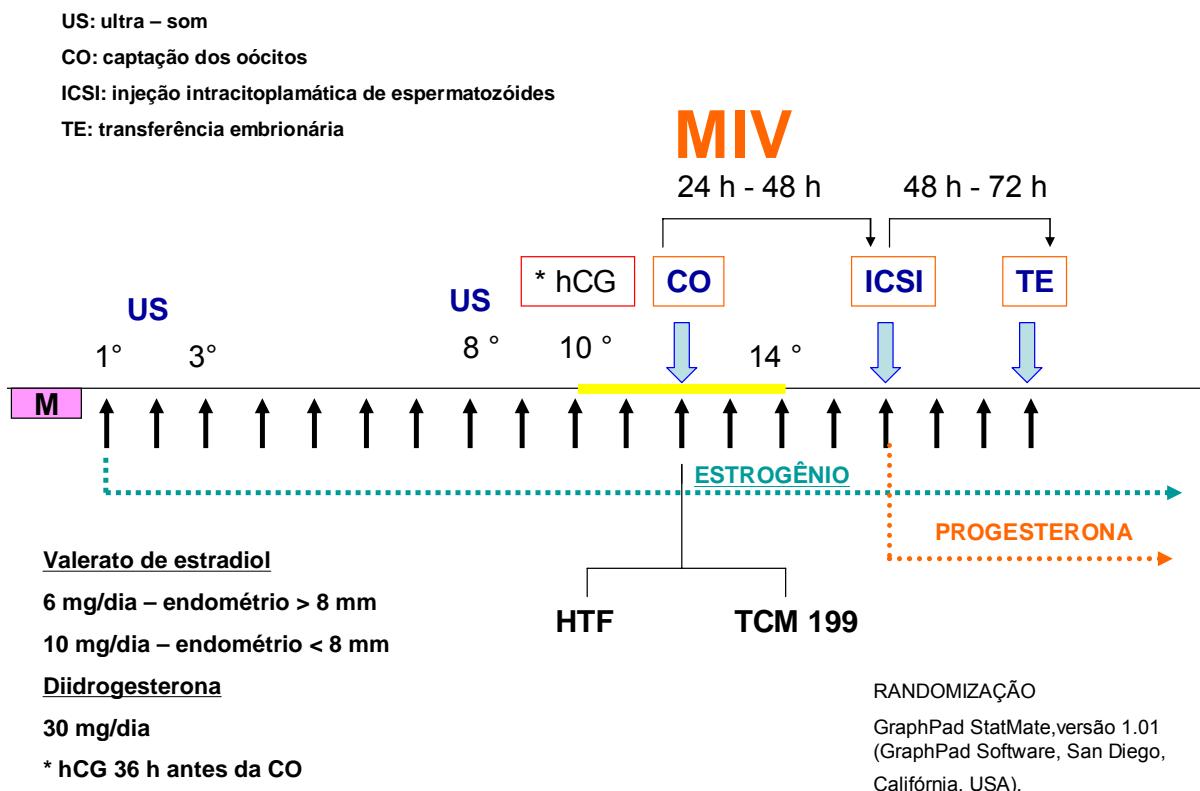
A **figura 8** mostra a classificação dos embriões (SCOTT *et al.*, 2000).



**Figura 8.** Classificação dos embriões de acordo com Scott *et al.*, 2000. Nessa figura, os círculos maiores representam os pronúcleos e os menores os nucléolos.

Foram transferidos preferencialmente os embriões classificados como Z1 ou Z2. Eventualmente, devido ao número escasso de embriões formados, também foram transferidos embriões Z3 e Z4.

O protocolo para os procedimentos de MIV foi estabelecido de acordo com a **figura 9**.



**Figura 9. Protocolo dos procedimentos de Maturação *in Vitro*.**

### Meios de Cultivo

O meio de cultivo deve oferecer o suporte bioquímico para a maturação oocitária com os nutrientes necessários para os oócitos adquirirem a competência para seu desenvolvimento. Em ciclos naturais a ação do FSH promove o desenvolvimento folicular desde o estágio de folículo secundário até a formação do folículo pré-ovulatório. Com a ação do LH, ocorre à quebra da vesícula germinativa e consequentemente os cromossomos atingem a metáfase I. Baseado na ação das gonadotrofinas *in vivo*, os dois meios de cultivo em nossos procedimentos receberam suplementação de 0,075 UI/mL de FSH recombinante - Gonal® (Serono) e 0,5 UI/mL hCG - Ovidrel® (Serono).

Os dois meios também receberam suplementação de SSS a 10%, os antibióticos estreptomicina e penicilina na concentração de 0,06 mg/mL. O meio de cultivo TCM 199 foi suplementado também com piruvato na concentração 22 µg/mL, que é um importante suplemento energético da via glicolítica para produção de ATP.

A **tabela 1** mostra a composição dos nutrientes presentes nos dois meios de cultivo para maturação oocitária, assim como as complementações de piruvato, antibióticos, hormônios e SSS. Os meios diferem-se quanto à natureza e concentração dos nutrientes como sais minerais, nucleotídeos energéticos, aminoácidos, vitaminas, colesterol, monossacarídeos estruturais e energéticos, antibióticos e bases nitrogenadas.

**Tabela 1: Composição química dos meios de cultivo HTF e TCM 199**

Composição Química	HTF (g/L)	Suplementação	TCM 199 (g/L)	Suplementação
Acetato de sódio	-		0.05	
Adenosina monofosfato 2 Na	-		0.00024	
Adenosina trifosfato 2 Na	-		0.01	
Aminoácidos	-		20 types	
Bicarbonato de sódio	2.100		2.200	
Cloreto de cálcio 2 H <sub>2</sub> O	0.3		0.265	
Cloreto de potássio	0.36		0.4	
Cloreto de sódio	5.900		0.68	
Colesterol	-		0.0002	
Desoxirribose	-		0.0005	
estreptomicina - SO <sub>4</sub>	0.05		-	
Vermelho de fenol	0.005		0.0213	
Fosfato de potássio	0.05		-	
Fosfato de sódio	-		0.122	
Glicose	0.5		1.0	
Glutationa reduzida	-		0.00005	
Guanina HCl	-		0.0003	
Hipoxantina	-		0.0003	
L-glutamina	-		0.1	
Lactato de sódio	2.400		-	
Nitrato férrego	-		0.00072	
Penicillina	0.06		-	0.06
Piruvato de sódio	0.036		-	0.022
Polioxietilenosorbitol	-		0.02	
Ribose	-		0.0005	
Adenina sulfato	-		0.01	
Sulfato de magnésio	0.024		0.9767	
Timina	-		0.0003	
Uracila	-		0.0003	
Vitaminas	-		17 types	
Soro Sintético Substituto	-	100 ml/L	-	100 ml/L
rFSH	-	0.075 IU/mL	-	0.075 IU/mL
rHCG	-	0.5 IU/mL	-	0.5 IU/mL

## **Análise Estatística**

As variáveis taxa de maturação oocitária, taxa de fertilização, taxa de clivagem, taxa de embriões de boa qualidade ( $Z1 + Z2$ ) e número de embriões transferidos foram comparados entre os dois meios de cultivo e analisadas de acordo com o teste exato de Fisher (*GraphPad Prism 4, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*), sendo considerado significativo  $p < 0.05$ .

A taxa de maturação foi definida pela relação entre os oócitos que atingiram o estágio de metáfase II e o total de oócitos captados. A taxa de fertilização é a relação entre os oócitos fertilizados e aqueles que atingiram o estágio de metáfase II. A taxa de clivagem é definida como a relação entre os embriões formados e os oócitos que foram fertilizados. A taxa de embriões de boa qualidade foi definida de acordo com os critérios de Scott *et al.*, 2000.

---

---

## **RESULTADOS**

---

Dos 23 ciclos de MIV realizados com 13 mulheres que apresentam SOP, foram analisados 119 oócitos em estágio de vesícula germinativa ou em metáfase I. Os oócitos captados foram randomicamente distribuídos nos meios de cultivo HTF e TCM 199. O meio de cultivo HTF recebeu um total de 58 oócitos e o meio de cultivo TCM 199 recebeu 61 oócitos (**tabela 2**).

Houve melhor maturação oocitária no meio TCM199 em relação ao meio HTF ( $p = 0,0048$ ). No meio HTF a taxa de maturação foi de 56,9 % com 33 oócitos atingindo o estágio de metáfase II, sendo que 16 atingiram a maturação em 24h e 17 em 48h. No meio TCM 199 a taxa de maturação foi de 82% com 50 oócitos atingindo o estágio de metáfase II, sendo 24 em 24h e 26 em 48h (**tabela 2 e gráfico 1**).

A taxa de fertilização dos oócitos foi maior no meio TCM199 em relação ao meio HTF ( $p = 0,0071$ ). No meio HTF a taxa de fertilização foi de 39,4 %, com 13 oócitos fertilizados e no meio TCM 199 foi de 70%, com 35 oócitos fertilizados (**tabela 2 e gráfico 1**).

A taxa de clivagem não apresentou diferença entre os dois meios de cultivo. No meio HTF a taxa de clivagem foi de 92,3% com 12 embriões formados e no meio TCM 199 a taxa de clivagem foi de 91,4%, com 32 embriões formados. (**tabela 2**).

**Tabela 2: Comparação entre os meios de cultivo para taxa de maturação, fertilização e clivagem. Valor de p obtido pelo teste exato de Fisher.**

	<i>HTF</i>	<i>TCM 199</i>	<i>p</i>
	N = 58	N = 61	
Taxa de Maturação (N)	56,9% (33)	82% (50)	0,005
Taxa de Fertilização (N)	39,4% (13)	70% (35)	0,007
Taxa de Clivagem (N)	92,3% (12)	91,4% (32)	1,000

A **tabela 3** mostra a distribuição dos embriões de acordo com a classificação de Scott *et al* (2000), assim como o total de embriões formados e transferidos.

O meio de cultivo HTF forneceu 5 embriões Z1, que foram transferidos, não forneceu embrião do tipo Z2, 2 embriões do tipo Z3, que foram transferidos e 5 embriões do tipo Z4, dos quais foram transferidos apenas 4 deles. O meio de cultivo TCM 199 forneceu 24 embriões Z1 e 2 embriões do tipo Z2, sendo todos foram transferidos, 2 embriões do tipo Z3, sendo apenas 1 deles transferido e 4 embriões do tipo Z4, dos quais apenas 1 deles foi transferido.

**Tabela 3: Comparação entre a qualidade dos embriões\* provenientes de oócitos maturados nos dois meios de cultivo. \* = Scott *et al.*, 2000.**

	<b>HTF</b>		<b>TCM-199</b>	
	Formados	Transferidos	Formados	Transferidos
Z1	5	5	24	24
Z2	0	0	2	2
Z3	2	2	2	1
Z4	5	4	4	1
Total	12	11	32	28

Notamos formação de mais embriões de boa qualidade no meio de cultivo TCM 199 em relação ao meio HTF ( $p = 0,0226$ ). No meio HTF dos 12 embriões formados, 5 deles foram classificados em Z1 ou Z2, com uma taxa de 41,7% de embriões de boa qualidade. Dos 32 embriões obtidos no meio de cultivo TCM 199, 26 deles foram classificados em Z1 ou Z2, isto é, 81,3 % de embriões de boa qualidade (**tabela 4 e gráfico 1**).

