

MARIA CLARA MAGALHÃES DOS SANTOS AMARAL

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS HUMANOS E
POSTERIOR FERTILIZAÇÃO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2001

MARIA CLARA MAGALHÃES DOS SANTOS AMARAL

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS HUMANOS E
POSTERIOR FERTILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2001

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS HUMANOS E
POSTERIOR FERTILIZAÇÃO**

MARIA CLARA MAGALHÃES DOS SANTOS AMARAL

**Dissertação de Mestrado
apresentada e defendida
perante a Comissão
Examinadora composta pelos
professores:**

DR. AROLDO FERNANDO CAMARGOS
(ORIENTADOR)

DR. VICTOR HUGO DE MELO

DR. FERNANDO MARCOS REIS

DRA. CLÁUDIA NAVARRO CARVALHO DUARTE LEMOS

BELO HORIZONTE - 2001
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da
Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais
2001

DEDICATÓRIA

*à Isa,
por fazer tudo valer a pena.*

*ao Gustavo,
por ter estado ao meu lado durante toda esta caminhada.*

*aos meus pais, Cláudio e Dorinha,
pela dedicação sempre sem limites e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Aos **casais** que, no sofrimento da infertilidade, viram neste trabalho a esperança do filho tão desejado, não poupando empenho na participação do mesmo.

Ao **Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos**, por ter me dado a oportunidade única de trabalhar a seu lado, desfrutar de seu conhecimento e, desta forma, aprender um pouco sobre o universo da reprodução humana. E, ainda, por ter despertado em mim o interesse pela maturação oocitária *in vitro*, guiando-me em todos os passos desta pesquisa. Minha eterna gratidão.

À **Maria das Graças Rocha de Santana Camargos**, bióloga responsável pelo Laboratório do Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Minas Gerais, meu braço direito nesta pesquisa, que, com extrema dedicação, doou seu conhecimento, tempo e talento, fundamentais para a execução das etapas laboratoriais deste trabalho. Os resultados obtidos não seriam os mesmos sem a sua participação. Muitíssimo obrigada!

Ao **Serono** pela doação das ampolas de Gonal-F®.

Ao **Medley** pela doação dos comprimidos de Estrofen®.

Aos colegas **Sandra Cristina Gonçalves, Rubens Lene Tavares, Rodrigo Teófilo, Umberto Marzullo Filho, Maria Amélia Sarmiento e Paulo Henrique Boy Torres**, que me auxiliaram durante as coletas ovulares.

À **Inêz Maria dos Santos** que, cuidando com dedicação do meu maior tesouro, me permitiu o tempo para a execução deste trabalho.

À **Fernanda Polisseni**, pelo apoio e amizade.

A **Oswaldo Scarpa Magalhães Alves**, pelo imenso incentivo para a realização deste trabalho.

À **Denise Duarte Scarpa Magalhães Alves**, pelas orientações estatísticas no início desta pesquisa.

A **Zélia e Ricardo Vargas**, amigos especiais que se **dobraram e desdobraram** para a conclusão deste trabalho.

Ao **Paulo Ferreira Silva**, funcionário do setor de periódicos da biblioteca Baeta Viana da Universidade Federal de Minas Gerais, que se empenhou com enorme dedicação para auxiliar-me na realização da pesquisa bibliográfica.

À **Luciana Mangualde Santos Amaral Cambraia**, pelo desenho das ilustrações gráficas.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	8
<u>LISTAS DE FIGURAS</u>	9
<u>LISTA DE TABELAS</u>	10
<u>RESUMO</u>	11
<u>SUMMARY</u>	12
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	12
<u>1.1 Infertilidade e técnicas de reprodução assistida</u>	13
<u>1.2 Embriologia</u>	15
<u>1.3 A maturação oocitária e fertilização in vitro</u>	22
<u>1.3.1 Aspectos históricos</u>	22
<u>1.3.2 Fatores que afetam a maturação oocitária in vitro</u>	27
<u>1.3.2.1 Idade</u>	27
<u>1.3.2.2 Patologias</u>	29
<u>1.3.2.3 Ciclo menstrual</u>	32
<u>1.3.2.4 Ciclos naturais</u>	32
<u>1.3.2.5 Ciclos estimulados</u>	34
<u>1.3.2.6 Meios de cultivo - Substâncias adicionadas</u>	36
<u>1.3.2.7 Fatores preditivos de sucesso</u>	45
<u>1.3.2.8 Perspectivas futuras</u>	46
<u>1.3.2.9 Possíveis complicações da maturação in vitro</u>	47
<u>2 OBJETIVOS</u>	48
<u>3 PACIENTES E MÉTODOS</u>	50
<u>3.1 Critérios de inclusão</u>	51
<u>3.2 Critérios de exclusão</u>	52
<u>3.3 Métodos</u>	53
<u>3.3.1 Estímulo ovariano</u>	53
<u>3.3.2 Parte Clínica - A coleta ovular</u>	56
<u>3.3.3 Parte Laboratorial - Identificação dos oócitos</u>	56
<u>3.3.4 O meio de maturação</u>	58
<u>3.3.5 A inseminação</u>	59
<u>3.3.6 A Fertilização</u>	63
<u>3.3.7 O Endométrio</u>	64
<u>4 RESULTADOS</u>	67
<u>5 DISCUSSÃO</u>	70
<u>6 CONCLUSÕES</u>	78
<u>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	80
<u>8 ANEXOS</u>	95

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
E2	Estradiol
EAM	Esterol ativador de meiose
ESCA	Esterilidade sem causa aparente
FCE	Fator de crescimento epidérmico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HMG	Gonadotrofina da mulher menopausada
ICSI	Injeção intra-citoplasmática de espermatozóide
IGF-I	Fator de crescimento insulina símile I
IMC	Índice de massa corporal
LH	Hormônio luteinizante
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	Posto de atendimento médico
RNA	Ácido ribonucléico
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
SHO	Síndrome de hiperestímulo ovariano

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Oócito em prófase I	17
Figura 2 -	Folículo Antral	18
Figura 3 -	Oócito em metáfase II	19
Figura 4 -	Oócito em metáfase I	21
Figura 5 -	Oócito fertilizado (Presença de dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares)	22
Figura 6 -	Fluxograma do tratamento das pacientes	55
Figura 7 -	Oócito Imaturo	57
Figura 8 -	Sêmen + Dulbecco's e homogeneizados	59
Figura 9 -	Retirada do sobrenadante / dois ml Dulbecco's	60
Figura 10 -	Retirada do sobrenadante / 1ml IVF	60
Figura 11 -	Tubo a 45° / seleção dos melhores espermatozóides	61
Figura 12 -	Sobrenadante para inseminação	61
Figura 13 -	Esquema preparo de sêmen pela técnica do <i>swim-up</i>	62
Figura 14 -	Embriões em cateter de <i>tom cat</i>	64
Figura 15 -	Protocolo de tratamento das pacientes	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização das pacientes.....	53
TABELA 2 - Captação, maturação, fertilização, desenvolvimento embrionário e taxas de gravidez de oócitos humanos maturados in vitro.....	69
TABELA 3 - Caracterização dos ciclos por épocas.....	69

RESUMO

Um estudo prospectivo não randomizado descritivo foi realizado no período de novembro de 1999 a março de 2001 em 20 ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) de 15 pacientes com infertilidade tubária. O objetivo do presente trabalho foi coletar os oócitos ainda imaturos, maturá-los *in vitro*, fertilizá-los e transferi-los almejando gravidez. As pacientes foram recrutadas no Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas e nos ambulatórios de infertilidade do Posto de Atendimento Médico (PAM) da Sagrada Família. Todas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciar o estudo. O protocolo foi aprovado pelo colegiado do curso de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia. As pacientes selecionadas apresentaram idade entre 18 e 32 anos incompletos e receberam 300UI de hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante por via intra-muscular no segundo dia do ciclo e doses adicionais de 150UI no quarto e no sexto dia do ciclo. A coleta ovular deu-se invariavelmente no sétimo dia do ciclo. Os oócitos identificados como imaturos foram colocados em meio TCM 199 acrescido de antibióticos, piruvato, FSH, gonadotrofina coriônica humana (hCG) e soro (*serum substitute supplement – Irvine Scientific*®). Após 48h de cultivo, os oócitos que atingiram o estágio de metáfase II (MII) foram inseminados e os fertilizados transferidos. Foram puncionados 144 folículos com a coleta de 67 oócitos imaturos (46,5%). Atingiram o estágio de metáfase II 43 (64,2 %) e foram inseminados. Destes, 30 fertilizaram e 25 embriões foram transferidos para 10 pacientes. Houve uma gravidez com nascimento de um bebê. Concluiu-se que a técnica de maturar oócitos humanos *in vitro* previamente à fertilização *in vitro* é uma técnica totalmente exequível, capaz de gerar gravidez.

SUMMARY

A prospective non randomized, descriptive study was carried out, during the period of November of 1999 until March of 2001, with 20 cycles of in vitro fertilization (IVF) of 15 patients with tubal infertility. The aim of this study was to retrieve immature oocytes for in vitro maturation, in vitro fertilization and embryo transfer in order to achieve pregnancy. The patients were recruited at the Human reproduction Center of Hospital das Clínicas and at out patients department of infertility from Posto de Atendimento Médico (PAM) Sagrada Família. All of them have signed the written consent before the study's beginning. The protocol was approved by board of Gynecology and Obstetrics. The selected patients were at least 18 and at most 32 years of age not completed and received 300UI of follicle stimulating hormone (FSH) recombinant by intramuscular injection at second day of the cycle and additional doses of 150UI at fourth and sixth day of cycle. The oocyte retrieval was performed always at seventh day of the cycle. Those oocytes classified as immatures were cultured in TCM-199 medium with antibiotics, pyruvate, FSH, human corionic gonadotropin (hCG) and serum (serum substitute supplement – Irvine Scientific®). After 48 hours of culture oocytes that achieved metaphase II (MII) stage were inseminated, and the fertilized ones transferred. 144 follicles were aspirated, 67 immature oocytes were recovered, 43 achieved the MII stage and were inseminated. 30 fertilized and 25 embryos were transferred to 10 patients. There was one pregnancy with a baby born. We conclude that to mature in vitro human oocytes before in vitro fertilization is a procedure able to achieve pregnancy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infertilidade e técnicas de reprodução assistida

A Associação Americana de Medicina Reprodutiva define como infertilidade a falta de gestação detectada clínica ou hormonalmente após 12 meses de relações sexuais normais sem anticoncepção (SPEROFF, 1995). De acordo com essa definição, a infertilidade acomete 10 a 15% dos casais (FORTI & KRAUZ, 1998). Já para a Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia, infertilidade é a ausência de gravidez após dois anos de coitos regulares desprotegidos, e a prevalência de casais inférteis na Europa e América do Norte é de 5 a 11% (CROSIGNANI & RUBIN, 1996).

Segundo FORTI & KRAUZ, 1998 as causas de infertilidade podem ser divididas em quatro categorias maiores: 1) fator feminino; 2) fator masculino; 3) combinado; 4) esterilidade sem causa aparente (ESCA). Reporta-se geralmente como: 35% de causa feminina, 30% causa masculina, 20% associação de causa masculina e feminina e, em 15%, o diagnóstico não pode ser feito, apesar de completa investigação (FORTI & KRAUZ, 1998).

O horizonte da infertilidade tem-se ampliado e diversificado nos últimos anos. A introdução de opções tecnológicas tem “medicalizado” o problema, que antes era de ordem quase exclusivamente psicossocial (TUBERT, 1991 *apud* BADALOTTI *et al.*, 1997). O diagnóstico para os casais inférteis adquiriu alta precisão e a possibilidade de conceber por meio da tecnologia reprodutiva tem aumentado cada vez mais (ACOG, 1989). O homem passou a se intrometer na natureza para obter “pré-embriões” juntando óvulos e espermatozóides (STEPTOE&EDWARDS, 1978).

A primeira experiência de fertilização *in vitro* em humanos data de 1944 (ROCK & MENKIN, 1944). Em 1955, CHANG teve sucesso na fertilização *in vitro*, denominada também inseminação *in vitro*, juntando gametas de coelhos. A primeira gestação de sucesso de um ciclo de fertilização *in vitro* (FIV) em humanos deu-se de um ciclo natural, ovulatório (STEPTOE & EDWARDS, 1978). E a primeira série de pacientes que conceberam após ciclos de FIV também foi com ciclos naturais (EDWARDS *et al.*, 1980).

Os ciclos naturais foram abandonados e o uso da estimulação ovariana tornou-se prática padrão num esforço de se captar mais oócitos e aumentar as taxas de gravidez. Outras inovações também ocorreram, como: melhorias nas técnicas de cultivo oocitário, preparo de sêmen e coleta ovular, que hoje predominantemente é realizada por via endovaginal guiada por ultra-som (DAYA *et al.*, 1995). O regime de hiperestímulo ovariano também foi aprimorado com o uso dos análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que resultou em melhores taxas de gravidez (HUGHES *et al.*, 1992).

Apesar de todas as vantagens dos novos protocolos estabelecidos, a estimulação ovariana padrão não é isenta de riscos. A síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO) é uma complicação já bem conhecida (RIZK & SMITH, 1992). Além disso, os trabalhos de WHITTEMORE *et al.*, 1992 e ROSSING *et al.*, 1994, reportaram uma possível associação entre tumores ovarianos e o uso de indutores da ovulação (embora sem condições de inferir certezas devido as metodologias empregadas). Finalmente, os altos custos associados à estimulação ovariana para ciclos de FIV tornam a terapia inacessível a vários casais inférteis (DAYA *et al.*, 1995).

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos surgiu como uma alternativa interessante e trouxe várias vantagens sobre a superovulação convencional. A maioria dos protocolos de MIV é relativamente simples para ambos, médico e paciente, com menor número de avaliações, reduzido período de tratamento e uma significativa redução nos custos com medicamentos. Concomitantemente qualquer seqüela da superovulação ovariana a curto ou longo prazo é completamente abolida, vantagens significativas que fazem com que mais pacientes possam se tornar doadoras (RUTHERFORD, 1998).

1.2 Embriologia

A maturação oocitária é um processo que se inicia cedo, ainda na vida fetal, mas que não é concluída até que a fertilização aconteça; freqüentemente, cerca de uma e meia a duas décadas depois de iniciado o evento (SEIBEL, 1990).

Três semanas após a concepção, as células germinativas primordiais já podem ser identificadas no epitélio da vesícula vitelina próximo ao alantóide em desenvolvimento. Essas células, através de movimentos amebóides, progridem até a região dos rins em desenvolvimento (mesonefros) e, finalmente, até a crista gonadal que se encontra adjacente e posteriormente se transformar-se-ão na gônada (EDDY *et al.*, 1981).

Em torno da quinta semana, as células germinativas começam a se replicar por divisões mitóticas e são chamadas oogônias. Em torno de 16 a 20 semanas de gestação este processo resultará cerca de seis a sete milhões de oogônias. A partir de então, a quantidade de células germinativas diminuirá até que, por ocasião do

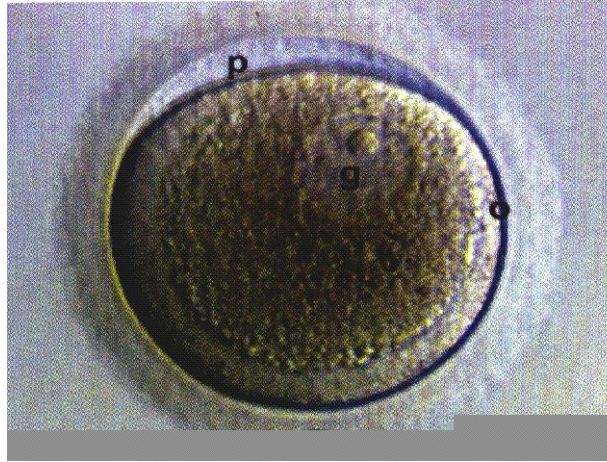
nascimento, estejam presentes apenas cerca de um a dois milhões de oogônias, que continuarão a diminuir em número através de crescimento e atresia. Nenhuma oogônia é formada após o nascimento (BAKER., 1963 *apud* SPEROFF *et al.*, 1995).

Todas as oogônias remanescentes entrarão em intérfase, período em que o ácido desoxirribonucléico (DNA) será replicado em preparação para a meiose. Com isso, elas terão seu tamanho aumentado e se transformar-se-ão em oócitos (primários), dando entrada na primeira divisão da meiose. Os oócitos primários circundados por uma camada de células planas constituem os folículos primordiais (KARP & BERRILL, 1981).

A gametogênese feminina (que tem origem a partir da meiose) inicia-se com 11 a 12 semanas de gestação, talvez em resposta a um fator ou fatores produzidos pelo parênquima ovariano (GONDOS *et al.*, 1986). Ocorre que, logo após iniciada a meiose, ela é suspensa no diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica (prófase I). É o chamado dictióteno. Admite-se que o dictióteno seja provocado pela produção de uma substância, fator inibidor da maturação, ou outras substâncias ainda não elucidadas (MOOR *et al.*, 1998) que impeçam a continuação da meiose (SPEROFF *et al.*, 1995).

A saída do dictióteno e a retomada da meiose só ocorrerão no oócito primário horas antes da ruptura folicular, por ação do pico de hormônio luteinizante (LH). Com a puberdade, inicia-se a seguinte seqüência de eventos: aumento do citoplasma do oócito, migração excêntrica do núcleo e proliferação de várias camadas de células da granulosa através de mitoses. Começa a se formar a zona pelúcida e o oócito

apresenta agora um núcleo bastante proeminente: a vesícula germinal (MOORE, 1990).



p = espaço peri-vitelino
o = ooplasma
g = vesícula germinal

Figura 1 - Oócito em prófase I

Fonte: VEECK,L.L. Na Atlas of human gametes and conceptuses, Parthenon Publishing,1999

Com a multiplicação das células da granulosa, o folículo primordial transforma-se em folículo primário. Esse início do crescimento folicular independe do estímulo pelas gonadotrofinas. Quando ocorre uma elevação nos níveis de hormônio folículo estimulante (FSH), as células foliculares sofrem múltiplas mitoses, formando camadas gradativamente mais espessas de células. As células circunjacentes diferenciam-se em camadas concêntricas designadas como *teca interna* (mais próxima do oócito) e *teca externa* (a parte mais exterior). Está formado o folículo pré-antral.

