

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

YASMIN CRISTINA COSTA MACIEL

AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS APÓS A INJEÇÃO
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPEMATOZOIDE EM OÓCITOS EM METÁFASE I
DE MULHERES SUBMETIDAS À FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Belém
2017

YASMIN CRISTINA COSTA MACIEL

AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS APÓS A INJEÇÃO
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPEMATOZOIDE EM OÓCITOS EM METÁFASE I
DE MULHERES SUBMETIDAS À FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para a obtenção do grau em
Medicina pela Universidade Federal do
Pará.

Orientador: Profº Dr. João Paolo Bilibio

Belém
2017

YASMIN CRISTINA COSTA MACIEL

AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS APÓS A INJEÇÃO
INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPEMATOZOIDE EM OÓCITOS EM METÁFASE I
DE MULHERES SUBMETIDAS À FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina
pela Universidade Federal do Pará.

Banca Examinadora:

Orientador

Nome / Instituição

Nome/ Instituição

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar até aqui e proporcionar a realização deste sonho. Agradeço a Ele, também, pelas bênçãos e por sempre manter minha família unida e com saúde, assim, eles puderam me ajudar nesta jornada de seis anos de curso.

Aos meus familiares, que são o ponto de sustentação da minha vida nos períodos de dificuldade e são os que fazem meus momentos felizes valerem muito mais. Em especial meus pais, Giovanni e Alice (e mamãe Beth); meus irmãos, Giovanni Neto, Ana Clara, Maria Rita e Pedro Henrique; minhas avós, Rita e Maria da Conceição; minhas tias e tios, em especial, tia Berna, tio Orlando, tia Eliete, tio Nelson, tia Helena e tio Antônio Maria, tia Hely e tio Mauricio. Obrigada por tudo, vocês são a base fundamental de tudo que sou!

À Universidade Federal do Pará e à Faculdade de Medicina, que foram minha casa durante o curso. Agradeço pelo aprendizado e conhecimento adquirido com grandes mestres.

Ao meu orientador, professor João Bilibio, pelo suporte no tempo que lhe coube, pelas orientações, correções e pelo incentivo na realização deste trabalho. Ao Dr. Arivaldo Meireles, que me acolheu em sua clínica.

Aos meus amigos, próximos ou distantes, que fizeram parte destes seis anos de graduação, em especial, minha amiga Maísa Feitosa, que me ajudou desde o início deste trabalho, como se fosse minha dupla. Ao meu namorado, Matheus Lamartine, pelo companheirismo e amor, por dividir comigo esta jornada, ajudando sempre a me tornar uma pessoa melhor.

Aos pacientes, os quais foram imprescindíveis no meu crescimento pessoal e profissional. Sem eles, a realização deste sonho não seria possível. Espero retribuir, com amor e dedicação, o voto de confiança que foi dado a mim.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta vitória. Muito obrigada!

RESUMO

A fertilização *in vitro* (FIV) é um procedimento realizado para superar a infertilidade feminina e masculina. Durante a aspiração oocitária pode haver coleta de oócitos maduros, em metáfase II (MII), ou meioticamente imaturos, em metáfase I (MI). Estes, podem, espontaneamente, maturar *in vitro* para MII em poucas horas. Com o aumento da idade da mulher há uma diminuição da quantidade e qualidade de oócitos coletados. O aumento da taxa de gravidez está relacionado diretamente ao número de blastocistos obtidos no ciclo de FIV. **Objetivo:** Avaliar a taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MI. **Material e Métodos:** Estudo do tipo transversal. Foram selecionadas 164 pacientes com indicação para realizar FIV na Clínica Pronatus, durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016. **Resultados:** No total, 1467 oócitos foram fertilizados por ICSI, dos quais 1153 estavam em estágio MII e 314 em MI. Destes, 201 maturaram *in vitro* para MII (MI-MII) e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura. A idade média das pacientes foi de 35,6 anos. A taxa de maturação *in vitro* foi de 64,01%. A taxa de fertilização em oócitos MI foi a menor (31,9%), enquanto que os oócitos MII tiveram a melhor taxa (79,1%). A comparação da taxa de fertilização mostrou que os oócitos MI possuem uma chance 88% menor de formar embrião com 2 pró-núcleos em relação aos oócitos MII ($p < 0.001$). Notou-se que os embriões provenientes de MI têm a maior incidência de multinucleação e possuem um risco 2,63 vezes maior de apresentarem anormalidades de divisão celular em relação aos MII ($p = 0.008$). A taxa de formação de blastocistos foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII (36,4%), a taxa nos embriões de MI-MII foi de 11,4% e nos embriões de oócitos MI foi de 0,8%. O risco de oócitos MI não formarem blastocistos é de 99% em relação aos MII ($p < 0.001$). Ao correlacionar a idade com a obtenção de oócitos e com a formação de blastocistos, observou-se que a quantidade de oócitos MII diminui com o aumento da idade ($p = 0.002$) e que há queda na formação de blastocistos oriundos destes oócitos em pacientes acima de 40 anos ($p = 0.03$). **Conclusão:** A utilização de oócitos MI na FIV deve ser desencorajada, pois possuem baixo potencial de desenvolvimento embrionário e forma embriões de baixa qualidade, com taxa de formação de blastocisto menor que 1%. Entretanto, o uso de MI-MII pode ser estimulado nos ciclos de FIV como alternativa à baixa obtenção de oócitos MII em mulheres com idade avançada.