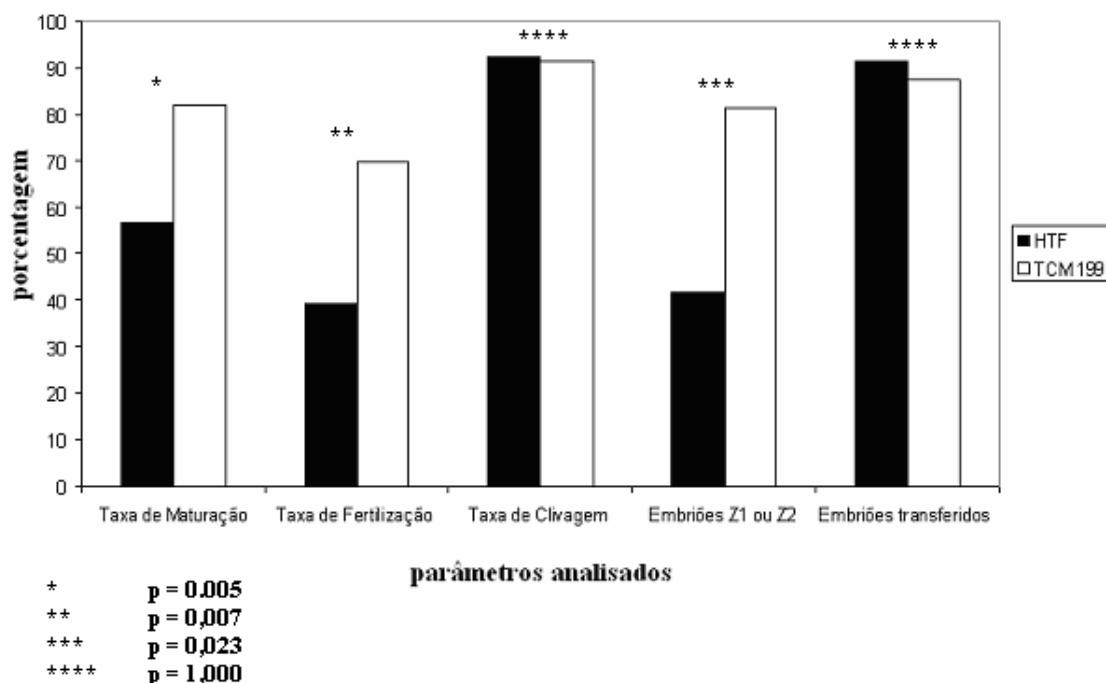
Verificamos que não houve diferença no número de embriões transferidos entre os dois meios de cultivo. Dos 12 embriões do meio HTF, 11 (91,6%) deles foram transferidos.

Dos 32 embriões do meio TCM 199, 28 (87,5%) deles foram transferidos (tabela 4 e gráfico 1).

**Tabela 4: Comparações entre a taxa de formação de embriões de boa qualidade e de transferência de embriões. \* = Scott et al., 2000. Valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher**

	<i>HTF</i>	<i>TCM 199</i>	<i>p</i>
	N = 12	N = 32	
Embriões Z1 ou Z2 * (N)	41,7% (5)	81,3% (26)	0,023
Embriões transferidos (N)	91,6% (11)	87,5% (28)	1,000

**Gráfico 1: Comparação entre os diferentes parâmetros analisados nos procedimentos de Maturação *in Vitro* para os meios de cultivo HTF e TCM 199.**



---

---

## **DISCUSSÃO**

---

O avanço da MIV depende do conhecimento das condições naturais do ambiente folicular onde o óvulo cresce e se desenvolve, assim como do aperfeiçoamento das tecnologias utilizadas nos laboratórios de Reprodução Assistida.

Sabe-se que desde 1934, com os trabalhos de Pincus e Enzmann, que os óvulos quando estão livres do ambiente folicular inibitório reiniciam o processo de meiose, mas isto não garante o sucesso do desenvolvimento embrionário após a fertilização (PINCUS e ENZMANN, 1934).

A maturação oocitária em condições naturais ocorre após um período de crescimento e desenvolvimento no interior do folículo. Neste período o óvulo precisa adquirir a competência para garantir o desenvolvimento embrionário após a fertilização. A aquisição da competência oocitária está intimamente ligada ao fenômeno da foliculogênese.

Os procedimentos de MIV procuram imitar as condições naturais do ambiente folicular. Dentro do folículo antral, numerosos eventos como as interações entre óvulo e as células do *cumulus oophorus*, a composição química do fluido folicular, a temperatura e a vascularização do ambiente folicular afetam a maturação do óvulo e a aquisição da competência para o seu desenvolvimento e do futuro embrião. Muitos destes fatores sofrem alterações de acordo com o tamanho folicular e com o crescimento do óvulo.

Em condições naturais a ação das gonadotrofinas sobre o folículo antral influencia a maturação oocitária (SUTTON *et al.*, 2003). Moléculas reguladoras como cAMP e purinas passam das células da granulosa para o óvulo por meio das *gap-junctions*, mantendo o óvulo estacionado em diplóteno da prófase I. É nessa fase que os óvulos são obtidos nos procedimentos de MIV.

Várias publicações têm descrito o uso da MIV em mulheres com SOP. (GE *et al.*, 2007, LIM *et al.*, 2007, JUREMA e NOGUEIRA, 2006, LIN *et al.*, 2006, DAL CANTO, 2006, CHIAN, 2004).

As razões para a escolha de mulheres com SOP para as técnicas de MIV é que elas possuem um grande número de folículos antrais nos ovários, facilitando a obtenção de oócitos imaturos, além do fato de essas mulheres serem as que mais se beneficiam com a MIV por desenvolverem mais frequentemente SHO quando submetidas à indução da ovulação.

No entanto, é difícil extrapolar os resultados encontrados em mulheres com SOP para mulheres com ciclos ovulatórios. É possível que as alterações hormonais crônicas, como o hiperandrogenismo e a hiperinsulinemia, que os ovários de mulheres com SOP são expostos antes da aspiração oocitária tornem os oócitos maturados *in vitro* mais propensos a problemas cromossômicos ou com os microtúbulos quando comparados com oócitos maturados *in vivo* antes da aspiração (PIQUETTE, 2006).

Como para a realização da MIV os oócitos são captados imaturos rodeados pelas células do *cumulus oophorus* a partir de folículos de diâmetro reduzido e não sofrem a ação das gonadotrofinas naturais, é fundamental a aquisição de nutrientes pelos oócitos para a ocorrência de sua maturação. Neste estudo suplementamos os meios de cultivo com gonadotrofinas exógenas para favorecer a maturação oocitária.

Por outro lado as condições de cultura para MIV com meios de cultivo de composição química complexa ou com a utilização de suplementos com macromoléculas protéicas nem sempre refletem a composição fidedigna do ambiente folicular. Da mesma forma, mesmo os suplementos metabólicos como glicose, piruvato, aminoácidos podem atuar influenciando adversamente o processo de maturação oocitária (SUTTON *et al.*, 2003).

A maturação oocitária passa pela maturação nuclear e maturação citoplasmática. A maturação nuclear refere-se à própria reinicialização da meiose desde o estágio de prófase I até o estágio de metáfase II, e a maturação citoplasmática refere-se à preparação do citoplasma para fertilização e desenvolvimento embrionário. Para sincronia destes fenômenos

são fundamentais as interações das células do *cumulus oophorus* com o oócito (CHA e CHIAN, 1998).

É verificado que durante o processo de maturação oocitária em ratos, os oócitos envolvidos pelas células do *cumulus oophorus* sofrem quebra da vesícula germinativa reinicializando o processo de meiose em meio contendo glicose como única fonte de energia. Isto sugere interação metabólica entre oócitos e células do *cumulus oophorus*.

As comunicações parácrinas e pelas *gap-junctions* são necessárias para o desenvolvimento do oócito e do folículo. Estas interações incluem fluido folicular, fatores esteróides ativadores da meiose, cAMP, purinas, pirimidinas, aminoácidos e fatores de crescimento (SUTTON *et al.*, 2003).

A estimulação das células do *cumulus oophorus* com FSH aumenta o uso de glicose e a produção de piruvato, além disso, a maturação oocitária parece necessitar muito de piruvato nos estágios de prófase I ou metáfase II.

É provável que as células do *cumulus oophorus* metabolizem a glicose até piruvato ou ATP, que podem ser utilizados pelo oócito, sendo transferidos para os mesmos pelas *gap-junctions* (DOWNS *et al.*, 2002).

Durante a MIV é importante que os meios de cultivo forneçam aos oócitos os metabólitos energéticos da via glicolítica como o piruvato e o ATP, daí a importância da suplementação do piruvato que realizamos no meio TCM 199.

A suplementação dos meios com SSS a 10% contribui com fontes de proteínas além de evitar a transmissão de agentes contaminantes, que pode ocorrer com a utilização de soro humano ou bovino. Há relato de que a suplementação com SSS a 10%, para ciclos estimulados contribui para melhor taxa de maturação e fertilização na MIV (CHIAN e TAN, 2002).

Em nossos procedimentos, na comparação da eficácia dos dois meios de cultivo, o meio TCM 199 mostrou-se mais eficiente para maturação oocitária, fertilização, assim como na formação de embriões de boa qualidade do que o meio de cultivo HTF.

Uma justificativa para esses achados é o fato de que meio TCM 199 apresenta maior riqueza de nutrientes sendo melhor para maturação, fertilização e produção de melhores embriões em relação ao HTF.

O meio TCM 199 apresenta sais minerais como acetato de sódio, fosfato de sódio e nitrato férrico, nucleotídeo energético como adenosina trifosfato (ATP), 20 tipos de aminoácidos, 17 tipos de vitaminas, desoxirribose e ribose, hipoxantina, timina, uracil e carboidratos energéticos como sorbitol e glicose que estão ausentes ou em menor quantidade no meio HTF.

A procedência dos oócitos em relação aos meios de cultivo para maturação oocitária não interferiu na taxa de clivagem dos embriões, visto que não houve diferença entre eles.

Foram transferidos os embriões de melhor qualidade independentemente da origem do meio de cultivo que os oócitos foram maturados, priorizando sempre o interesse da paciente. Embora não tivéssemos encontrado diferença no número de embriões transferidos entre os dois meios, verificamos que o meio TCM 199 forneceu mais embriões de boa qualidade do que o meio HTF.

Apesar do objetivo principal deste estudo não ter sido a verificação da taxa de gravidez, foram obtidas uma gravidez bioquímica e uma gravidez ectópica. Como a origem dos embriões transferidos nesses dois casos era dos dois meios de cultivo (HTF e TCM 199), não foi possível identificar com exatidão qual meio de cultivo forneceu o embrião de cada tipo de gravidez. A falta de informação precisa da origem dos embriões foi devido ao pequeno número de embriões obtidos nestes dois casos.

A tabela 5 mostra de modo comparativo os resultados de diversos trabalhos de MIV de ciclos não estimulados com análises de diferentes parâmetros como número de oócitos captados, taxa de maturação, taxa de fertilização, gravidez e meios de cultivos utilizados no período de 1994 a 2006, incluindo o nosso estudo.

**Tabela 5: Resultados obtidos em diferentes estudos avaliando ciclos não estimulados de MIV em mulheres com SOP.**

Autor	Ano	Oócitos	Oócitos	Oócitos	Gravidez	Meio	de
		Captados	Maturados	Fertilizados		cultivo	
			N (%)	N (%)			
Trounson <i>et al.</i>	1994	308	169 (60,4)	69 (40,8)	1	EMEM	
Barnes <i>et al.</i>	1996	165	102 (61,8)	27 (26,5)	-	TCM 199	
Cha e Chian	1998	832	499 (60,0)	364 (72,9)	16	TCM 199	
Chian <i>et al.</i>	2000	183	142 (77,6)	125 (88,0)	8	TCM 199	
Cha <i>et al.</i>	2000	1139	708 (62,2)	481 (67,9)	23	TCM 199	
Mikkelsen <i>et al.</i>	2001	81	36 (44,4)	25 (69,4)	7	TCM 199	
Chian <i>et al.</i>	2001	63	22 (34,9)	15 (68,2)	-	TCM 199	
Abdul-Jalil <i>et al.</i>	2001	12	6 (50)	4 (66,7)	-	TCM 199	
Child <i>et al.</i>	2002	1102	834 (75,7)	652 (78,1)	28	TCM 199	
Nagele <i>et al.</i>	2002	16	11 (68,8)	7 (63,6)	1	Medi-Cult	
Son <i>et al.</i>	2002	61	40 (65,6)	38 (95,0)	2	YSM	
Lin <i>et al.</i>	2003	762	548 (71,9)	383 (69,5)	12	TCM 199	
Le Du <i>et al.</i>	2005	509	321 (62,9)	225 (70,1)	11	SMI	
Araújo <i>et al.</i>	2006	61	50 (81,9)	35 (70,0)	-	TCM 199	
Araújo <i>et al.</i>	2006	58	33 (56,9)	13 (39,4)	-	HTF	

Observamos que em nossos procedimentos o meio TCM 199 apresentou taxa de maturação oocitária e de fertilização maior do que os outros estudos citados na tabela e que no meio HTF ficou abaixo da maioria deles.