As células da granulosa têm a capacidade de sintetizar esteróides levando a um aumento na produção de líquido folicular, que se acumula em espaços intercelulares da granulosa chamados corpúsculos de *Call-Exner*. Estes acabam coalescendo e

formando uma cavidade, o antro (descrito por Emma Call e Siegmund Exner *apud* SPEROFF *et al.*, 1995). Microscopicamente as células da granulosa estão maiores e adquiriram inclusões lipídicas enquanto a teca se tornou vacuolada e com rica vascularização (ZELEZNIK *et al.*,1981).

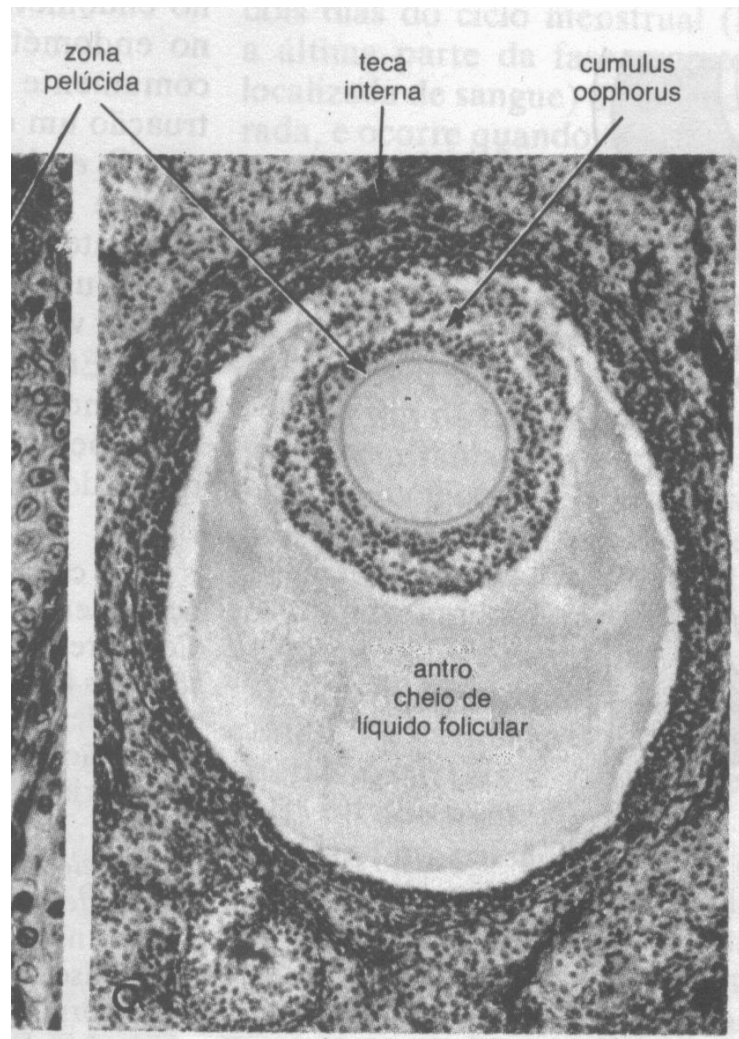
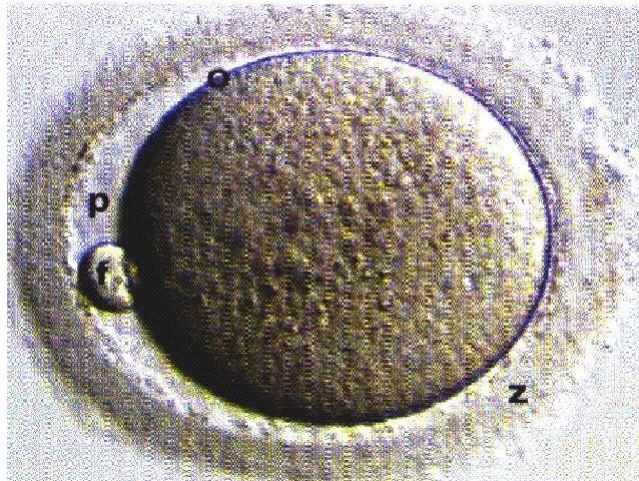


Figura 2 - Folículo Antral
Fonte: LESSON, C.R. *et al*; Text/ Atlas of histology
Philadelphia, W.B. Saunders Co, 1988

Com a esteroidogênese, ocorre um pico na produção de estrogênios que desencadeia a liberação de hormônio luteinizante (LH). O pico de LH inicia a retomada da meiose

no oócito e, com isso, completa-se a primeira divisão meiótica. Porém, a divisão do citoplasma é desigual. O oócito, agora secundário, recebe quase todo o citoplasma, enquanto o primeiro corpúsculo polar recebe muito pouco. O primeiro corpúsculo polar é uma célula pequena, não funcional, que logo se degenera (MOORE, 1990).



p = espaço peri-vitelino
o = ooplasma
z = zona pelúcida
f =primeiro corpúsculo polar

Figura 3 - Oócito em metáfase II

Fonte: VEECK,L.L. Na Atlas of human gametes and conceptuses,
Parthenon Publishing,1999

Na ovulação, o núcleo do oócito secundário começa a segunda divisão meiótica, mas avança apenas até a metáfase, quando a divisão é interrompida.

Uma análise sobre os eventos da maturação, realizada por MOOR *et al.*, em1998, relata que: a indução da maturação oocitária depende da integração de alguns processos essenciais preliminares:

- 1) O oócito deve ter completado seu ciclo de crescimento (já descrito) e armazenado toda a quantidade de ácido ribonucléico (RNA) necessária antes da indução da maturação, porque a transcrição ficará suprimida até o início das clivagens.

2) Estímulos endócrinos e parácrinos devem ter ocorrido em tempo e concentrações apropriados para que todas as mudanças intracelulares necessárias associadas com os componentes nucleares e citoplasmáticos da maturação possam ser induzidas.

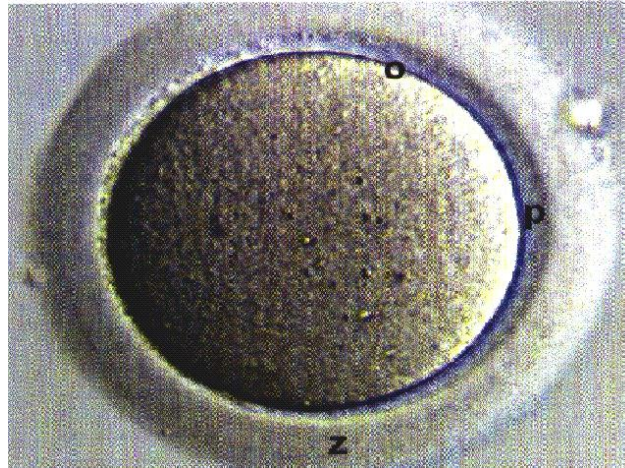
3) A presença de mecanismos apropriados como o surgimento de receptores e transmissão intercelular.

4) Essa reprogramação molecular interna oocitária deve ser capaz de suportar ambos os componentes do processo de maturação (nuclear e citoplasmático).

A maturação nuclear orchestra a meiose do estágio de G2 (segundo intervalo da intérfase do ciclo celular = G1, S, G2) até a metáfase II (MII). A finalização da maturação nuclear (extrusão do corpúsculo polar, alinhamento de cromossomos e estruturação dos fusos meióticos) ou conclusão da meiose é, por si, só insuficiente para permitir ao oócito suportar a fertilização e o subsequente desenvolvimento até o termo. A conquista da completa capacidade de desenvolvimento requer, além do término da meiose, a maturação citoplasmática. Esta inclui a síntese de proteínas específicas, a relocação de organelas citoplasmáticas e alterações no transporte de membrana. Esse programa citoplasmático progride até sua finalização, mesmo se o núcleo for removido, refletindo uma independência do processo meiótico. E, embora os processos de maturação nuclear e citoplasmática possam prosseguir como eventos independentes, a maturação citoplasmática só é realmente concluída quando os dois processos estão firmemente interligados.

A maturação teve início com a quebra ou dissolução (*breakdown*) da vesícula germinal, um evento que resulta na mistura de materiais previamente restritos aos

compartimentos do núcleo e do citoplasma. O *breakdown* da vesícula germinal é seguido pela condensação de cromatina em compactos cromossomos, formação dos fusos meióticos e a continuação da meiose (KARP & BERRILL, 1981).



p = espaço peri-vitelino
o = ooplasma
z = zona pelúcida

Figura 4 - Oócito em metáfase I

Fonte: VEECK, L.L. Na Atlas of human gametes and conceptuses, Parthenon Publishing, 1999

Se um espermatozóide penetra o oócito secundário, a segunda divisão meiótica se completa. Mais uma vez a divisão é desigual. Surge o segundo corpúsculo polar que, assim como o primeiro, também degenera. Assim que o segundo corpúsculo polar é expulso, a maturação do oócito se completa (MOORE, 1990).



Figura 5 - Oócito fertilizado (Presença de dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares)
Fonte: VEECK, L.L. Na Atlas of human gametes and conceptuses, Parthenon Publishing, 1999

A viabilidade da MIV de oócitos humanos depende de uma gama de eventos que devem estar presentes não apenas no momento exato, mas também em níveis e forma exatos (MOOR *et al.*, 1998).

1.3 A maturação oocitária e fertilização *in vitro*

1.3.1 Aspectos históricos

Em 1935, PINCUS & ENZMANN fizeram uma observação fundamental em coelhos. Eles notaram que os oócitos resultantes da liberação folicular entravam no processo de maturação nuclear espontaneamente quando cultivados *in vitro*.

Em 1939, PINCUS & SAUNDERS repetiram esse experimento com óocitos humanos obtidos por aspiração folicular de folículos excisados. Os oócitos foram cultivados em soro humano a 37°C por três a 48 horas. A iniciação do processo de

maturação foi documentada em 40% dos oócitos cultivados. Nenhum dos oócitos, examinados imediatamente após a remoção do folículo, exibiu cromossomos, fusos ou corpúsculos polares. Essas observações abriram o caminho para a recuperação e cultivo dos oócitos para estudos de maturação e fertilização *in vitro* em humanos (MASTROIANI & NORIEGA, 1970). Nesse estudo também se observou a clivagem de um oócito sem a colaboração do espermatozóide (partenogênese). Esse fenômeno foi novamente confirmado em coelhos por CHANG, em 1955, e, posteriormente, por EDWARDS, em 1962 e 1965a. No estudo de EDWARDS em 1965a, a maioria dos oócitos humanos examinados após 43h de cultivo estava em metáfase II, havendo a extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Segundo JAGIELLO *et al.*, em 1968, o processo de maturação *in vitro* poderia ser acelerado se a paciente fosse previamente tratada com gonadotrofinas.

Em 1969, KENNEDY & DONAHUE publicaram sua extensa experiência com o cultivo oocitário e informaram sucesso na cultura de oócitos em meio de cultivo sem a adição de soro. Essas observações sugeriram similaridade em termos de necessidades entre os oócitos de humanos e ratos, sendo a base energética do meio o piruvato.

A primeira experiência de fertilização *in vitro* em humanos foi atribuída a ROCK & MENKIN em 1944 (*apud* MASTROIANI & NORIEGA, 1970 e na introdução deste trabalho). Detalhes da experiência com 138 oócitos expostos a espermatozoides *in vitro*, foram publicados quatro anos mais tarde (MENKIN & ROCK, 1948), onde os oócitos humanos foram pré-cultivados em soro por 22:30 a 27 horas, expostos aos

espermatozóides lavados e centrifugados e cultivados posteriormente em soro. A clivagem foi observada em quatro espécimes. A possibilidade de clivagem partenogenética não pôde ser completamente descartada visto que houve contaminação bacteriana do meio e exposição ao ar ambiente da sala (MASTROIANI & NORIEGA, 1970).

Em 1953 e 1955, SHETTLES relatou sua primeira experiência com o cultivo *in vitro* e inseminação de oócitos foliculares ou obtidos nas tubas uterinas. Nesse experimento ele chamou a atenção para as relações oócito-zona pelúcida e corona radiata.

Em 1965b, EDWARDS relatou a maturação *in vitro* de oócitos humanos e em 1966, com outros colaboradores, tornou pública sua extensa experiência com as técnicas de cultivo *in vitro* para oócitos humanos. Entre 56 oócitos foliculares que foram maturados e expostos a espermatozóides lavados, quatro foram julgados como provavelmente fertilizados. Um de 14 foi julgado como fertilizado após a exposição a espermatozóides previamente incubados em útero de coelhas numa tentativa de promover a capacitação dos espermatozóides. Contudo, as evidências de fertilização não foram suficientemente documentadas, visto que nenhum dos autores evidenciou a presença de cauda de espermatozóide no citoplasma oocitário nem a formação do segundo corpúsculo polar nos oócitos estudados.

Em 1969, EDWARDS *et al.*, publicaram os primeiros estágios da fertilização *in vitro* de oócitos humanos maturados *in vitro*. Nos experimentos realizados, os espermatozóides foram previamente tratados com fluido folicular em uma tentativa

de êxito para a capacitação dos mesmos. Essa técnica havia sido realizada com sucesso por BAVISTER em hamsters no mesmo ano de 1969 (*apud* MASTROIANI & NORIEGA, 1970). No estudo de EDWARDS *et al.*, em 1969, 34 oócitos foliculares foram maturados *in vitro* e inseminados. Dois continham dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares e foram considerados fertilizados. Cinco tinham três ou mais pró-núcleos e outros cinco tinham dois pró-núcleos, mas apenas um corpúsculo polar. Até esse momento a fertilização completa, incluindo singamia e a clivagem subsequente, ainda não havia sido convincentemente descrita em humanos (MASTROIANI & NORIEGA, 1970).

Em 1983, VEECK *et al.* publicaram a primeira gravidez e nascimento de bebê gerado através da maturação *in vitro* de oócitos humanos. Contudo, seu trabalho constituiu-se de pacientes estimuladas normalmente para um ciclo de FIV convencional em que casualmente estavam presentes oócitos imaturos que foram, então, postos em meio para a maturação.

CHA *et al.*, em 1991, realizaram um estudo que se tornou um marco na história da MIV. Através da coleta de 270 oócitos de biópsias ovarianas de 23 pacientes em ciclos não estimulados, foi realizada a maturação *in vitro* e posterior transferência de cinco embriões para uma receptora com endométrio previamente preparado. Houve o nascimento de trigêmeas saudáveis.

O cultivo de oócitos humanos imaturos só se dava em folículos intactos freqüentemente obtidos de tecidos ovarianos removidos em cirurgia (KERIN *et al.*, 1981 e CHA *et al.*, 1991) ou após hiperestímulo ovariano em ciclo de fertilização *in*

vitro convencional como no trabalho de VEECK *et al.*, 1983. Foi só em 1994 que TROUNSON *et al.* mostraram como seria possível coletar oócitos imaturos *in vivo* de maneira guiada por ultra-som ou por via laparoscópica. Eles desenharam uma agulha que foi especialmente desenvolvida pela Cook Australia Ltd para coleta de oócitos imaturos, com comprimento e bisel mais curtos, sendo também mais rígida, evitando movimentos e dobras ao longo da coleta ovular. Os autores relataram que o entupimento da agulha dava-se de forma freqüente devido a tecido e sangue transfixados mais comumente do que em ovários contendo folículos maduros. Com isso, o lúmen da agulha necessitava de múltiplas lavagens com meio de cultivo.

Refinamentos para a tecnologia desenvolvida por TROUNSON *et al.*, 1994 foram realizados por RUSSEL *et al.*, 1997, também de maneira pioneira. Os autores realizaram a coleta em pacientes não estimuladas conseguindo um substancial número de oócitos imaturos.

Após o nascimento das trigêmeas de CHA *et al.*, 1991, vários autores publicaram relatos de gravidezes e nascimentos esporádicos transcorridos após MIV: o próprio TROUNSON *et al.*, 1994; BARNES *et al.*, 1995 (maturação *in vitro* seguida de injeção intracitoplasmática de espermatozóides - ICSI, desenvolvimento até o estágio de blastocisto e *assisted hatching*); NAGY *et al.*, 1996 (MIV em co-cultura com células do cumulus seguida de ICSI); RUSSEL *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 1997; EDIRISINGHE *et al.*, 1997; JAROUDI *et al.*, 1997 (alternativa para paciente que tinha risco elevado de desenvolver síndrome de hiperestímulo ovariano - SHO, e ter seu ciclo cancelado); CHIAN *et al.*, 1999.

Após o surgimento (1992) e rápido aprimoramento da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), a grande maioria dos trabalhos com MIV passou a ser com a utilização de ICSI. Segundo BARNES *et al.*, 1995 o motivo seria eliminar o *zona hardening* (conjunto de alterações que ocorrem na zona pelúcida durante a maturação *in vitro*, que reduzem as taxas de fertilização - descritos por CHOI *et al.*, 1987, *apud* BARNES *et al.*, 1995 - e que seriam impossíveis de identificar no oócito em metáfase II - MII - maturado *in vitro*, segundo o próprio BARNES *et al.*, 1995). Segundo NAGY *et al.*, 1996, as taxas com a utilização de FIV ficavam bem aquém das de ICSI e já para RUSSEL *et al.*, 1997, a questão seria a eliminação de um possível *bias* na presença de um fator masculino.