Palavras-chave: Blastocistos. Metáfase I. Fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

In vitro fertilization (IVF) is a procedure performed to overcome female and male infertility. During oocyte aspiration, it can occur retrieval of mature oocytes, in metaphase II (MII), or meiotically immature, in metaphase I (MI). These can spontaneously mature *in vitro* for MII within a few hours. As women age, there is a decrease in the quantity and quality of oocytes collected. The increase in pregnancy rate is directly related to the number of blastocysts obtained in the IVF cycle.

Objective: To evaluate blastocysts formation rates from MI oocytes. **Methods:** Cross-sectional study. A total of 164 patients were selected to perform IVF at the Pronatus Clinic from January 2013 to December 2016. **Results:** In total, 1467 oocytes were fertilized by ICSI, which 1153 were in the MII stage and 314 in the MI. Considering these 314 MI, 201 matured *in vitro* for MII (MI-MII) and 113 remained in the MI stage after 3 hours in culture. The mean age of the patients was 35.6 years. *In vitro* maturation rate was 64.01%. Fertilization rate in MI oocytes was the lowest (31.9%), while MII oocytes had the best rate (79.1%). The comparison of fertilization rate showed that MI oocytes have 88% lower chance of forming embryo with 2 pronuclei than MII oocytes ($p < 0.001$). It was noted that embryos from MI stage have the highest incidence of multinucleation and are 2.63 times more risk to have abnormalities of cell division in relation to MII ($p = 0.008$). The blastocyst formation rate was higher in embryos from MII oocytes (36.4%), MI-MII oocytes rate was 11.4% and embryos from MI oocytes was 0.8%. The risk of MI oocytes not forming a blastocyst is 99% in relation to the MII ($p < 0.001$). When correlating age with both oocyte retrieval and blastocyst formation, it was observed that the quantity of MII oocytes decreased with increasing age ($p = 0.002$) and there was a decrease in blastocysts formation from these oocytes in patients over 40 years ($p = 0.03$). **Conclusion:** The use of MI oocytes in IVF should be discouraged, since they have low potential for embryonic development and form embryos of low quality, with a rate of blastocyst formation of less than 1%. However, the use of *in vitro* matured MI for MII oocytes can be stimulated in IVF cycles, as an alternative to low obtaining MII oocytes in elderly women.

Keywords: Blastocysts. Metaphase I. *In vitro* fertilization.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH – *Anti-Mullerian Hormone* (Hormônio Anti- Mulleriano)

CFA – Contagem Folicular Antral

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – *Follicle Stimulating Hormone* (Hormônio Folículo Estimulante)

GnRH – *Gonadotrophin Releasing Hormone* (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas)

hCG – *Human Corionic Gonadotrophin* (Gonadotrofina Coriônica Humana)

hMG – *Human Menopausal Gonadotrophin* (Gonadotrofina Menopausal Humana)

ICSI – *Intracytoplasmic Sperm Injection* (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides)

LH – *Luteinizing Hormone* (Hormônio Luteinizante)

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II (MII maturado *in vivo*)

MI-MII – MI maturado *in vitro* para MII (MII maturado *in vitro*)

PGD – *Preimplantation Genetic Diagnosis* (Diagnóstico Gestacional Pré-implantacional)

PN – Pró-núcleo

rFSH – Hormônio Folículo Estimulante Recombinante

rhCG – Gonadotrofina Coriônica Humana Recombinante

SC – Subcutâneo

TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TRA – Técnicas de Reprodução Assistida