Por outro lado, verificamos nesta análise comparativa entre os diferentes estudos que o número de oócitos obtidos em nossos procedimentos ficou abaixo da maioria deles. Este fato pode ser um indicativo que novos protocolos devem ser elaborados para aumentar a eficácia da captação de oócitos.

Embora tenham sido obtidas taxas de maturação e fertilização satisfatórias neste estudo, não relacionamos estes parâmetros com a disposição das fibras do fuso meiótico que é um dos indicativos da maturação citoplasmática. A análise deste parâmetro tem sido motivo de recentes investigações nos procedimentos de MIV de mulheres com SOP, verificando-se aumento de anormalidades no padrão de disposição das fibras do fuso meiótico em oócitos imaturos. Estas anormalidades poderiam provocar erros no padrão morfológico, de condensação e de distribuição cromossômica durante a anáfase (LI *et al.*, 2006).

A sincronia da maturação nuclear e citoplasmática é importante no processo de maturação oocitária e esta sincronia pode ser obtida com o controle da maturação nuclear, logo após a captação dos oócitos com a utilização de inibidores como a fosfodiesterase - 3, que em cultura aumenta a taxa de maturação em relação aos oócitos que não receberam o mesmo tratamento (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Nossos resultados mostram que a MIV para mulheres com SOP é exequível para maturação dos oócitos, fertilização, clivagem e formação de embriões de boa qualidade sem a utilização de medicamentos indutores da ovulação, podendo assim evitar a SHO.

O protocolo utilizado implica menor número de visitas das mulheres ao serviço para monitorização do ciclo, assim como menores custos para as mulheres quando comparados com procedimentos tradicionais de Reprodução Assistida.

Outros protocolos devem ser elaborados para melhorar a média do número de oócitos captados por ciclo de MIV, assim como obtenção de gravidezes com o objetivo de implantar os procedimentos de MIV na rotina de nosso laboratório.

Novas tecnologias para a avaliação dos parâmetros de maturação nuclear e citoplasmática visando melhorar a seleção de oócitos e embriões com competência para o seu desenvolvimento são fundamentais, pois o recrutamento de oócitos imaturos para MIV apresenta alta proporção de oócitos que sofreriam degeneração ou atresia e que não seriam selecionados naturalmente para maturação *in vivo* (TROUNSON, 2006).

Procedimentos de MIV com o uso da tecnologia de ICSI Guard para análise das fibras do fuso ou mecanismos que melhorem a sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática ou protocolos com indução de ovulação com menor quantidade de gonadotrofinas exógenas podem trazer melhores resultados na seleção de oócitos imaturos ou na obtenção de maior número de oócitos para nossos procedimentos.

A MIV também pode ser uma opção para procedimentos em ciclos induzidos de FIV ou ICSI para obtenção de oócitos com competência para fertilização e desenvolvimento embrionário em procedimentos tradicionais de Reprodução Assistida, principalmente para os casos de mulheres com má ou hiper respostas à indução de ovulação.

A MIV pode gerar embriões com potencial de desenvolvimento após a transferência embrionária. Estima-se que aproximadamente 400 crianças tenham nascido com essa tecnologia (JUREMA e NOGUEIRA, 2006).

No entanto, somente um estudo foi elaborado para acompanhar o desenvolvimento neurológico das crianças nascidas após MIV (SUIKKARI *et al.*, 2005).

---

---

## **CONCLUSÕES**

---

- Na comparação da eficácia dos dois meios de cultivo, o meio TCM 199 mostrou-se mais eficiente para maturação oocitária, fertilização e produção de embriões de boa qualidade do que o meio de cultivo HTF.
- Os meios de cultivo HTF e TCM 199 não interferiram na taxa de clivagem dos embriões.
- Nossos resultados mostram que a MIV para mulheres com SOP é exequível para maturação dos oócitos, fertilização, clivagem e formação de embriões de boa qualidade sem a utilização de medicamentos indutores da ovulação, evitando assim a SHO.
- Outros protocolos devem ser elaborados para melhorar a média do número de oócitos captados por ciclo de MIV, assim como obtenção de gravidezes com o objetivo de implantar os procedimentos de MIV na rotina do nosso laboratório.

---

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

---

---

\* As referências bibliográficas foram normatizadas de acordo com *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)*. As abreviaturas dos periódicos seguem o *Index Medicus (Abbreviations of Journal Titles)*

Abdul-Jalil AK, Child TJ, Phillips S, Dean N, Carrier S, Tan SL. Ongoing twin pregnancy after ICSI of PESA retrieved spermatozoa into *in vitro* matured oocytes: case report. Hum Reprod 2001; 16: 1424 - 26.

Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. The Ovarian Follicular Apparatus. In \_\_\_\_\_. Reproductive Endocrinology Surgery, and Technology. New York, New York: Lippincott - Raven - Publishers, 1995; 2: 18 - 40.

Amaral MCMS, Camargos MGRS, Vieira MAF, Tavares RLC, Lemos CNCD, Camargos AF. Avaliação da aplicabilidade da técnica de maturação *in vitro* de óvulos humanos e posterior fertilização. Rev Bras Ginecol Obstet 2003; 25: 513-18.

Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 2434 - 38.

Balen A. Ovulation induction for polycystic ovary syndrome. Hum Fertil (Camb) 2000; 3:106-11.

Brinsden PR, Wada I, Tan SL, Balen A, Jacobs HS. Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. Br J Obstet Gynecol 1995;102: 767-72.

Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. Biol Reprod 1990; 43: 543 - 7.

Carmina E, Lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 82: 661- 5.

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

Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978 - 83.

Cekleniak NA, Combelles CM, Ganz DA, Fung J, Albertini DF, Racowsky. A novel system for *in vitro* maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2001; 73: 1185 - 92.

Chen SU, Chen HF, Lien YR, Ho HN, Chang HC, Yang YS. Schedule to inject *in vitro* matured oocyte may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Androl* 2000; 44: 197 - 205.

Chian RC, Buckett WM, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165 - 70.

Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Pregnancy and delivery after cryopreservation of zygotes produced by *in vitro* matured oocytes retrieved from women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16: 1700 - 02.

Chian RC. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. Reprod Biomed Online 2004; 8: 547-52.

Chian RC, Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus - free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. Reprod. Biomed. Online 2002; 5: 125-32.

Child TJ, Sylvestre C, Pirwany I, Tan SL. Basal serum levels of FSH and estradiol in ovulatory and anovulatory women undergoing treatment by in – vitro maturation of immature oocytes Hum Reprod 2002; 7: 1997 - 2002.

Cooke S, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JP, Driscoll GL. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage – specific culture media. Fertil Steril 2002; 78: 1254 - 60.

Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2006; 21: 1387 - 99.

Dal Canto MB, Mignini Renzini M, Brambillasca F, Cepparo H, Comi R, Villa A, Rangoni G, Mastrolilli M, Crippa M, de Ponti E, Nielsen HI, Fadini R. IVM: The first choice for IVF in Italy. Reprod Biomed Online 2006; 13:159 - 65.

Downs SM, Humpherson PG, Leese HJ. Pyruvate utilization by mouse is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. Mol Reprod Dev 2002; 63: 113 - 23.

Franks S. Polycystic ovary syndrome. N Engl J Med 1995; 333: 853 - 61.

Futterweit W, Mechanick JI. Polycystic ovarian disease: etiology, diagnosis, and treatment. Compr Ther 1988; 14: 12 - 20.

Ge HS, Huang XF, Zhang W, Zhao JZ, Lin JJ, Zhou W. Exposure to human chorionic gonadotropin during *in vitro* maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2007; Epub ahead of print

Houillon, C. Espermatogênese - Ovogênese. In \_\_\_\_\_.Sexualidade.. São Paulo: Edgard Blucher, 1972; 2: 17 - 36.

Hull MG, Epidemiology of infertility and polycystic ovarian disease: endocrinological and demographic studies. Gynecol Endocrinol 1987; 1(3): 235 - 45.

Jabara S, Coutifaris C. *In vitro* fertilization in PCOS patient: clinical considerations. Sem Reprod Med 2003; 21:317 - 23.

Jaroudi KA. *In vitro* maturation of human oocytes for the patients who are at the risk of hyperstimulation during assisted reproduction. Fertil Steril 1997; 68: S4-S5.

Jin ZX, Ock AS, Tan SL, Chian RC. What is the smallest size of follicle to respond to human chorionic gonadotropin injection? Fertil Steril 2005; 84: S147.

Jurema MV, Nogueira D. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. Fertil Steril. 2006; 86: 1277 - 91.

Kruger TF, Menkveld R, Stander F, Lombard C, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118 - 23.

Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, Fanchin R, Chian RC, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. . *In vitro* oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. Hum Reprod 2005; 20: 420 -24.

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: 827 - 32.

Lim JH, Yang SH, Chian RC. New alternative to infertility treatment for women without ovarian stimulation. Reprod Biomed Online 2007; 14:547-9.

Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, Hsieh BC, Huang SC, Chen CY, Chen PH. Combination of FSH priming and hCG priming for in – vitro maturation of human oocytes. Hum Reprod 2003; 18: 1632 - 36.

Lin YH, Hwang JL. *In vitro* maturation of human oocytes. Taiwan J Obstet Gynecol 2006; 45: 95 - 9

Martins WP, Reis RM, Ferriani RA, Araujo CHM, Nastri CO, Filho FM. Endometrial preparation for *in vitro* oocyte maturation (IVM): early use of estrogen increases endometrial tissue and requires lower daily dosage: a cross over trial in “mock” cycles. J Assist Reprod Genet 2006; 23: 241 - 46.

Mikkelsen A, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the *in vitro* maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. Reproduction 2001; 122: 587 - 92.

Moore KL, Persaud TVN. Início do Desenvolvimento Humano: Primeira Semana. In \_\_\_\_\_. Embriologia Clínica. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 2000; 2: 15- 43.

Nagele F, Sator MO, Juza J, Huber JC. Successful pregnancy resulting from in - vitro matured oocytes retrieved at laparoscopic surgery in a patient with polycystic ovary syndrome: case report. Human Reprod 2002; 17: 373 - 74.

Nogueira D, Ron-El R, Friedler S, Schachter M, Raziel A, Cortvindt R, Smitz J. Meiotic arrest *in vitro* by Phosphodiesterase 3 – Inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. Biol Reprod 2006; 74:177 - 84.

Oura C, Toshimori K. Ultra structural on the Fertilization of Mammalian Gametes. Int Rev Cytol 1990; 122: 105 - 49.

Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Reprod Fertil Dev 1995; 7: 211 - 17.

Pimentel SMR, Junior OA. Meiose. In: CARVALHO, H.F.; PIMENTEL, S.M.R. A Célula 2001. São Paulo: Manole, 2001, 248-59.

Pincus G, Enzmann EV. Can mammalian eggs undergo normal development *in vitro*? Proc Natl Acad Sci U S A. 1934; 20:121 - 22.

Reis RM, De Ângelo AG, Romão GS, Santana LF, Moura MD, Ferriani RA. The Polycystic Ovary Syndrome interfere in results of *in vitro* Fertilization ?. Rev Bras Ginecol Obstet 2004; 26:727 - 33.

Salha O, Busheika NA, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and *in vitro* oocyte maturation. Hum Reprod 1998; 4: 816 - 32.

Scott JRT, Hodgen GD. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock. Clin Obstet Gynecol 1990; 3: 551- 62.

Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod 2000; 15: 2394 - 2403.

Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in – vitro matured oocyte retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod 2002; 17: 2963 - 66.

Speroff L, Glass RH, Kase NG. Anovulation and the Polycystic Ovary. In \_\_\_\_\_. Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility. 5nd ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins 1994, 13: 457 - 82.

Speroff L, Glass H, Kase NG. Regulation of the menstrual cycle. In \_\_\_\_\_. Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility. 5nd ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins 1994, 6: 183 - 230.