Até 1998, pouco mais de 10 bebês haviam nascido no mundo, frutos de oócitos maturados *in vitro* e posteriormente fertilizados, revelando as baixíssimas taxas de sucesso (MOOR *et al.*, 1998).

Daí em diante, surgiram trabalhos que objetivaram melhorar os resultados da MIV, tendo sido analisados todos os fatores capazes de interferir no processo.

1.3.2 Fatores que afetam a maturação oocitária *in vitro*

1.3.2.1 Idade

JACOBSON *et al.*, 1970, *apud* CHA, 1995, reportaram um maior número de oócitos recuperados de doadoras de 24 anos de idade ou menos, quando comparadas a doadoras de 40 anos. SHEA *et al.*, em 1975, confirmaram que o número de oócitos recuperados de 145 pacientes ooforectomizadas diminuiu, à medida que a idade das

pacientes se elevava. Entretanto, a taxa de maturação dos oócitos não diminuiu com o aumento na idade das pacientes.

CHA *et al.*, em 1991, revelaram que no estudo realizado, o número de oócitos coletados diminuiu com o avançar da idade, contudo, eles não encontraram maior proporção de oócitos degenerados no grupo de pacientes mais velhas e nem mesmo observaram qualquer defeito morfológico nos oócitos, chamando a atenção para o limitado valor da classificação morfológica oocitária na determinação da qualidade absoluta do oócito, posto que a incidência de defeitos cromossômicos aumenta com a idade materna.

WHITACRE *et al.*, 1998, não encontraram diferença estatisticamente significativa quando observaram a porcentagem de oócitos imaturos que evoluíram até metáfase I (MI) e metáfase II (MII) baseado na idade das pacientes. Já VOLARCIK *et al.*, 1998, deduziram que a competência meiótica de ovários não estimulados diminuiu com o avançar da idade em uma análise de 403 oócitos retirados de 291 pacientes com idade que variou de 18 a 55 anos.

Em 2000, WU *et al.* reportaram os dados de seu trabalho de MIV com 216 oócitos extraídos de pacientes submetidas à cirurgia ovariana divididas em três grupos: 21 a 30anos, 31 a 40 e 41 a 50 anos. Foi observado que as taxas de maturação foram maiores no grupo de pacientes de 21 a 30 anos e a taxa de apoptose foi significativamente superior no grupo de 41 a 50 anos de idade quando comparado aos outros dois grupos.

1.3.2.2 Patologias

Oócitos imaturos recuperados de ovários policísticos mostraram um decréscimo nas taxas de maturação quando comparados a oócitos de ovários normais, devido a degeneração e agregação da cromatina (SANYAL *et al.*, 1976).

Vários autores concordaram que muitos dos oócitos recuperados de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) seriam inábeis para o desenvolvimento e maturação (STANGER & YOVICH, 1985; HOWLES *et al.*, 1986; DOR *et al.*, 1990; MAC DOUGALL *et al.*, 1993 e KODAMA *et al.*, 1995).

TROUNSON *et al.* em 1994, realizaram um trabalho com dois experimentos para avaliar a taxa de recuperação, normalidade e o potencial de maturação *in vitro* dos oócitos recuperados de pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP). No primeiro experimento compararam os oócitos imaturos recuperados de nove pacientes anovulatórias portadoras de SOP com oócitos de 10 pacientes ovulatórias não portadoras de SOP. Encontraram um maior número de oócitos imaturos recuperados de pacientes anovulatórias (média de 15,3 por paciente) comparado às pacientes ovulatórias (média de 2,8 por paciente). Já no segundo experimento, compararam dois grupos de portadoras de SOP: 13 pacientes anovulatórias e 10 não ovulatórias, não encontrando diferenças estaticamente significativas entre os dois grupos quanto à recuperação oocitária, taxa de maturação, fertilização e desenvolvimento. Uma gestação e nascimento de bebê de uma paciente anovulatória foi reportado no segundo experimento. Com isso concluíram que a técnica de MIV deveria constituir um bom tratamento para pacientes portadoras de ovários

policísticos e normais, já que os oócitos dessas pacientes mantêm o potencial de maturação e desenvolvimento, além dessas pacientes serem de risco elevado para a síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO).

Preocupados com o microambiente androgênico proporcionado pelos ovários policísticos, ANDERIESZ & TROUNSON, 1995, avaliaram o efeito da testosterona na maturação *in vitro* de oócitos de roedores e concluíram que esse hormônio reduziu significativamente a capacidade natural de maturação e desenvolvimento embrionário. Nesse mesmo estudo os autores relataram que a presença de células do cumulus durante a maturação apresentava efeito significativamente positivo na maturação oocitária ($P < 0,001$).

Segundo MOOR *et al.*, 1998, a porcentagem de oócitos degenerados em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) é consideravelmente alta (35%), superior às das mulheres normais (20 a 25%, segundo CHA *et al.*, 1991).

CHIAN *et al.* em 1999, relataram duas gravidezes em pacientes com SOP e falha em ciclos de FIV ou inseminação intra-uterina (IIU) prévios submetidas à MIV. Em 2000, o próprio CHIAN mostrou seus resultados de MIV em pacientes portadoras e não portadoras de ovários policísticos: maior número de oócitos coletados em portadoras de ovários policísticos comparado às não portadoras: $12 \pm 7,8$ (média \pm desvio padrão) e $4 \pm 3,5$ ($P < 0,01$), taxas de maturação e fertilização semelhantes (81,8 e 78,4%; e, 85,6 e 81,3%). O autor reportou uma taxa de gravidez de 32% no grupo de portadoras da enfermidade comparado a 17% em não portadoras.

Mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) têm uma menor fecundabilidade por ciclo e maior taxa de abortos, bem como uma resposta imprevisível às gonadotrofinas exógenas usadas em ciclos convencionais de FIV, com um maior risco de síndrome de hiperestímulo ovariano e cancelamento de ciclos (CHA *et al.*, 2000).

BARNES *et al.*, 1996, demonstraram que oócitos imaturos recuperados de mulheres com ciclos regulares apresentaram maior capacidade de desenvolvimento, taxas significativamente maiores de maturação e fertilização e, ainda, clivagem, comparadas a mulheres anovulatórias ou com ciclos irregulares.

Em 2000, SUIKKARI *et al.* realizaram um estudo prospectivo para avaliar o estímulo gonadotrófico com início na fase lútea tardia do ciclo anterior, para coleta de oócitos imaturos e posterior maturação *in vitro* em pacientes ovulatórias e portadoras de SOP, não encontrando diferenças no número de oócitos coletados, taxas de maturação e fertilização entre os dois grupos.

CHA *et al.*, 2000, publicaram os resultados do maior estudo em pacientes com SOP submetidas a maturação *in vitro* e posterior fertilização *in vitro* em ciclos não estimulados, mostrando as melhores taxas de sucesso até o momento (27,1% de gravidez por transferência). Contudo, os próprios autores informaram serem essas taxas inferiores às de outras causas de infertilidade.

1.3.2.3 Ciclo menstrual

Segundo SHEA *et al.*, 1975, o número de oócitos obtidos por ovário foi maior quando os mesmos foram retirados em fase proliferativa, embora tenham observado que os oócitos recuperados em fase secretora mantinham a mesma capacidade de maturação *in vitro*.

KERIN *et al.*, em 1981 mostraram que um aumento no tamanho dos folículos com o avanço da fase folicular tornava as punções mais fáceis. Contudo, CHA *et al.*, 1991, não encontraram diferença no número de oócitos coletados de acordo com a fase do ciclo.

WHITACRE *et al.*, 1998, encontraram diferença estatisticamente significativa na porcentagem de oócitos que evoluíram para MI entre as duas fase do ciclo. Oócitos coletados durante a fase folicular atingiram o estágio de MI em porcentagem significativamente maior do que os oócitos coletados durante a fase lútea. Entretanto, não foi observado diferença nas porcentagens de oócitos que atingiram o estágio de MII entre os dois grupos.

1.3.2.4 Ciclos naturais

RUSSEL *et al.* em 1997 publicaram o nascimento de um bebê, de uma casuística de 14 ciclos não estimulados submetidos à coleta ovular precoce e maturação oocitária *in vitro*. Em 1998, THORNTON *et al.* realizaram uma análise retrospectiva de 123 ciclos naturais em mulheres abaixo de 40 anos, sem fator masculino. Essas pacientes fizeram uso prévio de 10000UI de hCG 34 a 36 horas antes da coleta, sem utilização

prévia de gonadotrofina. Foram analisados 101 oócitos coletados imaturos (média de 0,7 por paciente) que foram maturados *in vitro* e fertilizados. Um embrião foi transferido, levando à nascimento. Nove embriões foram criopreservados, seis transferidos após descongelamento, levando a nascimento.

Em 1999, CHIAN *et al.* publicaram o acontecimento de duas gravidezes em portadoras de síndrome dos ovários policísticos, geradas através de maturação *in vitro* de oócitos em que foi utilizada uma dose de 10000UI de hCG 36 horas antes da coleta ovular. Segundo eles, o uso do hCG prévio encurtaria o tempo de maturação *in vitro* e melhoraria a competência de desenvolvimento e as taxas de gravidez.

Também em 1999, COBO *et al.* realizaram um estudo apenas com ciclos não estimulados para avaliar o melhor dia para a coleta ovular de oócitos imaturos. Dezenove ciclos de 16 pacientes ovodadoras com idade entre 23 a 32 anos foram realizados. Os ciclos foram randomizados em dois grupos: 1) coleta antes do folículo dominante atingir 10mm; e 2) coleta quando o folículo dominante já estivesse selecionado, medindo 10mm. Foi encontrado um número significativamente maior ($P<0,05$) de oócitos aspirados no grupo 1 (70,8%) comparado ao grupo 2 (50,5%), além de uma maior tendência dos oócitos fertilizados evoluírem até blastocistos no grupo 1; sugerindo que a coleta de oócitos imaturos deva ser realizada antes da seleção folicular.

Em 2000 CHILD *et al.* apresentaram uma avaliação da técnica de maturação *in vitro* de oócitos humanos, em ciclos naturais, em pacientes que se apresentaram como *poor responders* em ciclo de FIV prévio, e deduziram que a técnica seria uma boa

alternativa para essas pacientes na medida em que trazia resultados similares aos da FIV sem suas conseqüências.

Em 2000b, MIKKELSEN *et al.* revelaram os resultados de dois experimentos de MIV em pacientes não estimuladas: taxas de 14 e 17,4% de gravidez por transferência.

1.3.2.5 Ciclos estimulados

VEECK *et al.* em 1983, registraram o primeiro nascimento de um bebê saudável (1982), fruto de maturação *in vitro* de oócitos capturados por via laparoscópica em 44 ciclos de FIV estimulados (sem mencionar as doses) com gonadotrofinas da mulher menopausada (HMG), acrescidos ou não de hormônio folículo estimulante purificado (FSH purificado), e uso rotineiro de gonadotrofina coriônica (hCG) na dose de 10000UI. Até hoje é realizado esse tipo de trabalho no qual se têm oócitos imaturos em coletas de ciclos convencionais de FIV colocados em meio para maturação. Em 2000, KIM *et al.* publicaram um estudo com metodologia idêntica à de VEECK *et al.*, 1983, confirmando a aplicabilidade da técnica.

Em humanos e primatas observou-se que as taxas de maturação nuclear espontânea aumentaram dramaticamente quando os oócitos eram extraídos de ovários estimulados (GOMEZ *et al.*, 1993, e SCHRAMM & BAVISTER, 1995), o que poderia indicar que os oócitos adquirem a competência de desenvolvimento relativamente tarde no processo de crescimento.

Em 1995, SCHRAMM & BAVISTER, através de um estudo randomizado, compararam as taxas de maturação *in vitro* de oócitos cultivados em co-cultura com células da granulosa de macacas *rhesus* previamente estimuladas com FSH e células de macacas não estimuladas e verificaram que o estímulo hormonal aumentou a porcentagem de oócitos que se desenvolveram até o estágio de mórula, 23% comparado a 11% dos controles ($P \leq 0,01$).

MOOR *et al.*, 1998, em uma análise descritiva sobre a maturação oocitária, informaram que a administração inapropriada de gonadotrofinas exógenas pode afetar a seqüência normal de eventos durante a maturação.

TROUNSON *et al.* também em uma análise descritiva de 1998, informaram não ter observado diferença de resultados com o uso de FSH prévio.

WYNN *et al.* em 1998, investigaram de forma randomizada e controlada o efeito do FSH prévio (600UI ao longo de cinco dias com início de 300UI no segundo dia do ciclo) na MIV de oócitos humanos em 17 pacientes saudáveis que doaram oócitos para pesquisa. E concluíram que o grupo que recebeu tratamento desenvolveu um número significativamente maior de folículos, teve mais oócitos coletados, menos oócitos degenerados e, ainda, maior número de oócitos que completaram a maturação até metáfase II (MII). Segundo os autores, o estudo promoveu a primeira evidência de que uma leve estimulação com FSH prévio seria desejável para otimizar os esquemas de MIV.

Em 1999, MIKKELSEN *et al.* realizaram um estudo prospectivo e randomizado avaliando se o potencial de desenvolvimento dos oócitos maturados *in vitro* seria

melhorado pelo uso prévio de FSH, concluindo que o uso de gonadotrofina prévia não aumentou o número de oócitos coletados e também não contribuiu para melhorar as taxas de maturação, clivagem ou desenvolvimento embrionário. Esse foi o trabalho com melhores taxas de gravidez com MIV até o momento (25% gravidez por transferência - e 15% de implantação).

1.3.2.6 Meios de cultivo - Substâncias adicionadas

Em um grande número de espécies, a maturação *in vitro* de oócitos é profundamente afetada pelas condições de cultivo (WIEMER *et al.*, 1991). É dito que um sistema de cultivo ideal para a MIV deveria prover os substratos necessários para a maturação oocitária nos momentos exatos, como ocorre no folículo pré-ovulatório *in vivo* (MOOR, *et al.*, 1998).

Diferenças nos meios de cultivo e suplementos, como componentes protéicos, substratos energéticos e nutrientes podem influenciar a meiose oocitária e a competência citoplasmática (ZHENG *et al.*, 2001).

TROUNSON *et al.* em 1998, através de uma análise descritiva, mostraram bons resultados de maturação com o uso de TCM 199 (Sigma) + soro bovino, gonadotrofinas e piruvato, comparados aos resultados de EMEM (BARNES *et al.*, 1996) e meio de CHANG (*Irvine Scientific*®). Este último comercialmente usado para o cultivo de aminoácidos humanos não apresenta em sua composição a adição de gonadotrofinas. Ainda nessa análise descritiva, os autores citaram um outro meio de maturação oocitária, (HOM), que, após a adição de cisteína, cistamina, aminoácidos e

vitaminas, além de FSH recombinante, hCG e fator de crescimento epidérmico (FCE), não mostrou benefícios quando comparado ao meio de CHANG.

a) Hormônios

SHEA *et al.* em 1975, relataram que após estudos com sapos teria sido postulado que a progesterona transferida pelas células da granulosa estimularia a maturação. Segundo eles, as baixas taxas de maturação em oócitos humanos deveria resultar de produção insuficiente de progesterona pelas células foliculares. Entretanto, nessa mesma publicação, através de um estudo prospectivo e randomizado, comparando oócitos maturados com e sem progesterona adicionada ao meio, concluíram que a adição de progesterona não trazia efeito significativo à maturação, mas contribuía para maior labilidade da célula. A quebra da membrana com perda de ooplasma ocorreu mais freqüentemente em oócitos incubados com progesterona. Nenhum dano histológico sobre a membrana foi identificado, apenas alterações bioquímicas.

Alguns estudos mostraram que oócitos extraídos de folículos em estágios não muito precoces de desenvolvimento atingiram a maturação nuclear e citoplasmática com o uso exclusivo de gonadotrofinas (PRINS *et al.*, 1987; ZHANG *et al.*, 1993; e TROUNSON *et al.*, 1994).

TROUNSON *et al.* em 1994, não encontraram diferença nas taxas de maturação em meios de cultivo com e sem a adição de hCG. Contudo, 81% dos oócitos maturaram até MII com 43 a 54 horas de cultivo em meio com a adição de gonadotrofinas, estrogênio e soro bovino.

Em uma análise descritiva realizada por TROUNSON *et al.* em 1998, há o relato de uma experiência realizada pelo próprio TROUNSON *et al.* em 1996, que compararam a MIV em uso de TCM 199 (Sigma) e gonadotrofinas com o uso de meio de CHANG (*Irvine Scientific*®) que não contém gonadotrofinas em sua composição, encontrando taxas de maturação bastante similares (65 e 62% respectivamente). Segundo os autores esses resultados sugeriram que as gonadotrofinas não regem a maturação oocitária como ocorre *in vivo*. Apenas há a ressalva de que a composição dos meios difere-se bastante: meio de CHANG contém soro bovino fetal e glutamina, além de outros componentes inexistentes no TCM199.

Também em 1998, COOPER *et al.* publicaram que a presença de FSH / LH no meio de cultivo parecia promover o gatilho para a expansão das células do cumulus ao redor do oócito quando as mesmas estavam presentes.

Em 1998, CORTVRINDT *et al.* em um estudo prospectivo, randomizado, controlado, avaliaram os efeitos do FSH e várias doses de LH na maturação nuclear e capacidade de retomar a meiose em oócitos de folículos pré-antrais de ratas pré-púberes e concluíram que o estímulo hormonal foi essencial para a finalização da meiose.