USG-TV – Untrassonografia Transvaginal

VG – Vesícula Germinativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 OBJETIVOS.....	9
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	9
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	10
2.2 INFERTILIDADE E AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA	10
2.3 ESTIMULAÇÃO OVARIANA	12
2.4 MATURAÇÃO FOLICULAR	12
2.5 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE.....	14
2.6 TRANSFERÊNCIA DO EMBRIÃO.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 TIPO DE ESTUDO	16
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	16
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	16
3.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	16
3.5 PROCEDIMENTOS	17
3.5.1 <i>Protocolo de Indução Ovariana</i>	17
3.5.2 <i>Procedimentos Laboratoriais e Tratamento dos Oócitos MI</i>	17
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3.7 ASPÉCTOS ÉTICOS	18
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO.....	25
6 CONCLUSÃO.....	30
7 REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A	36
ANEXO A	51

1 INTRODUÇÃO

A fertilização *in vitro* (FIV) é um procedimento realizado para tentar superar diversos tipos de infertilidade feminina e masculina. Ao longo do ciclo de FIV, com duração de, aproximadamente, duas semanas, ocorre as etapas de estimulação ovariana, aspiração de oócitos dos folículos ovarianos, fertilização no laboratório, seleção do embrião e sua transferência para a cavidade uterina (STEPTOE; EDWARDS, 1976).

Durante a aspiração oocitária pode haver coleta de oócitos maduros, em metáfase II (MII), ou meioticamente imaturos, em metáfase I (MI) e em vesícula germinativa (VG). A proporção dos óocitos imaturos coletados oscila entre 15 a 20% (CHA; CHAIN, 1998; SMITZ *et al.*, 2004). Além disso, os oócitos em estágio MI podem, espontaneamente, maturar *in vitro* para MII (MI-MII) em poucas horas (STRASSBURGER *et al.*, 2004).

Ainda não se sabe ao certo a explicação da não responsividade de alguns oócitos à estimulação ovariana, mas é possível que os diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos produzam um variado grau de maturação após a estimulação. Dessa forma, durante a aspiração são coletados oócitos de grupos heterogêneos de folículos (STOUFEER; ZELINSK-WOOTEN, 2004).

A resposta ovariana à estimulação é variável e depende fortemente da reserva ovariana de cada mulher. Com o aumento da idade há uma diminuição da quantidade e da qualidade de oócitos obtidos, portanto a idade é considerada o principal influenciador desta resposta (SU *et al.*, 2017). O aumento crescente de casais que buscam técnicas de reprodução assistida (TRA), bem como o número cada vez maior de mulheres acima de 40 anos que desejam uma nova ou a primeira gravidez, levam os especialistas da área a sempre estarem em busca de melhores resultados.

Sabe-se que o aumento da taxa de gravidez está relacionado diretamente ao número de embriões em estágio de blastocisto obtidos no ciclo de FIV, e este número depende da quantidade e qualidade dos oócitos MII coletados. Como a obtenção destes oócitos é inversamente proporcional à idade da paciente, se discute, como alternativa, o uso de oócitos MI para FIV, principalmente em casais com idade avançada. Portanto, é importante determinar se a fertilização de oócitos

imaturos, em estágio MI, pode aumentar a quantidade de embriões que cheguem ao estágio de blastocisto e, conseqüentemente, melhorar as chances de gravidez.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- 1) Avaliar a taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos em metáfase I.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Analisar e comparar a taxa de fertilização dos oócitos MI, MI-MII e MII;
- 2) Verificar e comparar a incidência de multinucleação embrionária dos oócitos MI, MI-MII e MII.
- 3) Analisar e comparar a taxa de formação de blastocistos dos oócitos MI, MI-MII e MII;
- 4) Correlacionar a taxa de formação de blastocistos de acordo com a faixa etária das mulheres;
- 5) Correlacionar a obtenção de oócitos MI, MI-MII e MII de acordo com a faixa etária das mulheres;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

As técnicas de reprodução assistida são utilizadas para o tratamento da infertilidade e consistem na manipulação dos gametas fora do corpo humano (TALAULIKAR; ARULKUMARAN, 2013). Abrange tanto a fertilização *in vitro*, quanto os procedimentos relacionados a ela, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), criopreservação, transferência de embriões congelados-descongelados, uso de gametas doados, barriga solidária, entre outros (ROSENWAKS, 2014).