Starr C. Reproduction and Development. In \_\_\_\_\_. Biology a Human Emphasis. 3nd ed. Belmont, California: Wadsworth publishing Company, 34: 590 - 627.

Suikkari AM, Salokorpi T, Pihlaja M, Soderstrom-Antilla V. Healthy children born after *in vitro* maturation of oocytes. Hum Reprod 2005; 20: 105

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. Hum Reprod 2003; 9: 35 - 48.

Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. Am J Obstet Gynecol 1935; 29: 181 - 91.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 2004, 19:41-7.

Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353 - 62.

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

Van Steirteghem A, Tournaye H, Van der Elst J, Verheyen G, Liebaers I, Devroey P. Intracytoplasmic sperm injection three years after the birth of the first ICSI child. *Hum Reprod* 1995; 10: 2527 - 28.

Veek LL. Gamete Maturation. In \_\_\_\_\_. An atlas of human gametes and Conceptuses. An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. New York, The Parthenon Publishing Group1999; 1: 15 - 8.

Veek LL. The Human Oocyte. In \_\_\_\_\_.An Atlas of Human Gametes and Conceptuses. An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology. New York, The Parthenon Publishing Group1999; 2: 19 - 24.

World health organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.

---

---

## **ANEXOS**

---



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

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 26 de maio de 2004

Ofício nº 1530/2004  
CEP/SPC

**Senhora Professora:**

O trabalho intitulado "**MATURAÇÃO IN VITRO (MIV) DE OÓCITOS CAPTADOS DE PACIENTES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (SOP)**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 180ª Reunião Ordinária realizada em 24/05/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADOS, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4060/2004. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

**Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.**

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ROSANA MARIA DOS REIS**  
**CARLOS HENRIQUE MEDEIROS DE ARAÚJO (Orientando)**  
Dept. de Ginecologia e Obstetrícia  
Em mãos

*Dan encarar os  
interessados  
Selvyl*

**ANEXO 2**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144

CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

Mem. nº 145/2004

GS-3/LHBS

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2004

Ilustríssima Senhora

**Profª Drª ROSANA MARIA DOS REIS(Orientadora)**

**CARLOS HENRIQUE MEDEIROS DE ARAÚJO(Orientando)**

Ginecologia e Obstetrícia

Em mãos

Senhora Professora:

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 2071/2004 – CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado “**MATURAÇÃO IN VITRO (MIV) DE OÓCITOS CAPTADOS DE PACIENTES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS (SOP)**”, de acordo com o Processo HCRP nº 4060/2004.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.

Aproveito a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente.

*Laís Helena Borges da Silveira*  
**LAÍS HELENA BORGES DA SILVEIRA**

Diretora do Serviço de Comunicações

Administrativas

R.F. nº 1373

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

PARECER N° 2071/2004

**Registro CONEP: 10399** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE- 0076.0.004.000-04

Processo nº 25000.81061/2004-22

**Projeto de Pesquisa:** " Maturação in vitro (MIV) de óócitos captados de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP). "

**Pesquisador Responsável:** Dra Rosana Maria dos Reis

**Instituição:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

**Área Temática Especial:** Reprodução humana

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1662/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

a) foram atendidas as solicitações do referido parecer

b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99 , sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos:

c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

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

**Situação:** Projeto aprovado.

Brasília, 6 de Outubro de 2004

*WILLIAM SAAD HOSSNE*  
 WILLIAM SAAD HOSSNE  
 Coordenador da CONEP/CNS/MS

## **ANEXO 3**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A senhora esta sendo convidada a fazer parte de um estudo proposto para mulheres que apresentam Síndrome dos Ovários Policísticos como causa de esterilidade conjugal.

A Síndrome dos Ovários Policísticos caracteriza-se pela ausência ovulações normais, com intervalos menstruais irregulares que podem variar de 45 dias a meses, até mesmo sangramento menstrual excessivo, que levam a infertilidade. O aumento de pêlos (hirsutismo), acne, pele oleosa, queda de cabelos e obesidade geralmente acompanham esta doença,

Muitos estudos mostram que mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos correm o risco de apresentar uma resposta exagerada dos ovários quando submetidas a tratamento com medicamentos para estimular a ovulação, denominada Síndrome da Hiperestimulação Ovariana. Esta síndrome é caracterizada pela formação de muitos cistos ovarianos, distensão abdominal, náuseas, vômitos e diarréias.

Com a participação neste projeto de pesquisa a senhora não será submetida aos medicamentos tradicionalmente utilizados nos procedimentos de Fertilização Assistida para indução da ovulação, evitando assim as complicações clínicas da Síndrome de Hiperestimulação Ovariana, além de não ter custos com estes medicamentos.

Então com a participação nesta pesquisa a senhora não terá riscos para sua saúde, pois sua ovulação não será induzida com medicamentos. Além disso, a senhora será beneficiada pela redução do número de visitas ao hospital, assim como pelo menor número de procedimentos médicos, em relação a outras técnicas de Fertilização Assistida. A senhora estará sendo beneficiada pelo uso de poucos medicamentos e pela redução dos custos dos procedimentos normalmente utilizados neste Laboratório.

No entanto não podemos garantir o sucesso desta técnica para sua gravidez nem o sucesso do desenvolvimento de um possível embrião, apesar de não existir registros na pesquisa científica de anomalias de embriões resultantes das técnicas de maturação de oócitos.

Ao invés do uso de medicamentos para induzir sua ovulação, a senhora será submetida ao procedimento de coleta de oócitos ainda imaturos (células reprodutivas femininas), que estão presentes em seus ovários.

Como os oócitos da senhora não amadurecem normalmente em seus ovários, antes da coleta destas células a senhora deverá tomar uma injeção do hormônio r-hCG para estimular o início deste amadurecimento e sua continuidade depois nos meios de cultivo.

Estes oócitos depois de coletados pelo médico serão colocados para amadurecer em recipientes com meios de cultivos em condições ótimas de nutrição (substâncias nutritivas como vitaminas, sais minerais, hormônios, antibióticos entre outras) e temperatura controladas no Laboratório de Reprodução Humana deste hospital.

O amadurecimento de suas células reprodutivas corresponde às transformações que elas vão sofrer no laboratório (nos meios de cultivo) para ficarem prontas para serem fertilizadas pelo espermatozóide de seu marido.

Depois do amadurecimento dos seus oócitos no laboratório (de 24 a 48 horas), será feita a coleta dos espermatozoides de seu marido para a realização dos procedimentos de fertilização, que corresponde à injeção dos espermatozoides dentro do oótipo com a utilização de uma agulha especial. Esta técnica de injeção dos espermatozoides dentro de seus oócitos é conhecida com o nome de ICSI.

Depois de fertilizado, o seu oócito forma um embrião, que será transferido pelo médico para o interior de seu útero, após 48 a 72 horas da ICSI.

É comum que por meio desta técnica, que a senhora está sendo submetida, tenhamos um número reduzido de oócitos e posteriormente um número reduzido de embriões para serem transferidos para seu útero. Serão transferidos no máximo três (3) embriões para a senhora para garantir a sua saúde e de seus embriões. Os embriões que excederem este número serão guardados congelados neste laboratório para possíveis futuros procedimentos.

Com a participação nesta pesquisa a senhora estará colaborando com estudos de técnicas alternativas de fertilização assistida para mulheres que apresentam a Síndrome dos Ovários Policísticos.

Os esclarecimentos de eventuais dúvidas sobre o andamento da pesquisa e sobre sua participação serão feitos pelos pesquisadores, Dra Rosana Maria dos Reis e Carlos Henrique Medeiros de Araújo, que a acompanharão durante os procedimentos, podendo ser contatados pelo telefone (16) 602 2815.

Em qualquer momento da pesquisa as mulheres poderão se recusar a continuar e se isto ocorrer, não haverá qualquer restrição em relação aos seus futuros atendimentos neste hospital.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Eu, \_\_\_\_\_ estou inteiramente de acordo com  
o exposto acima.

\_\_\_\_\_ paciente

\_\_\_\_\_ marido

---

---

# **ARTIGO 1**

---

Human tubal fluid is not an appropriate medium to be used during oocyte maturation

Carlos HM de Araújo\*, Rosana M dos Reis, Maria Cristina PM de Araujo, Wellington P Martins, Gustavo S Romão, Rui A Ferriani, Marcos F.S. de Sá.

*Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil*

\*Corresponding author at: Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Tel.: +55 16 36330216

Fax: +55 16 36339633

e-mail: [cm.araujo@uol.com.br](mailto:cm.araujo@uol.com.br)

The HTF medium is worse than the TCM199 medium concerning oocyte maturation, fertilization rates and embryo quality.

## Abstract

*Objective:* To compare oocyte maturation, fertilization, cleavage rates and embryo quality after culture of human oocytes in human tubal fluid (HTF) or TCM 199 culture medium during *in vitro* maturation cycles.

*Study design:* Randomized controlled trial in which 23 *in vitro* maturation cycles were evaluated, resulting in 119 oocytes retrieved from 13 patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). The oocytes from each patient were assigned at random to the two culture media, 61 (51%) to TCM 199 and 58 (49%) to HTF, using the same hormonal supplementation.

*Results:* Significant differences were observed between TCM 199 and HTF regarding maturation rate (82% vs. 56.9%,  $p = 0.005$ ), fertilization rate (70% vs. 39.4%,  $p = 0.007$ ) and embryo quality (81.3% vs. 41.7%,  $p = 0.023$ ).

*Conclusion:* HTF medium, although widely employed for embryo fertilization and maintenance in IVF techniques, is not an appropriate medium for the maturation of oocytes obtained from PCOS patients in non-stimulated cycles.

*Keywords:* Assisted reproductive techniques; *In vitro* maturation; Intracytoplasmic sperm injection; Polycystic Ovary Syndrome; Ovarian hyperstimulation syndrome.

## 1. Introduction

*In vitro* fertilization (IVF) and subsequent embryo transfer are an established and successful form of infertility treatment, with continuously improving cumulative pregnancy rates [1]. However, high success rates with IVF are achieved at the risk of two major complications, namely, multiple pregnancy and ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). All assisted conception techniques are associated with an increase in the rate of multiple pregnancies because several embryos are generally transferred to achieve higher pregnancy rates. Moreover, to have several embryos available for transfer, controlled ovarian hyperstimulation is required, placing the patient at risk for the development of OHSS, which is a iatrogenic and potentially life-threatening condition mainly related to the administration of exogenous gonadotropins [2]. Although there are many strategies to prevent and predict OHSS, none is universally successful. The only reliable way to prevent OHSS would be to avoid stimulating the ovaries. The technique of *in vitro* maturation (IVM) of oocytes has been developed [3] after the successful *in vitro* maturation of human follicular oocytes incubated in follicular fluid [4]. Since stimulation of the ovaries is not necessary for this technique, it has received increased attention in recent years [5].

During IVM treatment, immature oocytes are retrieved transvaginally from unstimulated ovaries, matured *in vitro* for 24–48 h and then fertilized. Normally one to four embryos are transferred into the uterus 2–3 days later [6]. The absence of ovarian stimulation in IVM treatment has a number of advantages, such as reduction of the risk of OHSS, reduction of costs and drugs, and fewer ultrasound scans and medical visits. The majority of IVM pregnancies have been reported in women with polycystic ovary syndrome (PCOS), who have a higher risk of developing OHSS [2].

However, the rate of maturation of immature oocytes retrieved from women with PCOS is lower than that of normo-ovulatory women [7].

The crucial part of this technique is the maturation process itself, and the choice of the base medium for human IVM is considered particularly difficult [8]. Considering that the most commonly used culture medium for IVM is TCM199 [5] and that human tubal fluid (HTF) medium is used for both embryo maintenance and IVF procedures, the objective of the present study was to compare the efficacy of these two culture media during oocyte maturation and to evaluate the maturation and fertilization rates as well as the quality of the embryos obtained from PCOS patients in non-stimulated cycles.