Em 2000, ANDERIESZ *et al.* concluíram que a adição de FSH recombinante e LH recombinante em uma proporção de 1:10 (1UI/ml :10UI/ml) ao meio de cultivo não aumentava significativamente o número de oócitos humanos que atingiam o estágio de MII, mas incrementava significativamente as taxas de maturação citoplasmática.

b) Extratos protéicos, fatores de crescimento ou substâncias afins e modelos de cultivo

b.1) Extratos protéicos

Estudos com roedores mostraram que a maturação de oócitos *in vitro* em meios sem a adição de componente protéico (*serum-free*) resultava em endurecimento da zona pelúcida levando a falhas nas fertilizações (DOWNS *et al.*, 1986 e KITO & BAVISTER, 1996).

Um estudo chave em 1990 fez com que o interesse na maturação *in vitro* de oócitos humanos tomasse grande impulso. CHA *et al.*, 1991, compararam a adição de fluido folicular (devido à STONE *et al.* em 1998, terem concluído que o fluido folicular que sofrera o pico de LH continha níveis adequados de gonadotrofinas e esteróides) ou soro de cordão às taxas de maturação, encontrando resultados muito superiores nos oócitos maturados com a adição de fluido folicular.

SERTA *et al.* em 1995, compararam o cultivo de oócitos de roedores em Ham's F-10 (CHA *et al.*, 1991) com e sem a adição de albumina sérica bovina e concluíram que a suplementação protéica não melhorou as taxas de maturação e fertilização.

Foi avaliado por QUERO *et al.*, 1995, o efeito do fluido amniótico bovino na MIV de oócitos bovinos, tendo sido concluído que essa suplementação promovia importantes níveis de proteínas e fatores de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento nuclear e citoplasmático.

DELL AQUILA *et al.* em 1997, estudaram o efeito da adição de fluido folicular ao meio TCM 199 (Sigma) na maturação, fertilização e desenvolvimento de oócitos eqüinos, influenciados por CHA *et al.* em 1991. Contudo, os autores observaram que o fluido folicular não aumentou a porcentagem de oócitos que evoluíram até MII comparados aos controles.

Em 1998, RUTHERFORD, em seu comunicado, relatou que quando soros eram adicionados a meios de cultivo para que houvesse uma complexa mistura de hormônios, nutrientes, fatores de crescimento e adesão, todos necessários para promover a proliferação celular, eles também apresentavam efeitos inibitórios em algumas funções das células da granulosa. Segundo ele, em presença de soros, as células luteinizavam-se espontaneamente, perdendo a capacidade de converter androgênios e estrogênios. Com isso, o autor preconizou o uso de sistemas sem a adição de soros (meios *serum free*). Para aperfeiçoar esse sistema, RUTHERFORD (1998) usou uma combinação de insulina e análogo sintético LongR3 IGF para humanos em concentrações baseadas nos níveis de insulina no fluido folicular e fator de crescimento insulina símile - I (IGF-I) medidos em folículos antrais humanos, como reportado por SEIFER *et al.*, 1995, e HOMBERG *et al.*, 1996. GIUDICE *et al.*, 1996, e LIGHTEN *et al.*, 1998, reforçaram o efeito benéfico do uso rotineiro do IGF-I para o desenvolvimento embrionário.

Para SMITZ & CORTVRINDT em 1999, a presença do soro adicionado ao meio de cultivo levaria a uma diferenciação final das células da granulosa fazendo com que as mesmas perdessem a capacidade de secretar estrogênios, de acordo com as conclusões de RUTHERFORD, 1998. ZHENG *et al.* em 2001, realizaram um estudo

para maturação *in vitro* de oócitos de primatas comparando quatro meios de maturação, concluindo que oócitos de primatas poderiam ser maturados com sucesso em meios de cultivo sem a adição de componente protéico. Nesse mesmo trabalho, os autores informaram que, ao contrário dos roedores, em primatas não ocorreu o *zona hardening* (alterações estruturais na zona pelúcida que levam a baixas taxas de fertilização) nos meios *serum-free*, observado pelas taxas de fertilização inalteradas, respectivamente, 86 e 83%, nos meios sem a adição de componente protéico, comparado a 84 e 90% nos meios com a adição do componente protéico.

b.2) Fatores de crescimento ou substâncias afins

Fatores de crescimento são potencialmente importantes na regulação da maturação oocitária (DAS *et al.*, 1991).

Em um estudo com maturação oocitária de oócitos de bovinos em 1995, LIU & FOOTE observaram que a adição de aminoácidos não essenciais em concentração de 1, 0mM + aminoácidos não essenciais em uma concentração de 0, 5mM a um meio de cultivo sem a adição de proteínas promoveram um maior número de blastocistos em embriões previamente maturados *in vitro*.

LEVÉSQUE & SIRARD, em 1995, avaliando o efeito de vários fatores de crescimento na MIV de oócitos de bovinos, informaram que o fator de crescimento epidérmico (FCE) acelerou a maturação nuclear após nove horas de cultivo.

ALAK *et al.*, em 1996, resumiram um, de uma série de muitos estudos, que objetivava a compreensão dos mecanismos da maturação oocitária *in vitro* e sua

regulação em um modelo primata (macaca *rhesus*). Esses estudos demonstraram pela primeira vez que a inibina e a ativina eram efetivos estimuladores da maturação oocitária em primatas, produzindo oócitos amadurecidos *in vitro* que fertilizavam com alta eficácia. Além disso, concluíram, também, que a inibina e a ativina não se antagonizavam nesse processo. Os experimentos foram conduzidos em meios *serum-free* para que fosse eliminado qualquer *bias* relacionado aos fatores séricos (*serum-bound*).

Novamente ALAK *et al.*, em 1998, através de um estudo prospectivo, randomizado, caso-controle, com mulheres ooforectomizadas por causas não ovarianas, concluíram pela primeira vez que a ativina A tinha um potente efeito estimulador na maturação *in vitro* de oócitos humanos (56% comparado à 35% dos controles) em acordo com os achados prévios em primatas.

Ainda em 1998, vários autores (SMITZ *et al.*, MERRIMAN *et al.*, GOUD *et al.*), interessaram-se em avaliar se o fator de crescimento epidérmico (FCE) mostrava algum efeito estimulador na MIV, tendo sido todos unânimes em relatar que a substância contribuía de maneira positiva aumentando as taxas de maturação nuclear e citoplasmática, sobretudo se associado a hormônios como hCG (SMITZ *et al.*, 1998) e FSH (MERRIMAN *et al.*, 1998).

Em 2000, GRØNDAHL *et al.* estudaram o papel do esterol ativador da meiose (presente no fluido folicular do microambiente oocitário, postulado como ativador da meiose em roedores) na MIV de humanos e observaram uma influência absolutamente positiva na maturação nuclear (67% comparado a 29% do grupo

controle). Em pesquisa similar, CAVILLA *et al.*, em 2001, também avaliaram os efeitos do esterol ativador de meiose na maturação *in vitro* e fertilização de oócitos humanos expostos ou não ao esterol ativador de meiose oriundos de ovários estimulados e não estimulados. Os oócitos de ovários não estimulados foram extraídos de pacientes com SOP submetidas a cirurgias ginecológicas e os oócitos de ovários estimulados foram extraídos de ciclos habituais de ICSI, coletados de pacientes normalmente estimuladas para os ciclos. Os resultados encontrados foram: 1) a presença do esterol ativador de meiose (EAM) aumentou significativamente a sobrevivência dos oócitos de pacientes portadoras de SOP, mas não afetou significativamente a porcentagem de oócitos que completaram a maturação. 2) No grupo dos oócitos extraídos de ciclos de ICSI (previamente estimulados), a taxa de sobrevivência oocitária foi a mesma em ambos os grupos de cultivo (com e sem o esterol ativador de meiose), contudo, no grupo em que houve a adição do EAM ao meio de cultivo, a proporção de oócitos que maturaram *in vitro* aumentou significativamente ($P < 0,05$).

b.3) Modelos de cultivo

Em 1995, JANSSENSWILLEN *et al.* realizaram um trabalho comparando as taxas de MIV de oócitos humanos quando se usou meio B2 Ménézo e o mesmo meio associado à co-cultura de células Vero (células de macacos verdes africanos que são utilizadas em estudos de replicação viral e produção de vacinas, além de terem sido apontadas por WIEMER *et al.*, em 1989, como de efeito benéfico no crescimento de embriões humanos). Os dados obtidos após 30 horas de cultivo foram: 82, 4% de

oócitos em estágio de MII no grupo da co-cultura com células Vero, comparados a apenas 37% do grupo cultivado em meio B2 Ménézo exclusivamente ($P < 0,001$).

Alguns autores como CORTVRINDT *et al.*, 1996, e WYNN *et al.*, 1998, preconizaram o cultivo em microgota sob óleo mineral.

WU *et al.*, 1998, narraram a avaliação do desenvolvimento de folículos pré-antrais humanos em Ham's F10 + 15% de soro de cordão, que após 28 dias de cultura foram cultivados com suplementos (gonadotrofinas da mulher menopausada, fluido folicular e FCE) para maturação oocitária final. De um total de 260 folículos, 44 (25%) maturaram até MII mostrando que o desenvolvimento de folículos pré-antrais obtidos de ciclos de FIV convencionais até folículos antrais com extrusão oocitária e maturação *in vitro* pode funcionar como uma nova fonte de oócitos.

Em 1999, MIKKELSEN *et al.* inferiram que as taxas de maturação foram melhoradas quando a MIV durou 36 horas comparados ao cultivo por 48 horas.

SMITH *et al.*, 2000, compararam, então, os efeitos de 28 ou 36 horas de cultivo na MIV de 191 oócitos humanos randomizados em dois grupos. As taxas de gravidez por coleta encontradas foram de 14 e 15%, respectivamente, para 29 e 26, levando os autores a concluir que encurtar o período de cultivo não altera o desenvolvimento embrionário subsequente.

1.3.2.7 Fatores preditivos de sucesso

As concentrações basais hormonais no terceiro dia de um ciclo natural têm sido aceitas como bons marcadores para performance reprodutiva (SCOTT *et al.*, 1989, e SEIFER *et al.*, 1997).

Em 2000a, MIKKELSEN *et al.* investigaram se os resultados de MIV de oócitos de pacientes não estimuladas traziam correlação com os valores séricos de estradiol e inibina A medidos no dia terceiro do ciclo e no dia da coleta ovular, percebendo que significativamente mais gestações foram observadas no grupo de pacientes que apresentaram incremento nos níveis de estradiol e inibina A.

Os próprios MIKKELSEN *et al.*, 2001, publicaram a análise retrospectiva de 132 ciclos de pacientes ovulatórias que realizaram MIV com ciclos naturais, informando que o FSH dosado no terceiro dia do ciclo manteve correlação negativa com o número de oócitos captados. Não houve correlação entre os níveis basais de estradiol, inibina A e inibina B e o número de oócitos captados. Contudo, pacientes com menores níveis de estradiol no terceiro dia do ciclo apresentaram taxas de gravidez significativamente superiores quando comparadas às pacientes com níveis altos, de acordo com os dados já encontrados por LICCIARDI *et al.*, 1995, e EVERS *et al.*, 1998. Essas pacientes com baixos níveis de estradiol foram subdivididas em dois grupos com baixos e altos níveis de inibina A. O grupo com baixos níveis de inibina A apresentou taxas de gravidez significativamente maiores quando comparadas às pacientes com níveis mais altos.

1.3.2.8 Perspectivas futuras

CHA *et al.*, em 1991, assim como OKTAY *et al.*, 1998, afirmam que a MIV permitirá que futuramente bancos de tecidos ovarianos funcionem como bancos de sêmen devido ao aumento no número de oócitos que se tornarão disponíveis com a técnica, além de proporcionar maiores linhas de pesquisa e melhor esclarecimento da fisiologia da maturação oocitária.

A maturação *in vitro* de oócitos humanos tem aberto debates na Inglaterra sobre a possibilidade de uso de tecido ovariano de decessos fetais femininos. Os questionamentos tramitam em um documento de consulta divulgado pelo *Human Fertilization and Embryology Authority* (HFEA) e opiniões têm sido solicitadas sobre quando essas fontes poderão ser aceitas para tratamento e/ou pesquisa envolvendo a criação de embriões (HARTSHORNE, *et al.*, 1994)

Outra possível aplicação da MIV é a sua relação com a criopreservação (COBO *et al.*, 1999). É sabido que o congelamento de oócitos em metáfase II habitualmente causa danos em seu material genético. Oócitos em prófase I (estágio de vesícula germinal) têm seu DNA protegido pela membrana nuclear e estudos em animais têm mostrado um efeito protetor das células do cumulus circundantes (PELLICER *et al.*, 1988). O congelamento de oócitos imaturos pode vir a ser uma excelente alternativa para pacientes que desejam postergar suas vidas reprodutivas, portadoras de neoplasias que se submeterão à quimio ou à radioterapia ou para criação de melhores bancos de ovodoação (COBO *et al.*, 1999). Existem alguns trabalhos sobre a criopreservação de oócitos humanos imaturos seguidos de maturação *in vitro* (TOTH

et al., 1994; SON *et al.*, 1996) e seguido de FIV com nascimento de um bebê (TUCKER *et al.*, 1998).

1.3.2.9 Possíveis complicações da maturação *in vitro*

Em 1981, GOLBUS, estudando ratos, relatou que quando foi realizada maturação oocitária *in vitro* não houve aumento em aneuploidias.

Em 1992, RACOWSKY & KAUFMAN chamaram a atenção para as aberrações meióticas e COOPER *et al.*, 1998, em um estudo com oócitos de ratas pré-púberes, reportaram que 71 a 89% dos oócitos maturados *in vitro* apresentaram fusos mitóticos normais comparados com 87% que maturaram *in vivo*.

VAN BLERKON & DAVIS em 2001, mostraram que oócitos de ratos, quando recuperados após ciclos de hiperestímulo ovariano seguidos, apresentaram significativo aumento na frequência de anormalidades dos fusos mitóticos. Em contraste, quando se avaliaram oócitos maturados *in vitro* dos mesmos ovários, não houve evidência de anormalidades.

2 OBJETIVOS

Coletar óocitos humanos imaturos de folículos em estágio antral, possibilitar sua maturação até o estágio de metáfase II em meio de cultivo, fertilizar os óocitos então amadurecidos e transferir os embriões almejando a gravidez.

3 PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo, não randomizado, descritivo, em que foram avaliados 20 ciclos em 15 pacientes oriundas do Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do PAM Sagrada Família.

Os ciclos foram realizados de novembro de 1999 até março de 2001 em três épocas distintas devido à dificuldade com importação dos meios de cultivo: cinco ciclos em novembro de 1999, seis ciclos em março e abril de 2000 e nove ciclos em março de 2001.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo colegiado do curso de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia.

3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas pacientes que se apresentassem com:

- 18 e até 32 anos de idade incompletos.
- Obstrução tubária como causa exclusiva de infertilidade.
- Indicação para FIV.
- Ausência de condições financeiras para arcar com os custos dos medicamentos necessários para a realização de um ciclo de FIV convencional.
- Presença de ciclos menstruais regulares.

- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido contendo todas as informações sobre os objetivos da pesquisa, bem como os riscos e benefícios aos quais as pacientes estariam expostas.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas todas as pacientes que apresentassem:

- Qualquer outra causa de infertilidade que não a obstrução tubária.
- Índice de massa corporal (IMC) superior 25Kg/m².
- Análise seminal do parceiro alterada (segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde - OMS, 1994).
- Dosagem do FSH no terceiro dia do ciclo inferior a 15UI/ml.
- Presença de qualquer patologia intracavitária (intra-uterina) diagnosticada por histeroscopia diagnóstica.
- Presença de qualquer patologia concomitante que contra-indicasse a gestação ou levasse a uma gestação de risco.

TABELA 1

Caracterização das pacientes

Identificação	Idade	IMC	Infertilidade	Duração	Paridade
1-E.S.S.	29	25	secundária	6 anos	G3P3A0
2- M.R.R.C.	23	20,6	primária	2 anos	G0P0A0
3-G.F.O.P.	31	24,5	primária	3 anos	G0P0A0
4- S.M.M.	28	22,2	secundária	1 ano e 6m	G3P3A0
5- M.A.S.S.	29	24,7	secundária	4 anos	G4P3A1
6- D.R.M.	28	25	secundária	3 anos	G2P2A0
7- M.A.P.J.	31	25	secundária	9 anos	G1P0A1
8- M.B.P.	27	23,3	primária	8 anos	G0P0A0
9-R.A T.N.	28	23	secundária	9 anos	G2P2A0
10-E.D.	28	23	secundária	6 anos	G1P0A1
11-S.A.B.O	22	22,2	primária	5 anos	G0P0A0
12- C.A.S.	29	21,6	secundária	10 anos	G1P0A1
13-C.N.OR.	26	23	primária	2 anos	G0P0A0
14- C.N.S.	29	25	secundária	9 anos	G3P3A0
15- E.L.S.	24	21,7	secundária	3 anos	G2P2A0

A idade média foi de $27,5 \pm 2,7$.

A média do índice de massa corporal foi de $23,2 \pm 1,5$.

A duração média de infertilidade foi de $5,4 \text{ anos} \pm 3,0$.

3.3 Métodos

3.3.1 Estímulo ovariano

As pacientes fizeram uso de 300UI de FSH recombinante (Gonal-F® Serono) intramuscular, no segundo dia do ciclo (sendo o primeiro dia do ciclo definido como o primeiro dia de sangramento) e doses adicionais de 150UI no quarto e no sexto dia do ciclo.

As pacientes foram submetidas a duas ultra-sonografias transvaginais com sonda de 5Mhz (Aloka SSD-500). A primeira no segundo dia do ciclo, para que se excluísse a presença de algum cisto ovariano. E a segunda no sexto dia do ciclo para que se acompanhasse o desenvolvimento folicular (diâmetro folicular calculado como uma média do maior eixo folicular e do eixo perpendicular a este, tomados em um mesmo plano) e desenvolvimento endometrial.

A coleta ovular dava-se invariavelmente no sétimo dia do ciclo.