O processo de FIV, método mais comum de reprodução assistida, envolve a indução da ovulação, aspiração oocitária, fertilização do oócito em laboratório, desenvolvimento embrionário e transferência para o útero (ALAN; CHERNEY, 1980). A ICSI começou a ser utilizada como uma alternativa para aumentar a taxa de sucesso da FIV e consiste na injeção de um único espermatozoide no citoplasma de um oócito maduro (ROSENWAKS, 2014).

Percebe-se um aumento crescente da procura por TRAs, principalmente após o nascimento da primeira criança como resultado desta técnica em 1978. Desde então, estima-se que um total de 5 milhões de bebês tenham nascido como fruto de reprodução assistida (TALAULIKAR; ARULKUMARAN, 2013). Com os avanços tecnológicos destas técnicas, somados à mudança sócio-econômica observada na sociedade, foi constatado que, aproximadamente, 50% dos casais inférteis serão encaminhados para tratamento por reprodução assistida (MAHMOUD; PUNUKOLLU; MAHMOOD, 2013).

2.2 INFERTILIDADE E AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA

Com eficácia estabelecida, a FIV tem sido disponibilizada para possibilitar gravidez em mulheres inférteis, uma vez que a taxa de nascidos vivos é significativamente maior em casais inférteis que se submetem às TRAs em relação aos que não se submetem (KÄLLÉN *et al.*, 2011). A infertilidade é definida como a incapacidade de um casal em conceber um filho após um ano mantendo regularmente relações sexuais desprotegidas (ONTARIO, 2006). Pode ser classificada como infertilidade primária, onde estão as mulheres que nunca

engravidaram, ou secundária, em que as mulheres já tiveram uma gestação prévia, com ou sem nascido vivo (PREVENTION, 2014).

Dentre as causas de infertilidade, pode-se destacar os fatores tubários, uterinos, fatores masculinos severos, diminuição da reserva ovariana, entre outros. A idade da mulher é o maior determinante da taxa sucesso da FIV, pois há um declínio da qualidade dos oócitos, da reserva ovariana e da função ovulatória (HUDDLESTON *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2017), portanto esse tratamento pode superar a infertilidade em mulheres jovens, mas não irá reverter o declínio da infertilidade em mulheres mais velhas (BAKER *et al.*, 2010; MALIZIA; HACKER; PENZIAS, 2009). Para exemplificar os dados citados acima, pesquisas recentes mostram que, entre as mulheres nuligestas, as quais têm o fator idade estreitamente correlacionado com a infertilidade, o percentual de infertilidade aumenta com o avanço da idade: 15-34 anos varia de 7-9%, entre 35-39 anos cerca de 25% e nas mulheres nuligestas com idade entre 40-44 anos esse percentual aumenta para 30% (PREVENTION, 2014).

A reserva ovariana representa o potencial funcional dos ovários através da qualidade e quantidade de oócitos disponíveis para recrutamento. A quantidade de folículos ovarianos é limitado e declina com o aumento da idade da mulher, até chegar na menopausa (SILVA; VILODRE, 2009). A redução da reserva ovariana pode ser avaliada indiretamente pela dosagem sérica de FSH (>12 UI/L) e de estradiol (<70 pg/ml) no 3º dia do ciclo menstrual. Mesmo que as dosagens estejam nos parâmetros normais podem não significar pacientes com maiores chances de gravidez (BUKMAN; HEINEMAN, 2001).

Outro preditor importante é a contagem de folículos antrais (CFA) e o volume ovariano através da ultrassonografia transvaginal (USG-TV). Contagem maior que 10 folículos ovarianos se correlaciona com boa resposta à indução no processo de FIV (BANCSI *et al.*, 2004). Além disso, considera-se a CFA um melhor marcador em prever má resposta ovariana quando comparada às dosagens de FSH e estradiol (SCHEFFER *et al.*, 2003).

A dosagem do hormônio anti-muleriano (AMH) é considerada um melhor marcador para avaliação da reserva ovariana em relação às dosagens de FSH, e está intimamente relacionada com a CFA (BROEKMANS *et al.*, 2006). O AMH é expressado pelas células da granulosa de folículos ovarianos em crescimento, possui a vantagem de variar pouco durante o ciclo menstrual, o que confere alta confiabilidade, sendo um excelente preditor da boa reserva ovariana e

correlacionando-se com a resposta ovariana à estimulação nos ciclos de FIV (MOHIYIDDEEN *et al.*, 2012).