## 2. Methods

### 2.1. Patients

The research protocol was elaborated in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki [9] and was approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. and by the National Research Ethics Committee. Written informed consent was obtained from all selected subjects. From August 2004 to December 2005, 23 IVM cycles were performed in our hospital for 13 infertile women with a previous diagnosis of PCOS, according to the 2003 Rotterdam consensus. The patients were 26 to 36 years old (mean and standard deviation:  $29.6 \pm 3.1$  years) and their body mass index ranged from 21 to  $32.5 \text{ kg/m}^2$  (mean and standard deviation:  $26.1 \pm 3.6 \text{ kg/m}^2$ ).

### 2.2. Monitoring

In order to monitor the menstrual cycle, menstruation was induced by the administration of medroxyprogesterone acetate, 10 mg per day, for 5 to 10 days. Between the first and third day after vaginal bleeding had started, the patients were submitted to the first transvaginal ultrasound (US) scan to determine the presence of ovarian cysts. Eight days after menstruation had started a second US examination was performed to exclude the development of a dominant follicle. Next, normally 4 to 6 days after the second US scan, 250 µg of recombinant hCG (r-hCG), Ovidrel® (Serono, Inc., Rockland, MA, USA), were administered aiming to facilitate oocyte maturation [6] and about 36 h later, oocyte retrieval was performed. Oocyte collection was guided by transvaginal US and executed with a constant artificial negative pressure of 80 mmHg produced by the Craft™ suction pump with electronic control (Zander Medical Supplies, Inc., Vero Beach, FL, USA), with a 16 gauge double-lumen needle (Cook Medical Inc., Bloomington, IN, USA).

### 2.3. Endometrial preparation

On the first day of the cycle the patients started estrogen supplementation with 2 mg/day for 4 days, 4 mg/day for an additional 4 days and then 6 mg/day until the day of oocyte retrieval. On this day, endometrial thickness was assessed and when it was thinner

than 8 mm the estradiol valerate dosage was increased to 10 mg/day; if it was thicker than 8 mm the dose of 6 mg/day was maintained.

This endometrial preparation schedule is performed in our service because it has been shown to increase endometrial thickness and to prevent most women from using the higher estrogen dose of 10 mg/day [10].

After embryo transfer, the luteal phase was supplemented with 30 mg/day of dydrogesterone (Duphaston, Solvay Pharmaceuticals, Pymble, New South Wales, Australia).

The protocol for the IVM procedures established in our laboratory is presented schematically in Fig. 1.

#### **2.4. Maturation, fertilization and embryo culture**

The oocytes were washed with HTF-HEPES (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) to remove blood and debris. Thereafter, immature oocytes were randomly assigned to be cultured in Nunc plates containing 1 ml of either TCM 199 (Tissue Culture Medium 199 - Sigma - M 4530, St. Louis, MO, USA) or HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) medium. For this purpose, tables were constructed for each patient for random oocyte distribution based on the number of oocytes retrieved using the GraphPad StatMate software, version 1.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The two media were identified only by numbers in order to blind the researchers. Both media were supplemented with 10% synthetic substitutive serum (SSS, Irvine Scientific), 0.075 IU/ml of recombinant FSH (Gonal®, Serono) and 0.5 IU/mL hCG (Ovidrel®, Serono). The TCM 199 medium was also supplemented with 22 µg/ml pyruvate, 0.06 mg/ml streptomycin and 0.06 mg/ml penicillin.

Dishes were then incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After 24 h of maturation, all the cumulus–oocyte complexes were decoronated with hyaluronidase solution (H 4272 type IV-S, Sigma) at a dilution of 80 IU/ml for a maximum of 30 seconds and then washed with HTF supplemented with 10% SSS. The mature oocytes were determined by the presence of a first polar body extrusion. Nude immature oocytes with a germinal vesicle or germinal vesicle breakdown were transferred for an additional 24 h of maturation in the same medium. Oocytes that were still immature after 48 h of maturation were considered to be maturation failure. The mature oocytes were submitted to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using modified HTF–HEPES medium (Irvine Scientific) [11,12]. The sperm for ICSI was obtained by fresh ejaculation prepared with a

discontinuous PureSperm gradient (Nidacon - International AB, Mölndal, Sweden) at two concentrations, i.e., 45 and 90%.

After ICSI, the oocytes were cultured singly in 25 µl HTF supplemented with 10% SSS and checked 18 to 24 h after ICSI. Fertilization was considered normal when two pronuclei were identified. Two days after fertilization, the embryos were classified into four categories (Z1 to Z4) according to their morphology [13]. We did not intend to evaluate the pregnancy rate, since the best quality embryos from both media were transferred, and therefore an eventual pregnancy could not be attributed to a specific culture medium.

### **2.5. Statistical analysis**

Data were analyzed using the GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software).

The maturation and fertilization rates, the rate of viable embryos on the second day after fertilization and the rate of good quality embryos (Z1+Z2) were compared between the two media by the exact Fisher test. A *p* value < 0.05 was considered to be significant.

## **3. Results**

The results obtained in the 23 IVM cycles with the two culture media are presented in Table 1. The rates of matured and fertilized oocytes were both significantly lower for those cultured in HTF than in the TCM199 medium. In HTF medium the maturation rate was 56.9%, with 33 oocytes reaching metaphase II, 16 of them within 24 h and 17 within 48 h. In TCM 199 medium the maturation rate was 82%, with 50 oocytes reaching metaphase II, 24 of them within 24 h and 26 within 48 h.

We also observed that, although there was no significant difference in the rate of viable embryos observed on the second day after fertilization, a lower rate of good quality embryos (Z1 or Z2) was obtained from those which were matured in HTF medium compared to those matured in TCM199. Two patients obtained a positive β-hCG serum two weeks after embryo transfer (1 ectopic pregnancy and 1 biochemical pregnancy).

#### 4. Discussion

Under natural conditions, oocyte maturation occurs after a period of growth and development inside the follicle. During this period the oocyte must acquire competence in order to guarantee embryo development after fertilization. The acquisition of oocyte competence is closely linked to the phenomenon of folliculogenesis.

IVM procedures attempt to imitate the natural conditions of the follicular environment. Inside the antral follicle, many events affect oocyte maturation and acquisition of competence for its own development and the development of the future embryo, such as interactions between oocyte and cumulus cells, the chemical composition of follicular fluid, and the temperature and vascularization of the follicular environment. Many of these factors undergo changes according to follicle size and oocyte growth.

Under natural conditions the action of gonadotrophins on the antral follicle influences oocyte maturation [8]. Regulatory molecules such as cAMP and purines pass from the granulosa cells to the oocytes by means of *gap-junctions*, keeping the oocytes stationed at diplotene of prophase I. It is during this phase that the oocytes are obtained in IVM procedures. Since the oocytes are retrieved when immature, surrounded by cumulus cells from follicles of reduced diameter and do not suffer the action of natural gonadotrophins, the acquisition of nutrients by the oocytes is fundamental for the occurrence of their maturation. In the present study we supplemented the culture media with exogenous gonadotrophins in order to favor oocyte maturation.

Many studies [3, 5, 6, 18, 22, 23] have shown that IVM is a viable phenomenon and that oocytes matured and fertilized *in vitro* can generate embryos with the potential for development after embryo transfer. On the other hand, IVM using culture media of complex composition or supplements containing protein macromolecules does not always reflect the composition of the follicular environment in a reliable manner. Also, metabolic supplements such as glucose, pyruvate, and amino acids, among others, can influence the process of oocyte maturation [8].

It has been observed that during the process of rat oocyte maturation the oocytes enveloped by the cumulus cells undergo a break of the germinative vesicle, re-initializing the process of meiosis in medium containing glucose as the only energy source. This suggests a metabolic interaction between oocytes and cumulus cells. Paracrine communications and communications through the *gap-junctions* are necessary for the development of oocyte and

follicle. These interactions include follicular fluid, meiosis-activating steroid factors, cAMP, purines, pyrimidines, amino acids, and growth factors [8].

Stimulation of cumulus cells with FSH increases the use of glucose and the production of pyruvate. In addition, oocyte maturation seems to strongly require pyruvate during the stages of prophase I or metaphase II. Cumulus cells probably metabolize glucose to pyruvate or to adenosine triphosphate (ATP), which can be transferred to the oocyte through the *gap-junctions* for utilization [24].

During IVM it is important that the culture media provide the oocytes with the energy metabolites of the glycolytic pathway such as pyruvate and ATP. On this basis, the pyruvate supplementation we performed for the TCM 199 medium was very important.

Supplementation of the media with 10% SSS contributed growth factors and also prevented the transmission of contaminants that might occur with the use of human or bovine serum. It has been reported that supplementation with 10% SSS for stimulated cycles contributes to a better rate of maturation and fertilization in IVM [25].

When we compared the efficacy of the two culture media, HTF proved to be less efficient for oocyte maturation and fertilization, as well as for the formation of good quality embryos, than TCM 199. An explanation of these findings is that TCM 199 has a greater wealth of nutrients, thus being better for maturation, fertilization and production of better embryos than HTF. TCM 199 contains mineral salts such as sodium acetate, sodium phosphate and ferric nitrate, energy nucleotides such as ATP, 20 types of amino acids, 17 types of vitamins, deoxyribose and ribose, hypoxanthine, thymine and uracil, and energy carbohydrates such as sorbitol and glucose, which are absent or present in smaller amount in HTF.

The origin of the oocytes regarding the culture media for oocyte maturation did not interfere with the rate of embryo cleavage, since they did not differ from one another. The embryos of best quality were transferred regardless of the origin of the culture medium in which the oocytes were matured, with priority always given to the interest of the patient. Although we did not detect a difference in the number of embryos transferred between the two media, we observed that the TCM 199 medium provided more good quality embryos than the HTF medium.

Although the determination of the pregnancy rate was not the main objective of the present study, a biochemical pregnancy and an ectopic pregnancy were obtained.

Since the embryos transferred in these two cases were from both culture media (HTF and TCM 199), it was not possible to identify exactly which culture medium provided the

embryo for each type of pregnancy. The lack of precise information about the origin of these embryos was due to the small number of embryos obtained in these two cases.

Table 2 shows a comparison of the results of various studies on IVM of unstimulated cycles with the analysis of different parameters such as number of oocytes retrieved, maturation, fertilization and pregnancy rates, and culture media used during the period from 1994 to 2006, including our study. We observed that in our procedure the TCM 199 medium presented a higher oocyte maturation and fertilization rate than the other studies listed in the table and that the HTF medium produced results inferior to those of most of the cited studies.

On the other hand, in this comparative analysis of different studies we observed that the number of oocytes obtained with our procedures was smaller than those obtained in most of the other studies. This fact may indicate that new protocols should be elaborated to increase the efficacy of oocyte retrieval.

Although satisfactory maturation and fertilization rates were obtained in the present study, we did not relate these parameters to the arrangement of the fibers of the meiotic spindle, which is one of the indicators of cytoplasmic maturation. Analysis of this parameter has been the subject of recent investigations of IVM procedures, which have revealed increased abnormalities in the pattern of arrangement of meiotic spindle fibers in immature oocytes. These abnormalities may cause errors in the pattern of chromosome morphology, condensation and distribution during anaphase [26].

The present results show that IVM for patients with PCOS is feasible for oocyte maturation, fertilization and cleavage and for the formation of good quality embryos without the use of ovulation-inducing medications, thus avoiding the ovarian hyperstimulation syndrome. The protocol used involves a smaller number of patient visits to the service for cycle monitoring, as well as lower costs compared to traditional assisted reproduction procedures.

New technologies for the evaluation of parameters of nuclear and cytoplasmic maturation aiming at an improved selection of oocytes and embryos with competence for development are fundamental since the retrieval of immature oocytes for IVM involves a high proportion of oocytes they would undergo degeneration or atresia and that would not be selected naturally for *in vivo* maturation [27].

IVM may also be an option for procedures in induced IVF or ICSI cycles used to obtain oocytes with competence for fertilization and embryo development in traditional procedures of assisted reproduction.

## Acknowledgements

We are grateful to Maria Aparecida Carneiro Vasconcelos, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Sandra Aparecida Cavicchiolo Vianna, Roberta Cristina Giorgenon, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Maria Albina Verceze Bortoliero, Stael Porto Leite, and Luis Alberto Manetta for technical support.