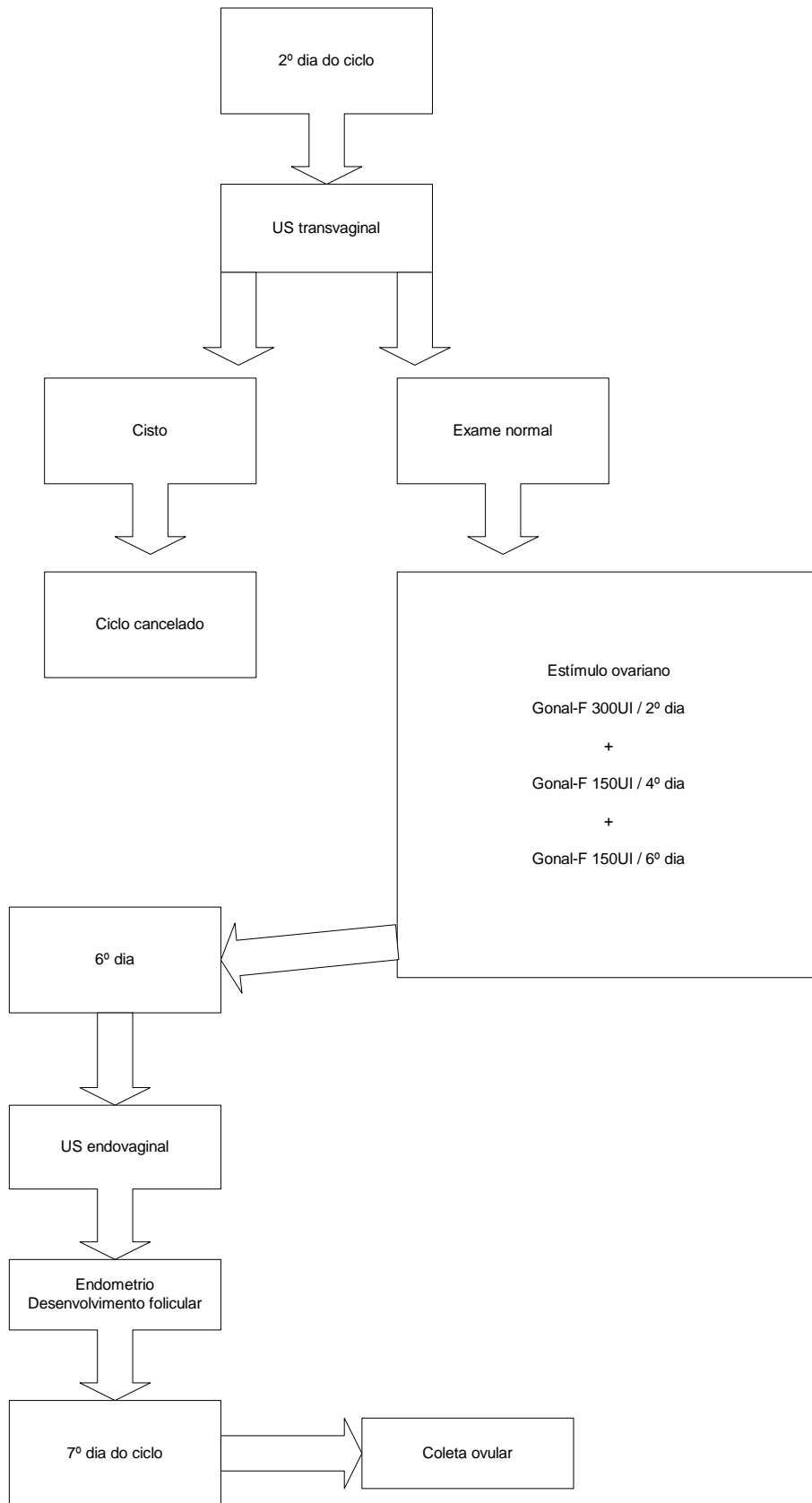


Figura 1 - Fluxograma do tratamento das pacientes

3.3.2 Parte Clínica - A coleta ovular

Para a coleta ovular, as pacientes compareceram ao Laboratório de Reprodução Humana em jejum e fizeram uso de um comprimido de midazolam de 15mg (Dormonid ®) 30 minutos antes do procedimento. A vagina foi lavada com água bidestilada (estéril) abundante e a paciente submetida à anestesia paracervical com xilocaína a 2% com adrenalina, aproximadamente 7ml de cada lado.

As coletas foram realizadas pela autora com agulhas de calibre 16 lúmen duplo (COOK), guiadas por ultra-som endovaginal (Aloka SSD-500). Essas agulhas foram lavadas previamente com meio de cultivo heparinizado (Dulbecco's -Dulbecco's phosphate buffered saline - 9,6g/l -Sigma crescido de 0,003g de heparina -50000UI-Sigma + 0,075g de penicilina -G - Sigma + 1ml de gentamicina - Sigma) a 37°C, pH entre $7,3 \pm 0,3$ e osmolaridade entre 288 ± 5 mOsm/l para diminuição do espaço morto e aquecimento da mesma .

As agulhas foram acopladas à máquina de pressão negativa (*Craft Suction Unit - Rocket medical*), com a pressão de aspiração permanendo fixa em 80mmHg. Após a aspiração do líquido folicular, o folículo foi lavado com 0,1ml do mesmo meio já descrito e novamente aspirado. Assim, sucessivamente, folículo por folículo.

3.3.3 Parte Laboratorial - Identificação dos oócitos

Desta etapa em diante até a preparação do embrião em cateter para transferência embrionária, os procedimentos foram todos realizados sempre pela mesma pessoa: a bióloga do setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas, Maria das Graças

Rocha de Santana Camargos. Todas essas etapas realizadas dentro do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas.

Após a retirada do líquido folicular, ele foi transferido para placas de petri (*culture dishes* 100mm x 20mm *Corning*), para identificação dos complexos cumulus - oócito em lupa (Nikon SMZ-2T) e reavaliados em microscópio óptico invertido (Zeis – Telaval 31).

Os oócitos foram classificados como imaturos segundo os seguintes critérios de VEECK *et al.*, 1983:

- Células da granulosa: compactas e firmemente aderidas
- Cumulus: geralmente ausente, ocasionalmente presente e denso
- Corona: compacta, ocasionalmente ausente
- Ooplasma: geralmente escurecido e com presença de vesícula germinal

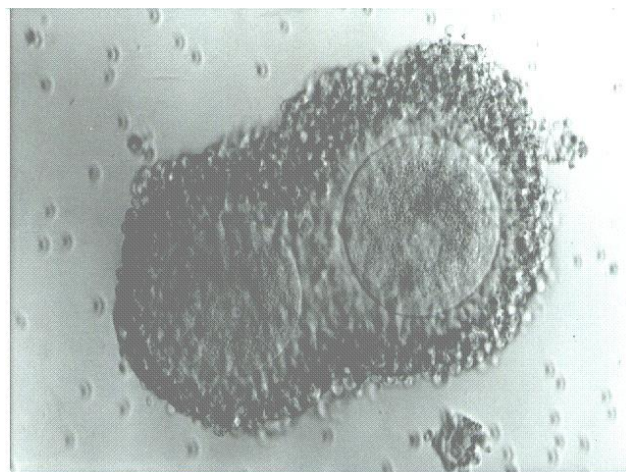


Figura 2 - Oócito Imaturo

Ocorrida a identificação do oócito imaturo, ele foi transferido para as placas de Nunc (*Multidish 4wells- Nunc Brand Products*), um a dois por poço, com 6ml de meio de maturação específico divididos em 1ml para cada poço e 2ml no meio da placa.

As placas foram preparadas sempre com um dia de antecedência, acrescentando-se ao meio de maturação (posteriormente descrito) soro (*Serum Substitute Supplement - Irvine Scientific®*) em uma concentração final na placa de 4% (0,4ml de soro + 9,6ml do meio). As placas foram então transferidas para estufas de CO₂ (*Forma Scientific CO₂ Water Jacket Incubator*) à temperatura de 37°C e fluxo de CO₂ 5% para equilibrar a temperatura e o pH.

3.3.4 O meio de maturação

O meio de maturação foi constituído de 100ml de TCM 199 (Sigma) acrescido de piruvato (Sigma) 0,1ml; penicilina G (Sigma) 0,006g ; gentamicina (Sigma) 0,1ml; FSH recombinante (Gonal-F® Serono) 0,075UI/ml; hCG (Profasi®Serono) 0,5UI/ml. O pH do meio oscilava entre $7,3 \pm 0,3$ (medido por medidor de pH Digimed, modelo DMPH-2) e a osmolaridade oscilava entre 288 ± 5 mOsm/l (medido por Osmeet - *Micro Osmometer*).

Os oócitos imaturos permaneceram incubados no meio, nas placas de Nunc por um período de 48 horas, após o que, os mesmos foram observados e graduados como:

- Prófase I (ausência de maturação)

- Metáfase I -MI

- Metáfase II -MII

- Degenerados

Os oócitos em MII foram então transferidos para outras placas de Nunc com 6ml de meio apenas para cultivo (IVF TM20 Vitrolife) distribuídos da mesma forma que o meio de maturação: 1ml por poço e 2ml no centro da placa. Essas placas também foram preparadas com um dia de antecedência para estabilização prévia (da temperatura e pH) em estufas de CO₂ (*Forma Scientific- Water Jacket Incubator*) com fluxo de CO₂ a 5% e 37° C.

3.3.5 A inseminação

Os oócitos (em MII) transferidos para as novas placas foram submetidos à inseminação. O preparo do sêmen foi sempre realizado pela técnica de *swim-up*:

- Em um tubo de 15ml *round bottom tube* (Falcon-Corning) estéril, deposita-se o sêmen e a este acrescenta-se o dobro do volume de Dulbecco's (já descrito) e homogeneiza-se.

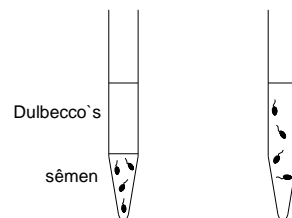


Figura 1 - Sêmen + Dulbecco's e homogeneizados

- Centrifuga-se a 300g (força centrífuga relativa), Excelsa Baby I®, por 10 minutos.
- Descarta-se o sobrenadante e torna-se a suspender o *pellet* com mais 2 ml de Dulbecco's

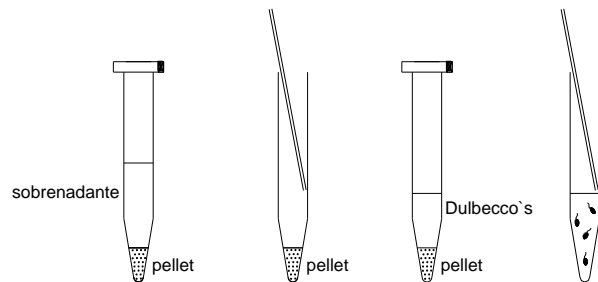


Figura 2 - Retirada do sobrenadante / dois ml Dulbecco's

- Centrifuga-se por mais cinco minutos a 300g.
- Despreza-se novamente o sobrenadante e torna-se a suspender o *pellet* com 1ml de IVF™20 Vitrolife

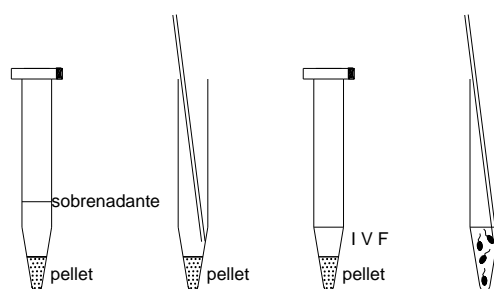


Figura 1 - Retirada do sobrenadante / 1ml IVF

- Centrifuga-se por mais três minutos e coloca-se em tubo de ensaio estéril em estufa de CO₂ (37°C), com uma angulação de cerca de 45°, em repouso, para que

os espermatozoides migrem por cerca de 40 a 45 minutos. Ocorre, então, uma seleção dos melhores espermatozoides.

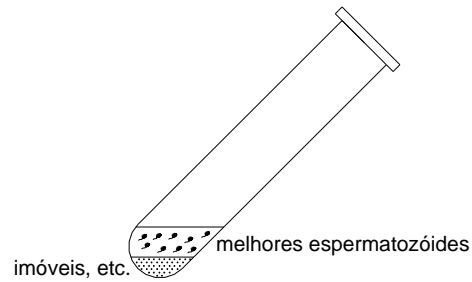


Figura 1 - Tubo a 45° / seleção dos melhores espermatozoides

- Após esse período retira-se o sobrenadante, reservando-o, e despreza-se o *pellet* (onde estão os espermatozoides imóveis e outras células).

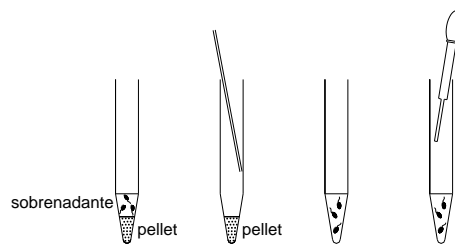
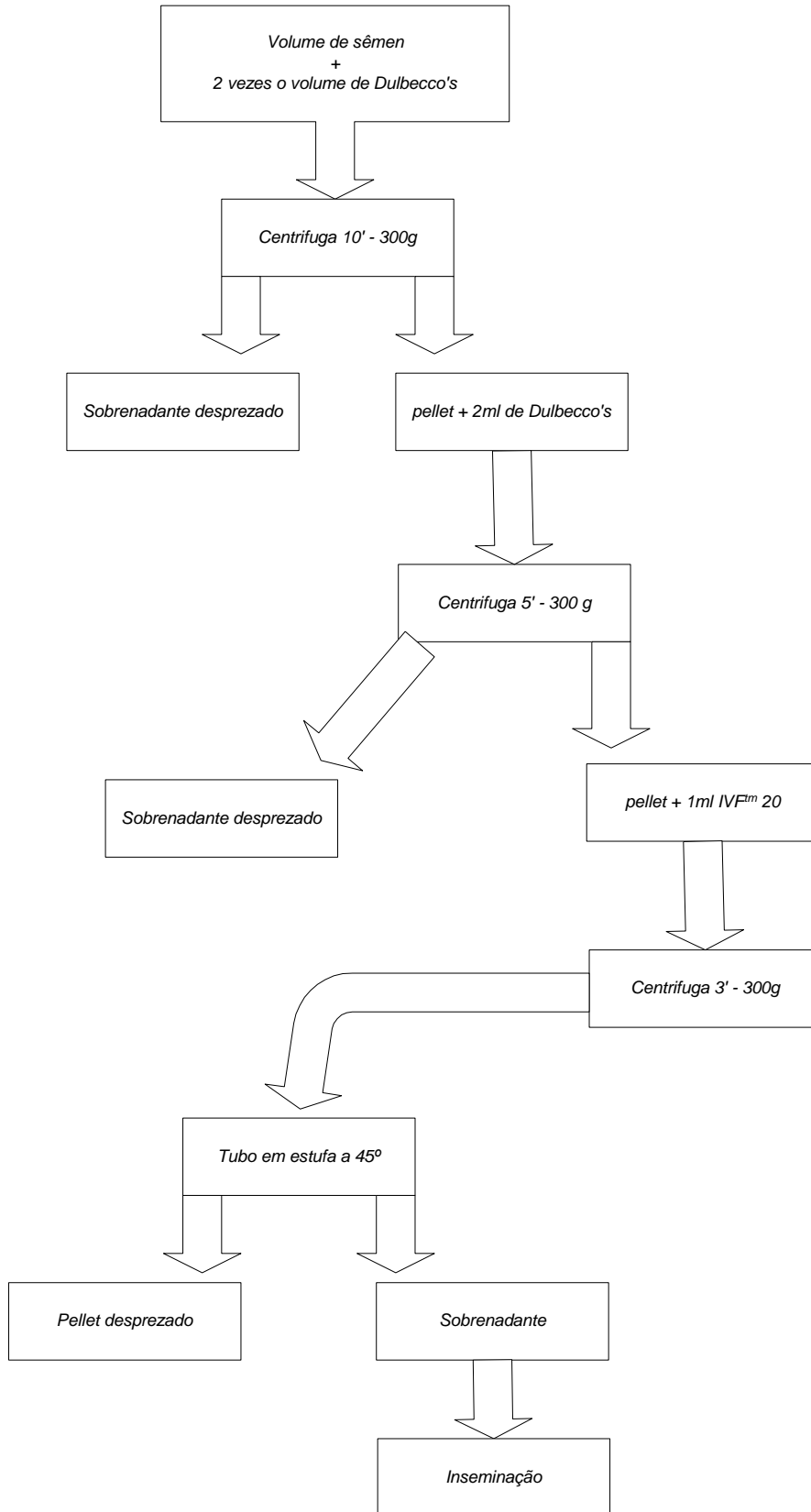


Figura 1 - Sobrenadante para inseminação

- A inseminação é então realizada com o sobrenadante previamente separado e posteriormente diluído. O número de espermatozoides por oócito oscilou sempre em torno de 150.000.

Figura 2 - Esquema preparo de sêmen pela técnica do *swim-up*

3.3.6 A Fertilização

Em torno de 18 horas após a inseminação, observou-se em microscopia óptica (Zeiss - Telaval 31) a presença dos pró-núcleos, indicando que a fertilização ocorrera. No segundo dia após a inseminação, observou-se o desenvolvimento embrionário. Esses se clivados, eram classificados e então transferidos para o interior da cavidade uterina.