2.3 ESTIMULAÇÃO OVARIANA

Como estratégia para aumentar as taxas de gravidez, a estimulação ovariana foi adotada. Assim, o desenvolvimento de múltiplos folículos gera múltiplos oócitos para serem aspirados, fertilizados e transferidos. Entretanto, a transferência de vários embriões de uma só vez pode ter como consequência o aumento de gestações múltiplas (INGERSLEV *et al.*, 2001).

Para realizar essa estimulação existem vários protocolos, sendo que os mais utilizados são o longo (agonista) e o curto (antagonista). No protocolo longo se inicia, na fase lútea do ciclo anterior, o uso de agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) por duas semanas, assim, o efeito estimulatório inicial do agonista é bloqueado pela secreção endógena de progesterona e estradiol. Para estimular o crescimento folicular, é utilizado gonadotrofina menopausal humana (hMG) e/ou hormônio folículo estimulante (FSH), enquanto o agonista GnRH é continuado em doses baixas para prevenir o pico precoce de secreção do hormônio luteinizante (LH) (VAN WELY *et al.*, 2003).

No que diz respeito ao protocolo curto, o antagonista GnRH é iniciado somente quando os folículos atingirem mais de 14 mm, geralmente no sexto dia do estímulo. O uso do antagonista resulta numa dessensibilização pituitária mais rápida e, de acordo com uma meta-análise, a sua utilização reduziu a incidência da síndrome de hiperestimulação ovariana em 60% em relação ao uso de um agonista GnRH (AL-INANY *et al.*, 2011).

Para iniciar a cascata ovulatória, dois ou mais folículos ovarianos precisam estar com diâmetro maior ou igual a 18 mm. Então, como gatilho da ovulação, é utilizado a gonadotrofina coriônica humana (hCG), recombinante ou urinária, ou agonista do GnRH e, como resultado, pode-se obter óvulos em estágio MII, MI e VG (AL-INANY *et al.*, 2005).

2.4 MATURAÇÃO FOLICULAR

Para entender melhor a maturação dos folículos é importante relembrar a ovogênese, processo de formação dos oócitos maduros, que se inicia antes do nascimento e é continuado durante a puberdade até a menopausa da mulher.

Durante a vida fetal, há uma proliferação mitótica de ovogônias para formar os oócitos primários, que iniciam sua divisão meiótica antes do nascimento, parando em prófase I (fase do diplóteno). Este, é a vesícula germinativa, que constitui os folículos primordiais presentes no ovário da mulher (MOORE; PERSAUD, 2008).

Após o nascimento, os oócitos primários (folículos primordiais) permanecem em repouso até a puberdade, onde a regulação hormonal promove a maturação gradativa destes folículos. Assim, têm-se oócitos em metáfase I quando, estes, não possuem corpúsculo polar e ainda são diploides, visto que não completaram a primeira divisão meiótica. Ao completar esta primeira divisão, os oócitos iniciam a meiose II e param em metáfase II, constituindo os oócitos secundários, que são haploides, com citoplasma abundante e com maturação do núcleo e do cumulus oophorus (células da granulosa que envolvem os oócitos). A presença do corpúsculo polar comprova que o oócito maturou e está em metáfase II. A segunda divisão meiótica só é completada após a fecundação (MOORE; PERSAUD, 2008).

Na FIV, após 34-36 horas da administração de hCG, é realizada a aspiração dos oócitos guiada por USG-TV, sob analgesia/anestesia (KWAN *et al.*, 2013). Essa etapa é importante, pois quanto maior o número de oócitos aspirados por ciclo de FIV, maior será a taxa de nascidos vivos pela técnica (SUNKARA *et al.*, 2011; STEWARD *et al.*, 2014).

A maturação folicular é de extrema importância para que os resultados da FIV tenham sucesso, gerando embriões viáveis para a implantação. Os oócitos em VG e MI ainda são imaturos morfológicamente para garantir a formação de embriões de qualidade. Como o recrutamento folicular no ciclo de FIV é feito de maneira anacrônica, os oócitos podem estar em fases distintas de maturação (CAMARGOS *et al.*, 2007). Ainda não se sabe o porquê da não responsividade destes ao gatilho de maturação, mas pode ser devido aos diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos durante o período de estimulação, à aspiração de folículos antrais menores, às características da paciente e ao tipo de protocolo utilizado (STOUFFER; ZELINSK-WOOTEN, 2004; TRIWITAYAKORN *et al.*, 2003).