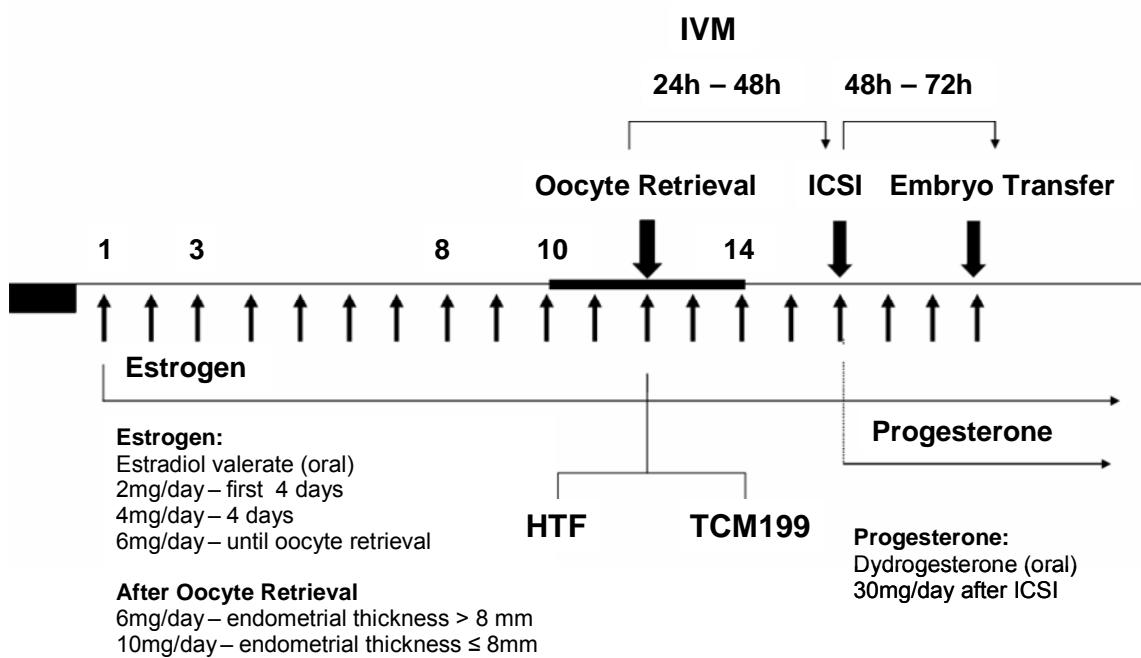
## References

- [1] Arslan M, Bocca S, Mirkin S, Barroso G, Stadtmauer L, Oehninger S. Controlled ovarian hyperstimulation protocols for in vitro fertilization: two decades of experience after the birth of Elizabeth Carr. *Fertil Steril* 2005;84(3):555-69.
- [2] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2006;86(5) (Suppl):S178-83.
- [3] Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994;62(2):353-62.
- [4] Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991 Jan;55(1):109-13.
- [5] Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier MC, Chevalier N, et al. *In vitro* oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod*. 2005 Feb;20(2):420-4.
- [6] Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2000 Jan;15(1):165-70.
- [7] Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod* 1998;4:103-120.
- [8] Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003 Jan-Feb;9(1):35-48.
- [9] World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*. 2000 Dec 20;284(23):3043-5.

- [10] Martins Wde P, dos Reis RM, Ferriani RA, de Araujo CH, Nastri CO, Filho FM. Endometrial preparation for *in vitro* oocyte maturation: early use of estrogen increases endometrial tissue and requires lower daily dosage: a cross over trial in 'mock' cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2006 May;23(5):241-6.
- [11] Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(2):211-7; discussion 7-8.
- [12] Van Steirteghem A, Tournaye H, Van der Elst J, Verheyen G, Liebaers I, Devroey P. Intracytoplasmic sperm injection three years after the birth of the first ICSI child. *Hum Reprod.* 1995 Oct;10(10):2527-8.
- [13] Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000 Nov;15(11):2394-403.
- [14] Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2000 May;73(5):978-83.
- [15] Child TJ, Sylvestre C, Pirwany I, Tan SL. Basal serum levels of FSH and estradiol in ovulatory and anovulatory women undergoing treatment by in-vitro maturation of immature oocytes. *Hum Reprod.* 2002 Aug;17(8):1997-2002.
- [16] Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003 Aug;18(8):1632-6.
- [17] Cha KY, Chian RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update.* 1998 Mar-Apr;4(2):103-20.

- [18] Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Pregnancy and delivery after cryopreservation of zygotes produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2001 Aug;16(8):1700-2.
- [19] Abdul-Jalil AK, Child TJ, Phillips S, Dean N, Carrier S, Tan SL. Ongoing twin pregnancy after ICSI of PESA-retrieved spermatozoa into in-vitro matured oocytes: case report. *Hum Reprod.* 2001 Jul;16(7):1424-6.
- [20] Mikkelsen A, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the *in vitro* maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction.* 2001; 122: 587-592.
- [21] Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A. Production of embryos from *in vitro*-matured primary human oocytes. *Fertil Steril.* 1996 Jun;65(6):1151-
- [22] Jurema MV.; Nogueira D. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2006; 86(5): 1277-1291.
- [23] Dal Canto MB. *Et al.* IVM: The first choice for IVF in Italy. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(2):159-165.
- [24] Downs SM.; Humpherson PG.; Leese HJ. Pyruvate utilization by mouse is influenced by meiotic status and the cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 113-123.
- [25] Chian RC.; Tan SL. Maturation and developmental competence of cumulus – free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Reprod. Biomed. Online* 2002; 5(2): 125-32.
- [26] Li Y. *et al.* Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured *in vitro*. *Fertil Steril* 2006; 85: 827-832.
- [27] Trounson A. Spindle abnormalities in oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85(4):838.

**Fig. 1 Schematic representation of the IVM cycle protocol used in the present study.**



**Table 1 Comparison of maturation, fertilization, cleavage and good quality embryos rates obtained with the HTF and TCM199 culture media.**

	HTF (n =58)	TCM 199 (n=61)	<i>p</i> value
Number of PB matured oocytes (%)	33 (56.9)	50 (82.0)	0.005
Number of fertilized oocytes (%)	13 (39.4)	35 (70.0)	0.007
Number of embryos (%)	12 (92.3)	32 (91.4)	1,000
Number of Z1 and Z2 embryos (%)	5 (41.7)	26 (81.3)	0.023

*p* value obtained by Fisher's exact test.

NS = not significant.

**Table 2 Number of oocytes retrieved, matured and fertilized and medium used in different studies evaluating unstimulated IVM cycles in PCOS patients.**

Authors	Year	Retrieved	Matured (%)	Fertilized (%)	Medium
Trounson <i>et al.</i> (3)	1994	308	169 (60.4)	69 (40.8)	TCM199
Barnes <i>et al.</i> (21)	1996	165	102 (61.8)	27 (26.5)	TCM199
Cha & Chian (17)	1998	832	499 (60.0)	364 (72.9)	TCM199
Chian <i>et al.</i> (6)	2000	183	142 (77.6)	125 (88.0)	TCM199
Cha <i>et al.</i> (14)	2000	1139	708 (62.2)	481 (67.9)	TCM199
Mikkelsen <i>et al.</i> (20)	2001	81	36 (44.4)	25 (69.4)	TCM199
Chian <i>et al.</i> (18)	2001	63	22 (34.9)	15 (68.2)	TCM199
Abdul-Jalil <i>et al.</i> (19)	2001	12	6 (50)	4 (66.7)	TCM199
Child <i>et al.</i> (15)	2002	1102	834 (75.7)	652 (78.1)	TCM199
Lin <i>et al.</i> (16)	2003	762	548 (71.9)	383 (69.5)	TCM199
Le Du <i>et al.</i> (5)	2005	509	321 (62.9)	225 (70.1)	IVM-Medium
<i>Present study</i>	2006	61	50 (81.9)	35 (70.0)	TCM 199
<i>Present study</i>	2006	58	33 (56.9)	13 (39.4)	HTF

---

---

## **ARTIGO 2**

---

Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana.

Gametogenesis: fundamental stage the development for human reproduction.

Autores – Carlos Henrique Medeiros de Araújo, Maria Cristina Picinato Medeiros de Araújo, Wellington de Paula Martins, Rosana Maria dos Reis.

Setor de Reprodução Humana. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Endereço para correspondência:**

Carlos Henrique Medeiros de Araújo

Rua Campos Salles, 920, apto 42

Bairro Higienópolis.

Ribeirão Preto – SP - CEP: 14015-110

[cm.araujo@uol.com.br](mailto:cm.araujo@uol.com.br)

## Resumo

A reprodução é o mecanismo essencial para perpetuação e diversidade das espécies, assim como para a continuidade da vida. Os gametas são os veículos de transferência dos genes para as próximas gerações. A gametogênese pode ser caracterizada por três etapas distintas denominadas multiplicação (mitose), crescimento e maturação (meiose), que se diferenciam em vários aspectos na espermatogênese e na oogênese. A oogênese diferencia-se da espermatogênese na ocorrência do processo ao longo da vida do indivíduo, no número de gametas formados, nas etapas de multiplicação, crescimento e maturação, assim como nas diferenciações e maturações citoplasmáticas e nucleares dos gametas masculinos e femininos. O processo da oogênese em relação à maturação oocitária ainda merece mais estudos, pois os aspectos bioquímicos e genéticos deste processo precisam ser mais bem esclarecidos. Por meio da gametogênese masculina e feminina a natureza proporcionou a fertilidade e a capacidade de gerar filhos a casais de diferentes espécies que se reproduzem sexuadamente incluindo a espécie humana. Quando existem falhas neste mecanismo por diferentes motivos como oligospermia, teratozoospermia, astenoospermia, azoospermia, ou distúrbios da ovulação, endometriose, fatores tubários, esterilidade sem causa aparente, casais podem recorrer às tecnologias de Reprodução Assistida como inseminação intra-uterina, fertilização *in vitro*, injeção intra - citoplasmática de espermatozóides, e de maturação oocitária *in vitro* para chegarem à plenitude da reprodução.

**Palavras-chave:** gametogênese, maturação *in vitro* de oócitos, meiose, técnicas de reprodução assistida.

**Abstract.**

The reproduction is the essential mechanism for perpetuation and diversity of the species, as well as for the continuity of the life. The gametes are the vehicles of transfer of the genes for the next generations. The gametogenesis can be characterized by three stages denominated different multiplication (mitosis), growth and maturation (meiosis), which differ in several aspects in the spermatogenesis and in the oogenesis. The oogenesis differs of the spermatogenesis in several aspects as in the occurrence of the process along the individual's life such as in the number of formed gametes, in the multiplication stages, growth and maturation, as well as in the differentiations and cytoplasmic and nuclear maturations of the masculine and feminine gametes. The process of the oogenesis in relation to the oocyte maturation still deserve many studies, because the biochemical and genetic aspects of this process need to be better explained. Through the masculine and feminine gametogenesis the nature provided the fertility and the capacity of generating children to you marry of different species that sexually reproduce including the human species. When flaws exist in this mechanism for different reasons as oligospermy, teratozoospermia, astenoospermia, azoospermia or ovulation disturbs, endometriosis, tubal factors, or unexplained infertility couples can fall back upon the technologies of Assisted Reproduction as *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injections, artificial insemination, *in vitro* maturation of oocytes to reach the fullness of the reproduction.

**Keywords:** gametogenesis, *in vitro* maturation of oocytes, meiosis, assisted reproduction techniques.

## Introdução

A reprodução é o mecanismo essencial para perpetuação e diversidade das espécies, assim como para a continuidade da vida. As diferentes espécies possuem grande variedade de mecanismos de propagação nos diferentes ambientes que se encontram como os mecanismos de reprodução sexuada, reprodução assexuada, partenogênese, entre outros.

Os gametas são os veículos de transferência dos genes para as próximas gerações. Apesar das dificuldades de estudos das células germinativas em seus micro-ambientes como as estruturas foliculares dos ovários e da maturação de oócitos *in vitro* muitos avanços científicos e tecnológicos já foram conseguidos na obtenção de bebês saudáveis na espécie humana por técnicas de reprodução assistida<sup>1</sup>.