Classificação dos embriões de acordo com os critérios de VAN STEIRTEGHEM *et al.*, 1996, quanto ao nível de fragmentação:

tipo A = Sem fragmentos

tipo B = 1 a 20% de fragmentos

tipo C = 20 a 50% de fragmentação

tipo D = Mais de 50% de fragmentação

As pacientes permaneceram em posição de litotomia e um cateter de *tom cat* (Cook) estéril com os embriões em meio de cultivo foram introduzidos pelas respectivas cérvices até uma distância 1cm menor que a medida da cavidade uterina, medida previamente por ultra-som endovaginal.

Os embriões foram transferidos juntamente com 25µl de meio de cultivo da placa IVF-™20(Vitrolife) através de uma seringa de insulina acoplada ao cateter da seguinte maneira:

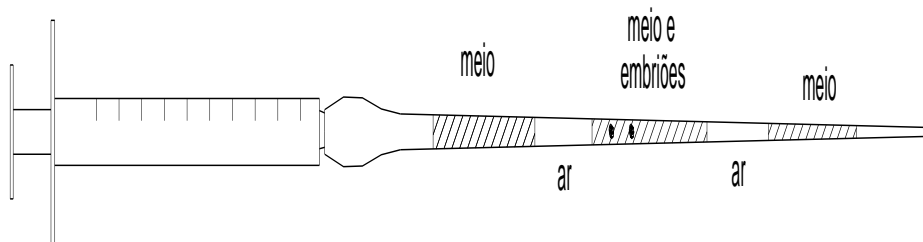


Figura 3 - Embriões em cateter de *tom cat*

As pacientes permaneceram em repouso por 30 minutos após as transferências.

3.3.7 O Endométrio

Desde o dia da coleta ovular, as pacientes iniciaram a preparação do endométrio com 17 β estradiol (Estrofen [®]- Medley) 2mg de oito em oito horas por via oral. Após 48 horas da coleta, foi acrescentada ao estradiol a progesterona micronizada (Utrogestan [®] - Enila) 200mg, também de oito em oito horas, em forma de comprimidos administrados por via vaginal. Essa medicação foi mantida até 12 dias após a

transferência embrionária quando a paciente realizava o exame de gravidez (β hCG). Se o resultado do exame fosse positivo, a paciente mantinha o uso da progesterona até 12 semanas de gestação.

Foi definida como gravidez clínica a presença de atividade cardíaca embrionária intra-uterina após cinco semanas de transferência embrionária através de ultra-som endovaginal.

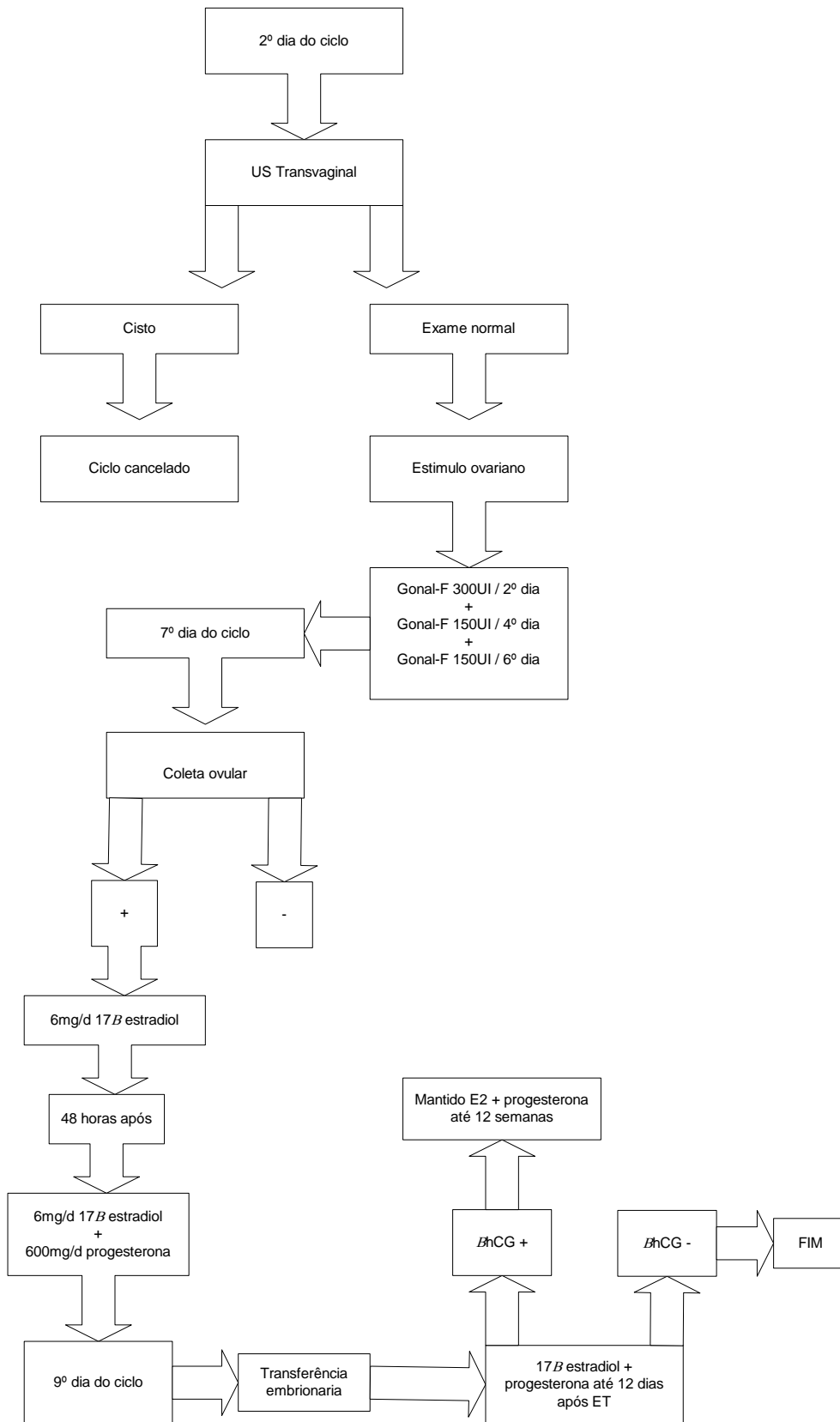


Figura 4 - Protocolo de tratamento das pacientes

4 RESULTADOS

Foram realizados 20 ciclos com 19 coletas ovulares (um ciclo cancelado devido à inaccessibilidade do ovário).

Foram puncionados 144 folículos com uma média de 7,6 folículo por paciente (variando de três a 27).

Foram coletados 67 oócitos (taxa de captação de 46,5% por folículo puncionado), com uma média de 3,5 oócito por coleta (variando de zero a oito).

Após 48 horas de cultivo, nove degeneraram (13,4%), 12 permaneceram em prófase I (17,9%), três atingiram o estágio de MI (4,5%) e 43 atingiram o estágio de MII (64,2%).

Dos 43 oócitos inseminados, 30 fertilizaram (69,8%).

Clivaram-se 25 embriões (83,3%) e foram transferidos ao longo de 10 ciclos.

Houve uma gravidez com nascimento de bebê saudável (5,3% de gravidez por coleta ovular e 10% por transferência).

Taxa de implantação um em 25 oócitos transferidos (4%).

Dos 25 embriões transferidos, quatro (16%) foram do tipo A, nove (36%) tipo B e 12 (48%) do tipo C (segundo os critérios de VAN STEIRTEGHEM *et al.*, 1996).

TABELA 1

Captação, maturação, fertilização, desenvolvimento embrionário e taxas de gravidez
de oócitos humanos maturados *in vitro*

Variáveis	Número	%	IC* a 95%
Ciclos	19		
Folículos puncionados	144	-	-
Oócitos captados	67	46,5%	38,2 a 55,0
MI após 48h	3	4,5%	1,2 a 13,4
MII após 48h	43	64,2%	51,5 a 75,2
Oócitos fertilizados	30	69,8%	53,7 a 82,3
Embriões clivados e transferidos	25	83,3%	64,5 a 93,7
Gravidez	1/10	10%	0,5 a 45,9
Implantação	1 / 25	4%	0,2 a 22,3
Bebê em casa	1/10	10%	0,5 a 45,9

IC* intervalo de confiança

Os ciclos também podem ser avaliados de acordo com a época em que foram realizados.

TABELA 1

Caracterização dos ciclos por épocas

Épocas	Folículos	Captação	Maturação	Fertilização	Embriões Transf.*
11/1999	10,5 p/p**	Média 3,75p/p (34,8%)	33,3%	60%	3
03 e 04/2000	8,8 p/p	Média de 3,8p/p (48,9%)	76,9%	75%	12
03/2001	5,8 p/p	Média de 5,8p/p (54,4%)	69,2%	%	10

* Embriões Transf. = Embriões transferidos

** p/p = por paciente

Foi realizada uma avaliação comparativa entre as épocas quanto às taxas de maturação e fertilização através do teste do qui-quadrado (χ^2).

Encontrado $p=0,0155$ para os resultados de maturação entre as épocas e $p=0,7528$ para a fertilização.

5 DISCUSSÃO

A coleta de oócitos imaturos de mulheres que não foram expostas a largas doses de gonadotrofinas tem incitado pesquisadores, notadamente nos últimos anos, para o desenvolvimento de um tratamento alternativo em técnicas de reprodução assistida. Trata-se de uma vantagem o fato de os oócitos serem expostos às doses de gonadotrofinas para maturação *in vitro* ao invés de *in vivo*, na medida em que se evita o gasto excessivo com altas doses de medicamentos necessários para a maturação *in vivo*, além de se abolir o risco da síndrome de hiperestímulo ovariano.

A técnica sofreu aprimoramentos ao longo do tempo e hoje coletam-se oócitos (com taxas razoáveis de recuperação) de pequenos folículos em crescimento ($\geq 3\text{mm}$) através de punções guiadas por ultra-som endovaginal, além de incrementos nas taxas de maturação, fertilização e clivagem embrionária. Entretanto, a situação atual da maturação *in vitro* ainda mostra taxas de gravidez aquém das obtidas pelas técnicas convencionais FIV ou ICSI (ver anexos).

Os resultados aqui apresentados reproduzem os estágios iniciais da utilização da técnica de maturar oócitos humanos *in vitro* como parte de técnicas de reprodução assistida no Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As pacientes recrutadas para o estudo formaram um grupo bastante homogêneo (n=15) quanto à idade, condições socioeconômicas, índice de massa corporal e causa de infertilidade.

Foram puncionados 144 folículos através de agulha acoplada ao ultra-som endovaginal ao longo de 19 ciclos de pacientes ovulatórias, estimuladas

minimamente, com recuperação oocitária de 46,5%, média de 3,5 por coleta. A taxa encontrada foi inferior à de alguns ciclos realizados com técnica similar (7,5 por WYNN *et al.*, 1998, e 5,66 por CHIAN *et al.*, 1999), mas superior à de THORNTON *et al.*, 1998 (0, 7) e muito similares às de MIKKELSEN *et al.*, 1999 e 2000a, com e sem estímulo mínimo com FSH prévio (respectivamente 4,2 com FSH e 2,4 sem FSH em 1999; e 4,0 com FSH e 3,7 sem FSH em 2000). Taxas bem superiores só foram encontradas em coletas através de espécimes ovarianos (11,73 por CHA *et al.*, 1991), coletas em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (11,25 por TROUNSON *et al.*, 1994, e 13,6 por CHA *et al.*, 2000) e em ciclos estimulados com esquemas de fertilização *in vitro* convencionais (8,14 por JAROUDI *et al.*, 1999, e 14,6 por JANSSENSVILLEN *et al.*, 1995).

Até a época da elaboração do protocolo desta pesquisa, o maior estudo randomizado e controlado avaliando-se o uso ou não de FSH em pequenas doses previamente (WYNN *et al.*, 1998) mostrava resultados bastante superiores com o uso da estimulação (5,2 oócitos por coleta sem uso prévio de FSH comparado a 7,5 com FSH prévio; e 43,5% de maturação sem FSH comparado a 71,1% com o uso de FSH) e, por isso, foi adotado neste trabalho. Contudo, trabalhos posteriores sem estímulo ovariano mostraram taxas bastante similares às encontradas com o estímulo mínimo (MIKKELSEN *et al.*, 1999 e 2000a, e SMITH *et al.*, 2000).

Os resultados das taxas de maturação 64,2% (43 em 67 oócitos coletados) foram superiores ou similares às da literatura inicial: CHA *et al.*, 1991 (55,8% e 35,9% respectivamente com adição de fluido folicular e soro de cordão); TROUNSON *et al.*, 1994 (54,85%); BARNES *et al.*, 1995 (53,8%); WU *et al.*, 1998 (25%). Contudo,

alguns estudos mais recentes mostram taxas de maturação superiores: MIKKELSEN *et al.*, 1999 (71%) e MIKKELSEN *et al.*, 2000a (85%). Essa superioridade talvez se deva à casuística mais expressiva e, provável, maior familiaridade com a técnica dos últimos citados.

O presente trabalho foi realizado com FIV e a taxa de fertilização encontrada (69,8%) foi similar aos dados disponíveis: CHA *et al.*, 1991 (81% e 31,5%, respectivamente, dos oócitos maturados com a adição de fluido folicular e soro de cordão aos meios de maturação); TROUNSON *et al.*, 1994 (22,9% no primeiro experimento e 40,75% no segundo experimento); JAROUDI *et al.*, 1999 (58,7%); MIKKELSEN *et al.*, 1999 (média de 53,5%) e SMITH *et al.*, 2000 (média de 75%).

Após o surgimento da ICSI em 1992, apenas TROUNSON *et al.*, 1994; WYNN *et al.* e HWU *et al.*, 1998, utilizaram a FIV como método de fertilização. Neste trabalho também utilizou-se a FIV como método para fertilização e as taxas encontradas foram similares e, algumas vezes, superiores às de ICSI já reportadas.

Foram transferidos 25 embriões para 10 pacientes com o nascimento de um bebê (10% por transferência) taxa é similar à de vários autores (7,6% por TROUNSON *et al.*, 1994; 10% por RUSSEL *et al.*, 1997; 9,5% por JAROUDI *et al.*, 1999; 10% MIKKELSEN *et al.*, 1999) mas inferior à de outros (28% por THORNTON *et al.*, 1998; 17,4% MIKKELSEN *et al.*, 2000a; 27,1% por CHA *et al.*, 2000 e 18% por MIKKELSEN *et al.*, 2001). Provavelmente, os resultados reportados tenham relação com as casuísticas mais expressivas presentes (123 ciclos por THORNTON *et al.*,

1998; 87 ciclos por MIKKELSEN *et al.*, 2000a; 94 ciclos por CHA *et al.*, 2000, e 132 ciclos por MIKKELSEN *et al.*, 2001).

Os trabalhos não reportaram as taxas de **bebê em casa**, pois, na grande maioria das publicações, ainda havia gestações em curso. Talvez este seja o dado de maior importância em tratamento geral de infertilidade e aqui obteve-se a mesma taxa de 10% por transferência.

Não foi encontrado na literatura apresentada descrição sobre a qualidade dos embriões transferidos e, por isso, não se pôde comparar os embriões deste com os de outros trabalhos.

A pesquisa mantém em aberto algumas indagações que cercam o processo de maturação oocitária *in vitro*. Mesmo associando-se os resultados de estudos em animais (sobretudo espécies domésticas) aos resultados de humanos (mais de 2000 trabalhos sobre oócitos foram publicados nos últimos 10 anos segundo MOOR *et al.*, 1998), não há consenso sobre os meios de cultivo e substâncias a ele adicionadas.

Um meio de cultivo ideal seria aquele que reproduzisse as funções secretoras e sinalizadoras da maturação o mais próximo possível do modelo *in vivo*. A maioria dos estudos sobre meios de cultivo e suplementos traz limitações para suas conclusões na medida em que não conseguem determinar os efeitos dessas substâncias em todo o processo da maturação (MOOR *et al.*, 1998).

Outra questão que ainda necessita de resposta é se os oócitos produzidos por maturação *in vitro* são biologicamente equivalentes aos produzidos *in vivo*. Não há estudos em humanos, mas em um grande estudo com bovinos, GALLI&LAZZARI,

em 1996, encontraram 30% a mais no número de embriões produzidos e nascidos vivos de oócitos produzidos *in vivo* comparados aos maturados *in vitro*. Mesmo os melhores embriões produzidos *in vitro* pareceram ser de qualidade inferior aos produzidos *in vitro* como mostraram suas reduzidas capacidades de resistir a estresses como congelamento, enucleação e transplante nuclear. Continuando a avaliação, foi medida a quantidade relativa de proteínas (16 classes) sintetizadas, dos oócitos maturados sob diferentes condições: A) folículos intactos (controles) ou imaturos, maturados *in vitro* subdivididos em B) cultivados com células do cumulus e C) completamente desnudos. Esses três grupos encontravam-se sem indução hormonal, enquanto outros subgrupos A1, B1 e C1 foram submetidos a estímulo hormonal. Houve diferença importante na quantidade de proteínas produzidas pelos folículos cultivados intactos ou oócitos cultivados com células do cumulus em relação aos desnudos.

Embora a porcentagem de oócitos que se desenvolvem até o termo em sistemas de maturação *in vitro* seja ainda reduzida, apesar da sensibilidade desses oócitos ao estresse, e possíveis diferenças entre a bioequivalência deles e dos maturados *in vitro*, pensou-se aqui ser a técnica perfeitamente exequível e com benefícios óbvios para ambos os lados: médico e paciente. Isso por ser o tratamento menos invasivo, na medida em que menos injeções de gonadotrofina recombinante são administradas, mais rápido (coleta realizada no sétimo dia do ciclo enquanto que nos processos habituais de indução é realizada em torno do 14º dia), risco extremamente reduzido de síndrome de hiperestímulo (nenhum caso na amostra), redução significativa dos custos do tratamento (cerca de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{4}$ da terapia convencional - quatro ampolas

comparadas a cerca de 12 a 14 de FSH recombinante - Gonal-F®/Serono, no protocolo do Hospital das Clínicas), além dos benefícios associados aos avanços futuros na área de reprodução assistida (aprimoramento dos bancos de oócitos e a criopreservação).