A gametogênese humana é o fenômeno biológico de formação dos oócitos secundários e espermatozóides. A gametogênese pode ser caracterizada por três etapas distintas denominadas multiplicação (mitose), crescimento e maturação (meiose), que se diferenciam em vários aspectos na espermatogênese e na oogênese.

## Oogênese

A gametogênese feminina é denominada oogênese ou ovogênese e inicia-se no interior dos folículos ovarianos, que são as unidades funcionais e fundamentais dos ovários. Tem início ainda na vida intra-uterina, quando as células germinativas, derivadas do embrião feminino, passam pela fase de multiplicação até aproximadamente a 15<sup>a</sup> semana da vida fetal<sup>2</sup>, sofrendo divisões mitóticas dando origem as oogônias.

As oogônias a seguir passam por uma fase de crescimento dando origem aos oócitos primários.

Os oócitos primários passarão pelas fases de maturação que correspondem às divisões meióticas. Nas recém-nascidas, parte deste processo de maturação já ocorreu, isto é, a primeira divisão da meiose já se iniciou e o oóцит primário encontra-se estacionado em prófase I na subfase de diplóteno<sup>3</sup>.

Alguns estudos sugerem que o processo meiótico fica inibido pela ação de um fator inibidor da maturação do oóculo (OMI). Além deste fator é importante também à ação do fator promotor da maturação (MPF), que é um dímero, complexo protéico formado por duas subunidades denominadas Cdc (proteína quinase) e a ciclina, que é uma proteína reguladora, que controla a capacidade da Cdc fosforilar proteínas – alvo adequadas<sup>4</sup>.

A atividade do MPF é controlada pelo padrão cíclico de acúmulo e degradação da ciclina, que é um de seus componentes. A montagem do dímero Cdc-ciclina, sua ativação e posterior degradação são processos centrais que controlam o ciclo celular. A figura 1 mostra a variação do complexo MPF desde o estágio de diplóteno até a metáfase II, que são dois estágios em que a meiose fica estacionada ao longo do processo de maturação.

No diplóteno da prófase I os cromossomos estão duplicados e apresentam duas cromátides. Nessa fase podem ser observados os quiasmas (pontos de cruzamentos entre cromátides não irmãs), devido à ocorrência do *crossing - over*.

O oócito neste estágio é identificado morfológicamente pela visualização da vesícula germinativa, que caracteriza o oócito com núcleo bem desenvolvido, imaturo e em final de prófase I.

A quebra da vesícula germinativa marcará a continuidade da meiose e do processo de maturação oocitária<sup>5</sup>.

Os oócitos ficam neste estágio de prófase I (diplóteno) até a mulher atingir a puberdade e o processo se completará apenas na adolescência por influência das gonadotrofinas hipofisárias.

Os ovários apresentam nas mulheres recém - nascidas uma média de um a dois milhões de folículos primordiais<sup>6</sup>. Os folículos primordiais são unidades formadas por uma camada de células achatadas que envolvem o oócito primário. A partir do folículo primordial forma-se o folículo secundário e em seguida o folículo pré - antral, caracterizado pela proliferação de células da granulosa, que ficam evolvidas pelas células da teca.

Entre as células da granulosa é secretado o fluido folicular que se acumula no espaço intersticial promovendo a formação da cavidade antral, caracterizando o folículo antral. Com a formação do antro, o oócito primário passa a ocupar uma posição deslocada para um dos lados do folículo ficando rodeado por várias camadas de células denominadas de *cumulus oophorus*. O fluido folicular acumulado na cavidade antral é importante na nutrição das células da granulosa e do oócito.

Em ciclos naturais, o desenvolvimento folicular desde a fase de folículo secundário, quando o folículo atinge 2 a 5 mm, até a fase antral sofre influência do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) secretado pela hipófise anterior. Nesta fase os folículos tornam-se gonadotrofina – dependentes para seu desenvolvimento.

Sob a ação do FSH, ocorre o crescimento e o desenvolvimento folicular e o folículo antral chega à fase de folículo pré - ovulatório<sup>7</sup>. Próxima à ovulação, o pico do Hormônio Luteinizante (LH) induz a quebra da vesícula germinativa e o processo de meiose é reiniciado.

O oócito primário que estava estacionado em diplóteno, que é a fase mais longa da prófase I, podendo durar ao redor de 40 anos, entra em diacinese, finalizando a prófase I. A seguir o oócito I atinge a metáfase I em que os pares de cromossomos homólogos duplicados, pareados e num grau de condensação maior distribuem-se na placa equatorial da célula.

A continuidade da maturação oocitária é caracterizada pela chegada do oócito I a anáfase I. Nesta fase os pares de cromossomos homólogos que estão pareados migram para os pólos opostos da célula. A orientação da disjunção dos cromossomos homólogos para os pólos da célula é realizada pelo encurtamento das fibras do fuso meiótico. Esta separação dos cromossomos homólogos na anáfase I caracteriza a meiose como um processo reducional em que a ploidia da célula é reduzida à metade, isto é, o número de cromossomos  $2N = 46$  cromossomos passa para  $N = 23$  cromossomos.

A redução do número de cromossomos à metade da ploidia nos gametas é fundamental para a estabilidade do número de cromossomos da espécie. A ploidia é reconstituída no momento da fecundação.

Quando o oócito I atinge a telofase I, estará terminada a primeira divisão da meiose sendo formado o oócito secundário ( $N$ ) e um corpúsculo polar ( $N$ ). O oócito secundário é o verdadeiro gameta feminino que é liberado com o rompimento do folículo ovulatório.

A ação do LH é importante para a formação do corpo lúteo a partir do folículo ovulatório<sup>8</sup>, que sofre degeneração se não ocorrer à fecundação. A figura 2 mostra os vários estágios do processo de maturação folicular desde o estágio de folículo primordial até a liberação do oócito secundário no fenômeno da ovulação.

No ciclo ovulatório muitos folículos podem passar pelos processos de crescimento e diferenciação, mas é comum que apenas um deles chegue à ovulação ocorrendo o processo de atresia para os folículos menores. Ao longo da vida da mulher o processo de atresia é responsável pela redução de milhões de folículos. Uma mulher durante a vida reprodutiva produz a partir da puberdade um oócito secundário a cada ciclo de ovulação, que em média ocorre a cada 28 dias, assim aproximadamente 400 folículos é que efetivamente vão liberar o oócito secundário a partir da menarca até a menopausa<sup>6</sup>.

O oócito secundário, agora com um conjunto haplóide ( $N$ ) de cromossomos inicia a segunda divisão da meiose passando pela prófase II, atingindo a metáfase II. A segunda divisão da meiose é novamente bloqueada em metáfase II e será concluída se ocorrer a fertilização.

Ao longo da maturação oocitária a formação do primeiro corpúsculo polar é um sinal da finalização da meiose I, e a formação do segundo corpúsculo polar é um indicativo da fertilização do óvulo.

## Espermatogênese

A gametogênese masculina é denominada espermatogênese e ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. É um processo contínuo na vida do homem após ser atingida a puberdade. A maturação das células germinativas para formação dos espermatozoides ocorre até o final da vida do indivíduo, em que cada espermatogônia dará origem a quatro espermatozoides.

As espermatogônias que foram formadas durante a vida fetal e estavam dormentes nos túbulos seminíferos, entram em fase de multiplicação na puberdade dando origem a muitas espermatogônias por mitoses sucessivas<sup>10</sup>.

Após a fase de multiplicação, cada espermatogônia formada entra na fase de crescimento e dá origem a dois espermatócitos primários. Em seguida os espermatócitos primários passam pela fase de maturação, que corresponde às divisões de meiose.

Cada espermatocito primário ao sofrer a primeira divisão da meiose dá origem a dois espermatócitos secundários. Esta primeira divisão da meiose é reducional, assim os espermatócitos secundários passam a ter metade do número de cromossomos, isto é, cada espermatocito secundário é uma célula haplóide (N), ao contrário dos estágios anteriores de espermatogônias e espermatócitos primários que são diplóides (2N).

A continuidade do processo de maturação ocorre com a segunda divisão da meiose nos espermatócitos secundários que darão origem as espermátides, que também são células haplóides. Cada espermátilde passa pelo fenômeno da espermogênese, que corresponde ao processo de diferenciação celular para formação dos verdadeiros gametas masculinos. Durante a espermogênese as espermátides ganham o acrosomo e a cauda (flagelo). O acrosomo está localizado na região anterior da cabeça do espermatozóide e corresponde a uma aglomeração de vesículas secretadas a partir do complexo de Golgi.

No acrosomo estão presentes várias enzimas, entre elas a hialuronidase que têm papel fundamental no momento da fecundação, pois as atividades destas enzimas favorecem a entrada do espermatozóide através da corona radiata e da zona pelúcida durante o processo de fertilização.

A cauda do espermatozóide é fundamental para a mobilidade do gameta masculino até o local da fertilização. Para ocorrer o movimento de chicoteamento da cauda do espermatozóide, as mitocôndrias da cauda fornecem ATP (adenosina trifosfato), que é fonte de energia para a locomoção<sup>11</sup>.

A espermatogênese desde a origem das espermatogônias até a formação dos espermatozoides, passando pela espermiogênese, ocorre em aproximadamente dois meses<sup>10</sup>.

A figura 3 mostra o momento da penetração do espermatozóide através das células foliculares para atingir o óvulo secundário. O óvulo fertilizado sofrerá clivagens originando o embrião, que se desenvolverá no interior do útero materno.

A gametogênese feminina diferencia-se da masculina em vários aspectos como na ocorrência do processo ao longo da vida do indivíduo, no número de gametas formados, nas etapas de multiplicação, crescimento e maturação, assim como nas diferenciações e maturações citoplasmáticas e nucleares dos gametas masculinos e femininos. A tabela 1 mostra as principais diferenças na gametogênese humana.

### **Ação das gonadotrofinas e fatores de inibição ou de promoção da meiose.**

Para ocorrência da maturação oocitária, além da ação das gonadotrofinas deve ocorrer à redução dos fatores de inibição da maturação oocitária, além da presença de nutrientes estruturais e energéticos específicos necessários ao metabolismo da maturação. As gonadotrofinas induzem a quebra da vesícula germinativa de óvulos crescidos do folículo antral ou de óvulos isolados e envolvidos por células do *cumulus* *in vivo* ou em modelos experimentais *in vitro*.

As gonadotrofinas não apresentam o mesmo efeito em óvulos pobres em células somáticas do *cumulus*. Neste mecanismo podem estar envolvidos estímulos positivos gerados pelas células foliculares e/ou falta de fatores que determinam à inibição da meiose<sup>12</sup>.

As gonadotrofinas estimulam aumento de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e ativam os níveis de proteína quinase ativadora da meiose nas células da granulosa. Ocorre passagem de sinais indutores da meiose pelas células da granulosa que estão em comunicação com o óvulo pelas *gap-junctions*. Esta ativação ocorre por meio da ativação das proteínas quinases e fatores promotores da meiose (MPF). Quando as *gap-junctions* entre células da granulosa e óvulos são desfeitas, termina a transmissão de fatores que estacionam a meiose do óvulo<sup>13</sup>. O número de moléculas de proteínas quinases reguladas pelas ciclinas (Cdc -

cilina B), que formam o MPF, aumenta muito quando o oócito adquire competência para sofrer a quebra da vesícula germinativa e reinicializar a meiose<sup>14</sup>.

No início do período G1 da interfase ocorre a formação dos complexos de pré-replicação de DNA, a desativação do complexo promotor da anáfase (APC) e ativação dos componentes protéicos do período S da interfase, que atuarão na duplicação do DNA. Entre os períodos G2 da interfase e prófase os complexos protéicos MPF ativam a condensação dos cromossomos, o rompimento da carioteca e a formação das fibras do fuso de divisão. Durante a metáfase este complexo MPF ativa o complexo promotor da anáfase (APC), a partir da fosforilação do APC inativo.