O processo de maturar oócitos humanos *in vitro* como parte das técnicas de reprodução assistida, FIV e ICSI, deve ser aprimorado principalmente em um país em desenvolvimento, com economia delicada como o nosso, pois os tratamentos afetam sobremaneira a saúde econômica do casal infértil.

Com base nos experimentos animais, um incremento nas taxas sucesso da maturação *in vitro* de oócitos humanos pode ser esperado quando os problemas, provavelmente técnicos, forem superados, haja vista os resultados de MIKKENSEN *et al.*, 1999, e CHA *et al.*, 2000) com casuísticas expressivas.

Nesta pesquisa viu-se uma tendência clara de melhores resultados à medida que a familiaridade com a técnica crescia e os ciclos consecutivos também: 34,8% de captação na primeira fase do estudo (quatro ciclos) comparado a 54,4% na terceira fase (nove ciclos); 40% de maturação na primeira fase, comparado a 97,5% na segunda (seis ciclos) e 86,5% na terceira. Avaliadas as taxas de maturação entre as épocas através do teste do qui-quadrado, encontrou-se um $p = 0,0155$ estatisticamente significativo. No que diz respeito às taxas de fertilização, os resultados não diferiram entre as épocas (obtiveram-se boas taxas em todas as fases - 60% na primeira, 75% na segunda e 66,7% na terceira). Avaliadas pelo teste do qui-quadrado o valor p encontrado foi de 0,7528.

Espera-se que no futuro seja possível eliminar os oócitos que contenham DNA alterado ou anormalidades citoplasmáticas, contribuindo para melhores resultados com a técnica.

As baixas taxas de gravidez, à exceção dos dois autores citados, reportadas pelos estudiosos da MIV, provavelmente trazem estrita correlação com o fracasso em alguma das etapas da maturação (MOOR *et al.*, 1998), pois está claro, há cerca de 70 anos, que uma embriogênese normal depende estritamente de uma oogênese perfeita.

Anormalidades grosseiras geralmente interrompem o ciclo meiótico ou bloqueiam a fertilização. Imperfeições mais sutis durante a maturação podem se manifestar durante os estágios mais tardios de clivagem ou já em estágio de blastocisto.

Concluindo, a sobrevivência até o termo é a única garantia absoluta de que uma completa maturação citoplasmática tenha ocorrido (MOOR *et al.*, 1998)

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir a partir do presente estudo que a técnica de maturar oócitos humanos *in vitro* previamente à fertilização *in vitro* é uma técnica totalmente exequível, capaz de gerar gravidez.

A obtenção de melhores resultados em todos os passos da maturação *in vitro* de oócitos seguida de fertilização *in vitro* ao longo do tempo de realização da pesquisa, traduz a aquisição de um melhor domínio da técnica em todos os seus passos.

Devido ao tamanho amostral limitado, não se pode inferir qualquer coisa além da aplicabilidade do método com o objetivo proposto neste estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOG-American College of Obstetricians and Gynecologists. *Infertility:ACOG Technical Bulletin*, 125.Washington, ACOG, 1980 *apud* Aspectos emocionais do casal infértil -BADALOTTI, M. *et al. Fertilidade e infertilidade humana* Medsi, 1997.

ALAK, B.M. *et al.* Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activina. **Fertil. Steril.**, v. 66, n. 94, p. 646-652, Oct , 1996.

ALAK, B.M. *et al.* Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. **Fertil. Steril.**, v. 70, n. 6, p. 1126-1130, 1998.

ANDERIESZ, C. ; TROUNSON, A.O. .The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 10, n. 9, p. 2377-2381, 1995.

ANDERIESZ, C. *et al.* Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 5, p.1140-1148, 2000.

BARNES, F.L. *et al.* Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching **Hum. Reprod.**, v. 10, n. 12, p. 3243-3247, 1995.

BARNES, F.L. *et al.* Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. **Fertil. Steril.**, v. 65, p. 1151-1156, 1996.

BAVISTER, B.C. **J. Reprod. Fertil.** v.185, p.44, 1969 *apud* MASTROIANI, L.&NORIEGA, C. Observations on human ova and the fertilization process **Amer. J. Obstet. Gynec.** v.1,p. 682-690, 1970.

CAVILLA, J.L. *et al.* The effects of meiosis activating sterol on in-vitro maturation and fertilization of human oocytes from stimulated and unstimulated ovaries. **Hum. Reprod.**, v. 16 , n. 3, p. 547-555, 2001.

CHA, K.Y. *et al.* 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.**, v. 55, n. 1, p. 109- 113, Jan, 1991.

CHA, K.Y. Clinical use of immature oocytes - Annual meeting of American Society for Reproductive Medicine -postgraduate course-Course VI, 97-114, Seattle, 1995

CHA, K.Y. *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.**, v.73, n. 5, p. 978-983, May, 2000.

CHANG, M.C. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization, and subsequent development in the fallopian tube. **J. Exp. Zool.**, p.128-379, 1955.

CHIAN, R.C. *et al.* Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. **Fertil. Steril.**, v.72, n. 4, p. 639- 642, Oct., 1999.

CHIAN, R.C. In vitro maturation of immature oocytes from women with or without polycystic ovary. **Fertil. Steril.**, v. 74, (3S) O-117, 2000.

CHILD, T.J. *et al.* In vitro maturation (IVM) of oocytes from unstimulated normal ovaries of women with a previous poor response to IVF. **Fertil. Steril.**, v.74, (3S) O116, 2000.

CHOI, T.S. *et al.* Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 79, p. 565-568, 1987. *apud*: BARNES, F.L., *et al* Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. In: **Hum. Reprod.**, v 10, n.12 , p.3243-3247, 1995.

COBO, A.C. *et al.* Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. **Hum. Reprod.**, v.14, n.7, p.1864-1868, 1999.

COOPER, A. *et al.* Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation in vitro in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. **Hum. Reprod.**, v.13, n. 4, p. 971-978, 1998.

CORTVRINDT, R.; SIMTZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. In vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. **Hum. Reprod.**, v.11, p.2656-2666, Dec., 1996.

CORTVRINDT, R.G.; HU, Y.; SMITZ, J.E.J. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. **Fertil. Steril.**, v.70, n. 6, p. 1114-1125, Dec., 1998.

CROSIGNANI, P.G.; RUBIN, B. The ESHRE Capri Workshop. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. **Hum. Reprod.**, v.11, p.1775-1807, 1996.

DAS, K. *et al.* Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. **Fertil. Steril.**, v. 55, p.1000-1004, 1991.

DAYA, S. *et al.* Natural cycles for in vitro fertilization: cost-effectiveness analysis and factors influencing outcome. **Hum. Reprod.**, v.10, n.7, p.1719-1724, 1995.

DELL AQUILA, M. E. *et al.* Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v. 12, n. 12, p.2766-2772, 1997.

DOR, J. *et al.* The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in vitro fertilization and embryo transfer: a comparison of results with those of patients with tubal infertility. **Hum. Reprod.**, v. 5, p. 816-818, 1990.

DOWNS, S.M.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. **Gamete Res.**, v.15, p. 115-122, 1986.

EDDY, E.M., *et al.* Review article: Origin and migration of primordial germ cells in mammals. **Gamete Res.**, v.4, p.333-336, 1981.

EDIRISINGHE, W.R. *et al.* Birth from cryopreserved embryos following in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v.12, p.1056-1058, 1997.

EDWARDS, R.G. Meiosis in ovarian oocytes of adults mammals **Nature**, v.196, p.446-450, Nov., 1962.

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-351, Oct., 1965a.

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of human oocytes. **Lancet**, v.2, p.926-929, 1965b.

EDWARDS, R.G.; BAVISTER, B.C.; STEPTOE, P.C. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. **Nature**, v. 221, p. 632- 635, Feb., 1969.

EDWARDS, R.G.; STEPTOE, P.C.; PURDY, J.M. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos in vitro. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.87, p.737-756, 1980.

EVERS, J.H.L. *et al.* Elevated levels of basal estradiol-17 β predict poor response in patients with normal basal levels of follicle stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v. 69, p.1010-1014, Jun., 1998.

FORTI, G.; KRAUZ, C. Evaluation and treatment of the infertile couple. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, n.12, p.4177-4188, 1998.

GALLI, C.; LAZZARI .Practical aspects of IVM/IVF in cattle, **Anim. Reprod. Sci.** 42:371-379, 1996 apud: MOOR, R.M., *et al.* Oocyte maturation and embryonic failure, In: **Hum. Reprod.**, v. 4, n.3, p.223-236, 1998.

GIUDICE, L.C. *et al.* Growth factors in normal ovarian follicle development. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, v.14, n.3, Aug., 1996.

GOLBUS, M. The influence of strain, maternal age and method of maturation on mouse oocyte aneuploidy. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v.31, p.84-90, 1981.

GOMEZ, E. *et al.* Effects of epidermal growth factor in the final stages of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in humans. **Hum. Reprod.**, v.8, p.691-694, 1993.

GONDOS, B.; WESTERGAARD, L.; BYSKOV, A.G. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary:ultrastructural and squash preparation study. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.155, p.189-195, Jul., 1986.

GOUD, P.T. *et al.* In -vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. **Hum. Reprod.**, v.13, n.6, p.1638-1644, 1998.

GRØNDAHL, C. *et al.* Human oocyte maturation in vitro is stimulated by meiosis-activating sterol. **Hum. Reprod.**, v.15, (5S), p.3-10, 2000.

HARTSHORNE, G.; SARGENT, I.; BARLOW, D. In vitro maturation as a source of human oocytes and embryos for research. **Hum. Reprod.**, v.9, p.970- 972, 1994.

HOMBERG, R. *et al.* Serum levels of insulin- like growth factor-1, IGF binding protein-1 and insulin and the response to human menopause gonadotrophins in women with polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod.**, v.11, p.716-719, 1996.

HOWLES, C.M. *et al.* Effect of high tonic levels of luteinizing hormone on outcome of in vitro fertilization. **Lancet**, v. 2, p.521-522, Aug., 1986.

HUGHES, E.G. *et al.* The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Fertil. Steril.**, v.58, p.888-896, Nov., 1992.

HWU, Y.M., *et al.* Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following in vitro maturation and fertilization using a co-culture system. **Hum. Reprod.**, v.13, n.7, p.1916-1921, 1998.

JACOBSON, C.B.; SITES, J.G.; ARIAS-BERNAL, L.F. in vitro maturation and fertilization of human follicular oocytes. **Int. J. Fertil.**, v.15, p.103-114, 1970. *apud*: CHA, K.Y. Clinical use of immature oocytes In: **Annual meeting of American Society for Reproductive Medicine**, 1995, Seattle, Course VI.

JAGIELLO, G.; KARNICK, J.; RYAN, R.J. Superovulation with pituitary gonadotropins: method for obtaining meiotic metaphase figures in human ova. **Lancet**, v.1, p.178-180, Jan., 1968.

JANSSENSWILLEN, C.; NAGY, Z.P.; STEIRTEGHEM, A.V. Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. **Hum. Reprod.**, v.10, n.2, p.375-378, 1995.

JAROUDI, K.A. *et al.* Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in vitro matured oocytes. **Hum. Reprod.**, v.2, n.4, p.857-859, 1997.

JAROUDI, K.A. *et al.* Embryo development and pregnancies from in vitro matured and fertilized human oocytes. **Hum. Reprod.**, v.14, n.7, p.1749-1751, 1999.

KARP, G.; BERRILL, N.J. Gametogenesis. In: KARP, G.; BERRILL, N.J. **Development**. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1981, p.130-138.

KENNEDY, J.F.; DONAHUE, R.P. Human oocytes:maturation in chemically defined media. **Science**, v.164, p.1292- 1293, 1969.

KERIN, J.H. *et al.* Morphological and functional relations of graffian follicle growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.88, p.81-88, 1981.

KIM, B.K. *et al.* In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. **Fertil. Steril.**, v.74, n.6, p.1153-1158, Dec., 2000.

KITO, S.; BAVISTER, B.D. Maturation of hamster oocytes under chemically defined conditions and sperm penetration through the zona pellucida. **Zigote**, v.4, p.199-210, 1996.

KODAMA, H. *et al.* High incidence of embryo transfer cancellation in patients with polycystic ovarian syndrome. **Hum. Reprod.**, v.10, p.1962-1967, 1995.

LÉVESQUE, J.T.; SIRARD, M.A. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.425-431, 1995.

LICCIARDI, F.L.; LIU, H.C; ROSENWAKS, Z. Day 3 oestradiol serum concentration as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v.64, p.991-994, Nov., 1995.

LIGHTEN, A.D. *et al.* Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. **Hum. Reprod.**, v.13, n.11, p.3144-3150, 1998.

LIU, J. *et al.* Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. **Fertil. Steril.**, v.67, n.3, p.566-568, Mar., 1997.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Effects of amino acids on the development of in-vitro matured/in - vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. **Hum. Reprod.**, v.10, n.11, p.2985-2991, 1995.

MAC DOUGALL, M.J. *et al.* A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in vitro fertilization. **Hum. Reprod.**, v.8, p.233-237, 1993.

MASTROIANI, L.; NORIEGA, C. Observations on human ova and the fertilization process. **Amer. J. Obstet. Gynec.**, v.1, p.682-690, Jul., 1970.

MENKIN, M., ; ROCK, J. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. **Amer. J. Obstet. Gynec.**, v.55, n.3, p.440-452, Mar., 1948.

MERRIMAN, J.A.; WHITTINGHAM, D.G.; CARROLL, J. The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in-vitro matured mouse oocyte. **Hum. Reprod.**, v.13, n.3, p.690-695, 1998.

MIKKELSEN, A.L.; SMITH, S.D.; LINDENBERG, S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. **Hum. Reprod.**, v.14, n.7, p.1847- 1851, 1999.

MIKKELSEN, A.L.; SMITH, S.; LINDENBERG.S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation .**Hum. Reprod.**, v.15, (5S), p.11-17, 2000a.

MIKKELSEN, A.L.; SMITH, S.; LINDENBERG, S. Impact of oestradiol and inhibin A concentrations on pregnancy rate in in vitro oocyte maturation. **Hum. Reprod.**, v.15, n.8, p.1685-1690, 2000b.

MIKKELSEN, A.L. *et al.* Basal Concentrations of oestradiol may predict the outcome of in-vitro maturation in regularly menstruating women. **Hum. Reprod.**, v.16, n.5, p.862-867, 2001.

MOOR, R.M. *et al.* Oocyte maturation and embryonic failure. **Hum. Reprod.**, v.4, n.3, p.223-236, 1998.

MOORE, K.L. Gametogênese; Sistema Urogenital. In: _____. **Embriologia Clínica**. 4^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990. Cap. 2 e 13.

NAGY, Z.P. *et al.* Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. **Fertil. Steril.**, v.65, n.5, p.1047-1050, May., 1996.

OKTAY, K. *et al.* Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? **Fertil. Steril.**, v.69, n.1, Jan., 1998.

PAULSON, R.J.; SAUER, M.V.; LOBO, R.A. Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. **Fertil. Steril.**, v.53, p.870-874, 1990.

PELLICER, A.; LIGHTMAN, A.; PALMER, T.G. Morphological and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. **Fertil. Steril.**, v.50, p.805-810, 1988.

PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. **J. Exp. Med.**, v.62, p.655-675, 1935.

PINCUS, G.; SAUNDERS, B. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro IV. The maturation of human ovarian ova. **Anat. Rec.**, v.75, p.537-545, 1939.

PRINS, G.S., *et al.* Gonadotrophins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. **Fertil. Steril.**, v.47, p 1035-1037, 1987.

QUERO, J.M.O., *et al.* The effect of bovine amniotic fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. **Br. Vet. J.**, v.151, p.547-554, 1995.

RACOWSKY,C.; KAUFMAN, M. Nuclear degenerations and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro:analysis by light microscopy. **Fertil. Steril.**,v.58, n.4, p.750-755, Oct., 1992.

RIZK, B.; SMITH, J. Ovarian hyperstimulation syndrome after superovulation for IVF and related procedures. **Hum. Reprod.**, v.7, p 320-327, 1992.

ROCK, J.; MENKIN, M. *Science* 100: 105, 1944 *apud*: MASTROIANI, L.; NORIEGA, C. Observations on human ova and the fertilization process.In:**Amer. J. Obstet. Gynec.**, v.1, p.682-690, 1970.

ROSSING, M.A., *et al.* Ovarian tumors in a cohort of infertile women . **N. Engl. J. Med.**, v.331, p.771-776, 1994.

RUSSEL, J.B., *et al.* Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. **Fertil. Steril.**, v.67, n.4, p.616-620, Apr.,1997.

RUTHERFORD, A.J. The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes Fertility and Reproductive Medicine-Proceedings of the XVI World Congress on Fertility and Sterility, San Francisco, 4-9 October 1998- Elsevier Science B.V. 577, 1998.

SANYAL, M.K.; TAYMOR, M.L.; BERGER, M.J. Cytologic features of oocytes in the adult human ovary. **Fertil. Steril.**, v. 27, p.501-510, May., 1976.

SCHRAMM, R.D. ; BAVISTER B.D. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on meiotic and developmental competence of oocytes in vitro in non-stimulated rhesus monkeys. **Hum. Reprod.**, v.10, p.887-895, 1995.

SCOTT, R.T., *et al* .Follicle stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. **Fertil. Steril.**, v.51, p.651-654, Apr., 1989.

SEIBEL, M.M. Oocyte maturation and follicle development. *In* ____ **Infertility: a comprehensive text**. New York, NY: Aplleton e Lange, 1990. cap 3, p.37-47.

SEIFER, D.B., *et al.* .Follicular fluid insulin- like growth factor-I and insulin growth factor-II concentrations vary as a funtionan of day 3 serum follicle stimulating hormone. **Hum. Reprod.**, v.10, p. 804-806, Jan., 1995.