O APC degrada o inibidor da anáfase sendo possível então à migração dos cromossomos ou das cromátides para os pólos da célula caracterizando respectivamente a anáfase I e anáfase II da meiose. A atividade do MPF é dependente da proteína ciclina B, que é sintetizada entre o final do período G2 da interfase e início da prófase<sup>15</sup>.

Por meio da ação do APC é degradado o inibidor da anáfase e logo em seguida ocorre também à degradação da unidade ciclina B do complexo MPF. Na telófase os níveis de ciclina B diminuem e a atividade do MPF é baixa. A partir daí a célula entra novamente em interfase (G1). A figura 4 mostra o mecanismo de regulação do ciclo celular por meio da ação do MPF e do APC.

Muitos aspectos da oogênese em relação à maturação oocitária ainda merecem mais estudos, pois os aspectos bioquímicos e genéticos deste processo precisam ser mais estudados. Também existem muitas dúvidas sobre os mecanismos de pareamento e recombinação de cromossomos homólogos durante a prófase I da meiose. Embora muitas moléculas fundamentais para o controle do início e da parada da meiose já sejam conhecidas, muitas questões a respeito de suas origens e funções ainda devem ser esclarecidas. Outra dúvida ainda é sobre a natureza dos substratos de muitas enzimas. Além disso, a identidade de ligantes das células da granulosa envolvidos na geração de cAMP nos oócitos ou sinalizadores da reinicialização da meiose (maturação nuclear) ainda não são conhecidos. No aspecto genético, genes de efeito materno ainda devem ser descobertos no processo de maturação oocitária.

## **Considerações finais**

Por meio da gametogênese masculina e feminina a natureza proporcionou a fertilidade e a capacidade de gerar filhos a casais de diferentes espécies que se reproduzem sexuadamente incluindo a espécie humana. Quando existem falhas neste mecanismo por diferentes motivos como oligospermia, teratozoospermia, astenoospermia, azoospermia ou mesmo anovulação crônica, endometriose, fatores tubários ou esterilidade sem causa aparente, casais podem recorrer às tecnologias de Reprodução Assistida como inseminação intrauterina, fertilização *in vitro*, injeção intra-citoplasmática de espermatozóides, e de maturação oocitária *in vitro* para chegarem à plenitude da reprodução.

## Referências

1. Roy A, Matzuk MM. Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction* 2006; 131:207-19.
2. Houillon, C. Espermatozônese - Ovogênese. In\_\_\_\_\_.Sexualidade. São Paulo: Edgard Blucher, cap. 2, p. 17- 36.
3. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biological Reproduction* 1990; 43:543-7.
4. Scott JRT.; Hodgen G.D. The ovarian follicle: life cycle of a pelvic clock. *Clin Obstet Gynecol* 1990; 3(3): 551- 562.
5. Veeck LL. Gamete Maturation. An atlas of human gametes and Conceptuses. An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology, New York, New York: The Parthenon Publishing Group; 1999 ; p. 15-24.
6. Salha O, Busheika NA, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reproduction* 1988; 4:816 – 32.
7. Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. The ovarian follicular apparatus. *Reproductive Endocrinology Sugery, and Technology*. New York, New York: Lippincott - Raven – Publishers; 1995. p. 18-40
8. Chian, RC.; Buckett W.M.; Tan, S.L. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed* 2003; 8(2): 148– 166.
9. Starr, C. Reproduction and Development. In\_\_\_\_\_. *Biology a Human Emphasis*. 3nd ed. Belmont, California: Wadsworth publishing Company, cap. 34, p. 590 - 627.
10. Moore KL, Persaud TVN. Início do Desenvolvimento Humano: Primeira Semana. Embriologia Clínica. 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000 p. 15-43.

11. Oura C, Toshimori K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol.* 1990;122:105-51.
12. Downs SM, Daniel SAJ, Eppig JJ. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor. Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J.Exp. Zool* 1988; 245:61-71.
13. Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, et al. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* 2002; 143: 2221-32.
14. Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: Absolute amounts of p34(cdc2), cyclin b1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biol. Reprod* 2000; 63:1610-16.
15. Burrows AE, Sceurman BK, Kosinski ME, *et al.* The *C. elegans* Myt1 ortholog is required for the proper timing of oocyte maturation. *Development* 2006; 133: 697-709.

## FIGURAS

Figura 1: Variação do complexo MPF ao longo do processo de maturação oocitária.

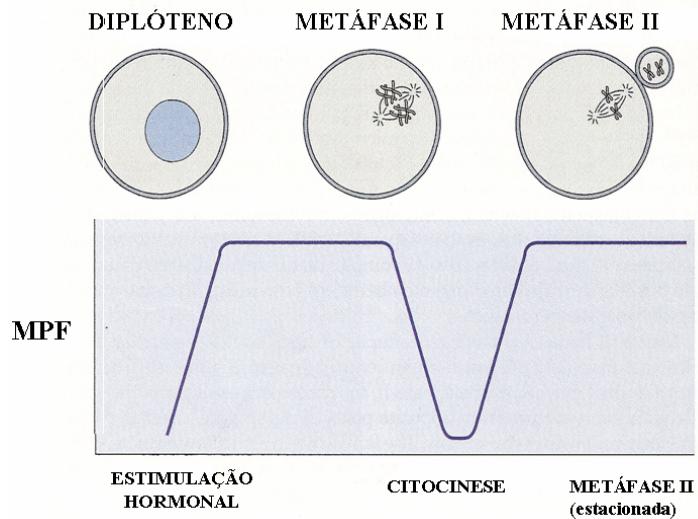


Figura 2: A figura mostra o processo de maturação folicular desde o folículo primordial até o folículo pré - ovulatório, que em seguida passa pelo fenômeno da ovulação com a liberação do oóцитio secundário. Adaptado de Biology a Human Emphasis<sup>9</sup>

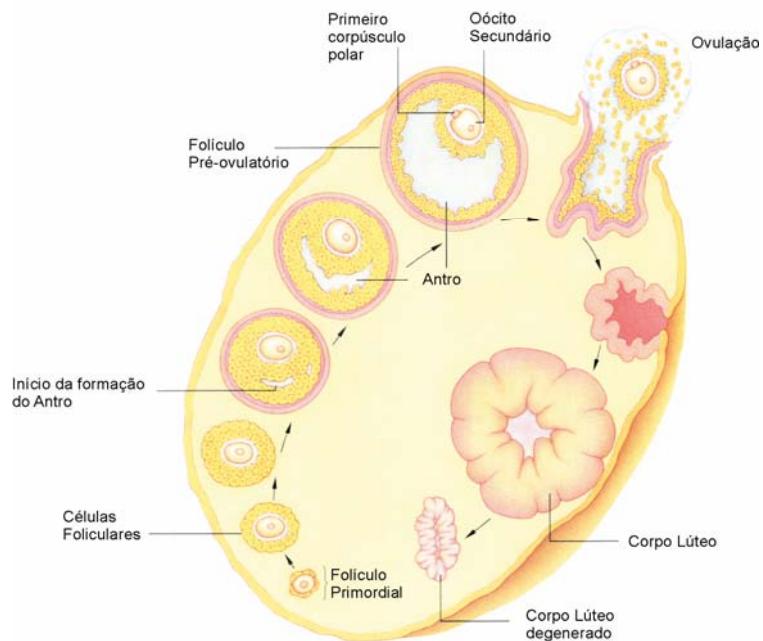


Figura 3: O esquema mostra o momento da penetração do espermatozóide no oócito secundário. Adaptado de Biology a Human Emphasis<sup>9</sup>.

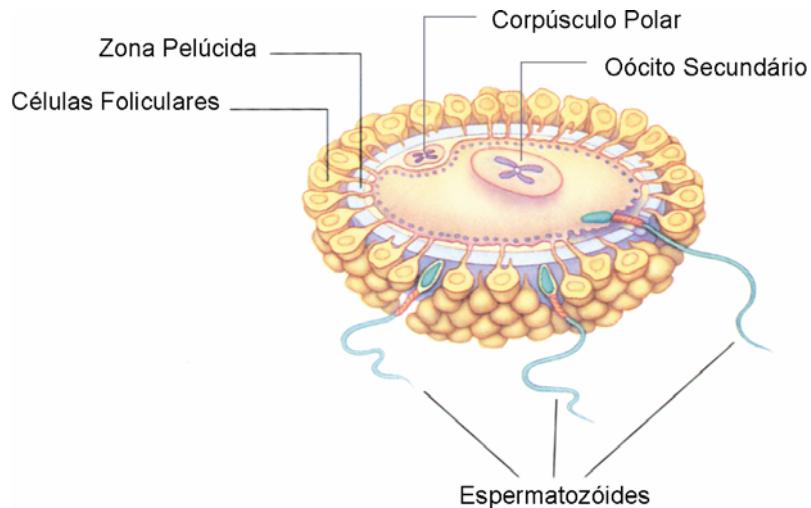


Figura 4 - Mecanismo de regulação do ciclo celular por meio da ação do fator promotor da meiose (MPF) e do complexo promotor da anáfase (APC). G1 e G2 (interfase), P (prófase), M (metáfase), A (anáfase), T (telófase).

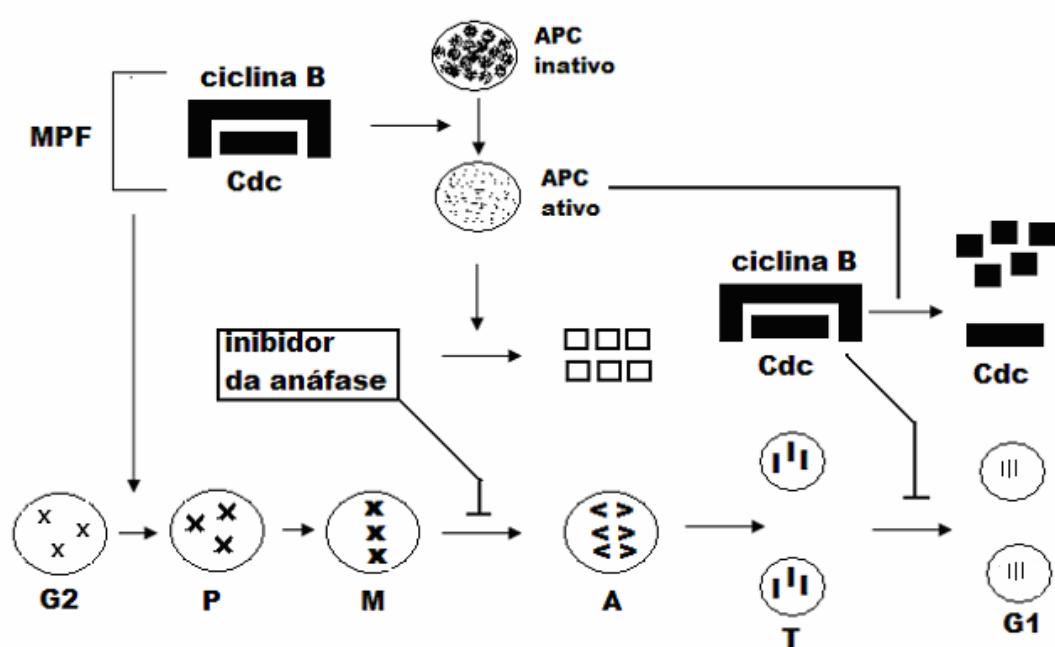


Tabela 1: Parâmetros que diferenciam a oogênese da espermatogênese.

	<i>Gametogênese feminina</i>	<i>Gametogênese masculina</i>
Duração	Inicia-se na vida embrionária e é retomada no período menacne - menopausa.	Inicia-se na puberdade e pode ocorrer durante toda vida.
Gametas formados	1 oócito para cada oogônia	4 espermatozóides por espermatogônio
Etapa de multiplicação	Ocorre na vida intra-uterina (até o 3º mês do desenvolvimento embrionário).	Ocorre ao longo da vida a partir da puberdade.
Etapa de maturação	Meiose I - oócito II e 1 corpúsculo polar Meiose II - pré - embrião e 2 corpúsculos polares	Meiose I - 2 espermatócitos II Meiose II - 4 espermatozóides
Diferenciação citoplasmática	Divisão desigual com formação de corpúsculos polares.	Formação de acrosomo e flagelo.