SEIFER, D.B., *et al.* Day 3 serum inhibin B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. **Fertil. Steril.**, v. 67, p.110-114, 1997.

SERTA, R.T., *et al.* The developmental potential of mouse oocytes matured in serum-free culture conditions. **Hum. Reprod.**, v.10, n.7, p.1810-1815, 1995.

SHEA, B.F.; BAKER, R.D.; LATOUR, P.A. Human follicular oocytes and their maturation in vitro. **Fertil. Steril.**, v.26, n.11, p.1075-1082, Nov., 1975.

SHETTLES, L.B. Observations on human follicular and tubal ova. **Amer. J. Obstet. Gynec.**, v.66, n.2, p.235-247, Aug., 1953.

SHETTLES, L.B. Further observations on living human oocytes and ova. **Amer. J. Obstet. Gynec.**, v.69, n.2, p.365-371, Feb., 1955.

SMITH, S.D.; MIKKELSEN, A.L.; LINDENBERG, S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. **Fertil. Steril.**, v.73, n.3, p.541-544, Mar., 2000.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; HU, Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotrophin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. **Hum. Reprod.**, v.13, n.3, p.664-669, 1998.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R. Oocyte in vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. **Hum. Reprod.**, v.14, (1S), p.145-161, 1999.

SON, W.Y., *et al.* Effects of 1, 2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. **Fertil. Steril.**, v.66, p.995-999, 1996.

SPEROFF, L.; GLASS, R.H.; KASE, N.G. In: ____ **Endocrinologia ginecológica clínica e infertilidade** 5ª edição. Manole, 1995. p.95-109, p.185-235, p.849- 880.

STANGER, J.D.; YOVICH, J.L. Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v.92, p.385-393, 1985.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Successful birth after IVF. **Lancet** , v. 2, p. 366, Aug., 1978.

STONE B.A., *et al.* Levels of steroid and protein hormones in antral fluids of women treated with different combinations of gonadotropins, clomiphene citrate, and a gonadotropin- releasing hormone analog. **Fertil. Steril.**, v.49, p.249-252, 1998.

SUIKKARI, A.M., *et al.* Luteal phase start of low- dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. **Hum. Reprod.**, v.15, n.4, p.747-751, 2000.

THORNTON, M.H.; FRANCIS, M.M.; PAULSON, R.J. Immature oocyte retrieval: lessons from unstimulated IVF cycles. **Fertil. Steril.**, v.70, n.4, p.647- 650, Oct., 1998.

TOTH, T.L., *et al.* Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. **Fertil. Steril.**, v. 61, p.891-894, Jun., 1994.

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.**, v.62, p.535-363, Aug., 1994.

TROUNSON, A.O., *et al.* Maturation of human and bovine primary oocytes in vitro for fertilization and embryo production. **Singapore. J. Obstet. Gynaecol.**, v.27, p.78-84, 1996 *apud*: TROUNSON, A. ANDERIESZ, C., JONES, G.M. *et al* Oocyte maturation In: **Hum. Reprod.**, v.13, (3S), p.52-62, 1998.

TROUNSON, A, *et al.* Oocyte maturation. **Hum. Reprod.**, v.13, (3S), p.52-62, 1998.

TUBERT, S. Mujeres sin sombra. Maternidad y tecnología. Siglo Veintiuno de España, Madrid, 1991 *apud*: BADALOTTI, M. *et al.* Aspectos emocionais do casal infértil In: ___ **Fertilidade e infertilidade humana**, Rio de Janeiro, Medsi, 1997.

TUCKER, M.J., *et al.* Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. **Fertil. Steril.**, v.70, n.3, p.578-579, Sep., 1998.

VAN BLERKON, J. ; DAVIS, P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase II mouse oocytes matured in vivo and in vitro. **Hum. Reprod.**, v.16, n.4, p.757-764, 2001.

VAN STEIRTEGHEM, A. *et al.* The development of intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v.11, p.59-72, S(1), 1996.

VEECK,L.L., *et al.* maturation and fertilization of morfologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v.39, n.5, p.594-602, May., 1983.

VOLARCIK, K., *et al.* The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age:evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. **Hum. Reprod.**, v.12, n.1, p.154-160, 1998.

WHITACRE, K.S., *et al.* Effects of ovarian source, patient age, and menstrual cycle phase on in vitro maturation of immature human oocytes. **Fertil. Steril.**, v.70, n.6, p.1015-1021, Dec., 1998.

WHITTEMORE, A.S.; HARRIS, R.; ITNYRE, J. Characteristics leading to ovarian cancer risk. Collaborative analysis of 12U.S. case control studies. **Am. J. Epidemiol.**, v.136, p.1184-1203, 1992.

WIEMER, K.E., *et al.* In vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. **Hum. Reprod.**, v.4, p.595-600, 1989.

WIEMER, K.E., *et al.* Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.30, p.330-338, 1991.

WYNN, P., *et al.* Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. **Hum. Reprod.**, v.13, n.11, p.3132-3138, 1998.

WU, J.; ZHANG, L.; LIU, P. A new source of human oocytes :preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicles from follicular aspirates. **Hum. Reprod.**, v.13, n.9, p.2561-2563, 1998.

WU, J.; ZHANG, L.; WANG, X. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. **Fertil. Steril.**, v.74, n.6, p.1137-1141, Dec., 2000.

ZHANG, X., *et al.* Human menopausal gonadotrophin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization cleavage rates. **Fertil. Steril.**, v.59, p.850-853, Apr., 1993.

ZHENG, P., *et al.* Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined cultured media and their functional assesment by IVF and embryo development. **Hum. Reprod.**,v.16, n.2, p.300-305; 2001.

8 ANEXOS

ANEXO 1- SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV I

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Amaral,2001	15 pacientes / 19 coletas 144 folículos / 67 oócitos 46,5% 3,5 p/p*	tuba	FSH 300UI 2º dia , 150UI 4º e 6º dias	7º dia agulha duplo lúmen	TCM 199	penicilina, gentamicina, FSH, hCG, piruvato, soro sintético	48h	43 / 67 (64,2%)	FIV	30 (69,8%)	25 ET# 10 pacientes 1gestação 10%
Veeck,1983	44ciclos FIV 74imaturados	Tuba / ESCA	**FIV hMG/FSH/hCG	Laparoscopia agulha calibre 12	Ham'sF10	soro de cordão	22h	64(86, 4%)	FIV	57(89%)	44 ET 2gestações 4, 5% (*)
Cha, 1991	tecido ovariano de 23 mulheres 270 oócitos	cirurgia ginecológica benigna	Nenhum	Não descrita a fase do ciclo agulha calibre 21	Ham'sF10	1)fluido folicular 2)sôro de cordão	32 a 48h	1)58 / 104 55, 8% 2)19 / 53 35, 9%	FIV	1)47 (81%) 2)6 (31, 6%)	5 ET 1paciente 1gestação (3)
Trounson ,1994 1º experimento	19pacientes 1)138 (15, 3) 2)28 (2, 8)	1= 9 -SOP 2=10 s/SOP	Nenhum	entre dias 5 e 12	EMEMc/ Earle e glutamina	sais de soro de cordão, hMG, hCG e E2	até 54h	131 (81%) alguns atréticos	FIV	30 / 131 22, 9%	Não descrito
Trounson,1994 2º experimento	1)10 - SOP anovulatórias 138 oócitos 13, 8 p/p 2)13 - SOP ovulatórias 170 oócitos 13, 1p/p	SOP	Nenhum	Não descrita	idem (a) ouTCM199+ a mesma suplementação	c/ e s/ hCG / co- cultura c/ cél. maduras da granulosa c/ e s/ hCG	29 e ½ a 32 e ½h1 ou 34 e½ a 35 e55% ½ h 2) 93 / 170 54, 7%	76/ 138 55% 2) 93 / 170 54, 7%	FIV	1) 31 / 76 40, 7% 2)38 / 93 40, 8%	13 TE† 1gestação em paciente anovulatória 7, 6%
Janssenswillen, 1995	56pacientes 818oócitos 14, 6+/-6, 5 p/p	Não descrito	FIV(GnRH +HMG+hCG)	Guiada por US	B2 Ménézo	Nenhum	24 a 30h 1)microgota ou 2)co-cultura c/Vero células	1)25 (38%) 2)52 (82%)	ICSI	Não observado	Não observado

* p/p = por paciente

** FIV = ciclo convencional de FIV

TE † = transferência embrionária

ET = embriões transferidos

(*) = transferidos em conjunto embriões de oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*

ANEXO 2 - SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV II

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Russel, 1997 randomizado/ avaliação de preparo endometrial	14 pacientes 1) 83 oócitos 2) 78 oócitos	várias	nenhum	agulha calibre 17 lúmen único, acoplada à bomba	Eagle's MEM ou TCM 199	17βE2, FSH e hCG, soro sintético	52h	1) 39, 7% (34/83) 2) 61, 5% (48/78)	ICSI	1) 75, 7% (25/34) 2) 75% (36/48)	1 (10 TE) 10%
Liu, 1997 relato de caso	1 ciclo 5 oócitos	Masculino	FIV convencional s/ hCG	não descrita	B2	FSH e hCG	48h	5/5 (100%)	ICSI	2/5 (40%)	1 gestação de 1 TE
Goud, 1998 randomizado/ avaliação uso ou não de EGF	92 pacientes	?	FIV (GnRH +HMG+hCG)	Guiada por US	M199 1) 2ng/ml EGF 2) s/EGF	albumina sérica humana, piruvato, penicilina, estreptomicina, 17βE2, FSH, hCG	24 a 30h	1) 36 (64, 3%) 2) 19 (33, 9%) cumulus 1) 72 (81, 8%) 2) 71 (79, 8%) c/cumulus	ICSI	1) 16 (72, 7%) 2) 7 (53, 8%) s/cumulus 1) 33 (71, 7%) 2) 21 (45, 6%) c/cumulus	Não observado
Thornton, 1998 randomizado/ aval. Meio	123 ciclos 101 oócitos (média de 0, 7)	tuba	10000 UI hCG	agulha calibre 17 lúmen único	1) idem Cha 1991 2) padrão	idem	24h até 5 dias	1) 9 de 30 (30%) 2) 8 de 25 (32%)	?	1) 7 de 9 (77%) 2) 5 de 8 (62%)	2 (7 TE) 28, 5%

ANEXO 3 - SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV III

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Wynn,1998	1)5, 2+/-1, 3 2)7, 5+/-1, 2 p/p	tuba	1)n=9s/FSH 2)n=17-450UIFSH, 2º, 4ºe 6ºd	Calibre 16 Duplo lúmen	MEM c/ bicarbonato e sais de Earle	albumina sérica humana, piruva-to, penicilinaG, estreptomicina, transferrina, selenite de sódio, insulina recombinante, LongR3 IGF-I 3L- glutamina, FSH, hCG	48h microgota	1) 20(43, 5%) 2)81(71, 1%)	FIV	-	-
Wu,1998	16 pacientes de 51, 8+/-37, 3foliculos pré- antrais variando de20 a 150	-	FIV	-	Ham'sF10	soro de cordão 28diasHMG e EGF em doses ≠, +Fluido folicular	Após 39 a 44 dias	44 (25%)de 260 foliculos			
Hwu, 1998	51pacientes 268 oócitos 5, 3 p/p 229 usados	- Doação	Coleta durante cesareana	agulha de calibre 21 acoplada à seringa de 2, 5ml	HTF	hMG, soro de cordão, E2	36 a 48h microgota co- cultura c/ células tubárias	154(67, 2%)	FIV	107 / 154 69, 5%	Não descrito
Jaroudi,1999	18pacientes 21 ciclos 171oócitos	Pacientes de risco p/SHO	Esquemas curto e longoHMG antesdo risco de SHOs/hCG	Não mencionada	HTF	soro sintético, hMG, hCG	44hMicrogotaCo- cultura	121(70, 8%)	ICSI	71(58, 7%)	2(9, 5%)

ANEXO 4 - SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV IV

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Mikkelsen, 1999	1)21 2)17 12pacientes	Masculino/tuba	1)n=5=FSH150UI FSH por 3 dias 2)n=7=FSHpor+/- 9 diasfolículo Dom.*10mm	agulha calibre 17	TCM199	FSH, hCG, 17βE2, piruvato penicilina G estreptomicina, soro da paciente	48h microgota	1)15 / 21 71% 2)12 / 17 71%	ICSI	1)10(48%) 2)10(59%)	1 (10TE- 15embriões) 10%
Chian, 1999	3 ciclos 17 oócitos	SOP	10000UIhCG	agulha calibre 17 lúmen único	TCM199	soro bo vino fetal, ácido pi ruvico, FSH+LH	24 ou 48h placas de cultivo	14(82, 5%)	ICSI	13(92, 8%)	4
De Vos, 1999	4716 oócitos de 896 ciclos convencionais que estavam em MI	Não descrita	GnRH, HMG, hCG	convencional p/ FIV	B2	Nenhum	4h microgota	1260(26, 7%)	ICSI	52, 7%	apenas 15TE de MIV 1 gestação6, 6%
Mikkelsen, 2000	1)37 2)40	Masculino/tuba	1)n=10 s/ FSH 2)n=10-150UI FSH por 3 dias	calibre 17 lúmen único	TCM199	Idem Smith	36hmicrogota	1)28(76%) 2)34(85%)	ICSI	1)23(82%) 2)26(76%)	1)3gestações 2)2gestações 15 e 10% p/ oócito20 e 25
Smith, 2000	55ciclos 308 oócitos 191 usados	Masculino/tuba	-	Trounson	TCM199	FSH, hCG17βE2piruvato penicilina G, estreptomicina sôro da paciente	1)28 ou 2)36hmicrogota	1)73% 2)77%	ICSI	1)72% 2)78%	1)20ET 1, 65/paciente 4 gestações 2)21ET 1, 76/paciente 4 gestações 125ET 11gestações 63 transferências 17, 4%
Mikkelsen2000avali ado ↑estradíol e↑de inibina A e resultados	75pacientes de 87ciclos 532oócitos 388 usados	Masculino/tuba	nenhum	Agulha de calibre 17Trounson	TCM199	FSH, hCG, 17βE2, piruvato penicilina G, estreptomicina, sôro da paciente	28 a 36hmicrogota	234(60, 3%)	ICSI	180(76, 9%)	11gestações 63 transferências 17, 4%

*Dom - dominante

ANEXO 5 - SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV V

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Cobo, 2000	16 pacientes 19 ciclos 1) 68 (70, 8%) 2) 44 (50, 5%) Total 112 (61, 1%) 5, 9 p/p	?	Nenhum	1) antes do folículo dominante atingir 10mm 2) folículo dominante >10mm agulhas de FIV convencionais Dia = 7+/-1, 6	M199	HSA, piruvatoFSHrec, EGF, hCG, estradiol	24 a 36h	51 (46, 4%)	ICSI	37 (72, 6%)	Não descrito
Grøndahl, 2000	18 pacientes * 86 doados p/ a pesquisa 5 pedidos por fixação		GnRH100UI/d FSH1º, 2º, 3º, d/ ciclo	7º - 9º dia	TCM199	piruvato, penicilina, estreptomicina, HSA*, esterol, ativador de meiose	1) 22h s/EAM 2) 22h c/EAM 3) 30h s/EAM 4) 30h c/EAM 5) 40h s/EAM 6) 40h c/EAM	1) 38% 2) 25% 3) 29% 4) 67% 5) 30% 6) 40%	Não descrito	Não descrito	Não descrito
Wu, 2000	tecido ovariano - de 59 pacientes 1) 21 a 30 2) 31 a 40 3) 41 a 50 216 oócitos		Nenhum	Não descrita a fase do ciclo	Ham's F10	soro de cordão,	32 a 120h	1) 33 / 82 40% 2) 17 / 69 24, 9% 3) 8 / 65 12, 3%	Não realizado	-	-
Suikkari, 2000	12 pacientes 136 oócitos 11, 3p/p 1) 67 2) 69	1) 6 s/SOP 2) 6 c/SOP	37, 5UI FSH fase lútea tardia até 2da fol. dom. atingir habitual 10mm retirado 2 a 5 dias antes da coleta	agulha calibre 17 pressão	TCM199	soro bovino fetal, FSH, LH, piruvato, penicilina, estreptomicina,	44h	1) 43/67 64% 2) 47/69 68%	ICSI	1) 31/34 72% 2) 27/47 57%	Todos embriões congelados 15 TEI gestação/ aborto 6, 6%

*HSA- albumina sérica humana

ANEXO 6- SUMÁRIO DE TRABALHOS RELEVANTES SOBRE MIV VI

Autor/Ano	Ciclos/Oócitos	Causa	Estímulo	Coleta	Meio	Suplemento	Tempo	Maturação	ICSI/FIV	Fertilização	Gravidez
Cha, 2000	94ciclos de 64pacientes 1280oócitos 13, 6 +/-7, 5 1139 usados	SOP	Nenhum	10° a 13° dia do ciclo ½ da pressão habitual	TCM 199 c/ sais de Earle	soro fetal bovino, gonadotrofinas de éguas grávidas, hCG, piruvato, pe nicilina e estreptomina	48h	708/1139 62, 2%	ICSI	481/708 67, 9%	85 TE 23 gestações 27,1% Implantação 29/41 86, 9%
Mikkelsen, 2001 retrospectivo	100pacientes13 2 coletas714 oócitos509 usados	Masculino/tuba	Nenhum	Folículo dominante c/ 10mm e endométrio c/ no mínimo 5mm agulha de lúmen único	TCM199	FSH, hCG piruvato, penicilina, estreptomina, estradiol e soro da paciente do dia da coleta	28 a 36h microgota	306 (60%)	ICSI	223(73%)	83 TE 15 gestações 18%