Os oócitos em estágio MI podem alcançar espontaneamente, em poucas horas, a maturação meiótica *in vitro* para o estágio MII (MIII maturado *in vitro*), porém geralmente não são utilizados. Esse fato é atribuído à diversas pesquisas que relatam menores taxas de fertilização e de implantação dos oócitos MII maturados *in vitro* em relação aos maturados *in vivo* (STRASSBURGER *et al.*, 2004; ALCOBA *et*

al., 2013). Apesar disso, após a primeira descrição de um oócito humano ter sido maturado *in vitro* (EDWARDS, 1965), o interesse sobre o procedimento aumentou devido à possibilidade de aumentar também o números de oócitos disponíveis para fertilização, tranferência e criopreservação (SON; LEE; LIM, 2005).

Logo, quando a quantidade de oócitos MII aspirados for pequena, em consequência da baixa resposta da paciente à estimulação ovariana, o uso de oócitos MI maturados *in vitro* pode ser cogitada. A classificação utilizada para identificar que a mulheres seja pouco responsiva depende da quantidade de oócitos retirado e varia de acordo com o autor, podendo ser ser menor ou igual a 4, menor que 5 ou menor ou igual a 6, sem distinguir o estágio de maturidade (FABER *et al.*, 1998; DE SUTTER; DHONT, 2003; MORENO *et al.*, 1998).

2.5 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE

Para deflagrar o processo de fertilização, é necessário misturar o espermatozoide e o oócito maduro em um meio de cultura (HUANG *et al.*, 2013). Entretanto, 4 a 16% das fertilizações podem falhar e, provavelmente, essa falha vai ser recorrente nos outros ciclos de FIV em aproximadamente 30%. Para superar essas falhas e aumentar as taxas de gravidez em casais com fatores severos de infertilidade masculina, é realizado ICSI (MOLLOY *et al.*, 1991).

A fertilização é confirmada quando há a formação de dois prónucleos (2pn) no zigoto após, aproximadamente, 17 horas da ICSI, representando a taxa de fertilização. Após essa etapa, os blastômeros começam a se dividir e em 72 horas o embrião possui cerca de 8 células. Entre o dia 2 e o dia 4 o embrião está em estágio de clivagem e, no quinto dia (D5), ele alcança o estágio de blastocisto. A implantação do embrião no útero é esperada no dia 7, portanto, a transferência para a cavidade uterina deve ocorrer antes desse período (BOISO *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que pode haver falha na fertilização após a ICSI, sendo considerada anormal quando não há formação de 2pn e há ausência do segundo corpúsculo polar. A multinucleação embrionária, formação de 3 ou mais pró-núcleos (3PN) é uma anormalidade que acomete mais oócitos imaturos, evidenciando a melhor performance dos oócitos MII para desenvolver-se adequadamente do ponto de vista embriológico. Mulheres inférteis podem apresentar, entre outros problemas, alteração na maturação dos oócitos, resultando em uma maior porcentagem de multinucleação. Além disso, esta anormalidade também está relacionada ao baixo

potencial de implantação do embrião na cavidade uterina (DE VICENTIIS; DE MARTINO; BUFFONE, 2013).

2.6 TRANSFERÊNCIA DO EMBRIÃO

A transferência do embrião pode ser feita no dia 3 (D3) ou no dia 5. As vantagens de esperar o estágio de blastocisto para a transferência é permitir a seleção de embriões de melhor qualidade, visto que o sucesso da transferência está intimamente relacionado a este fator, e transferir no tempo em que o embrião fertilizado *in vivo* alcançaria a cavidade uterina, bem como diminuir a taxa de gravidez múltipla (GLUJOVSKY *et al.*, 2012). Além disso, é possível realizar o diagnóstico genético pré-implantacional em embriões no D3 e esperar a análise do blastômero biopsiado nessa técnica para, então, transferir no D5 (MEDICINE, 2004).

Embriões no estágio de clivagem possuem uma taxa de implantação baixa, quando comparados aos embriões D5. Devido a isso, as clínicas optam por transferir mais de um embrião D3 a fim de obter melhores taxas de gravidez (DAVID *et al.*, 1998). O Conselho Federal de Medicina preconiza, segundo a resolução de 2013, que o número máximo de embriões transferidos para a receptora tem que ser, no máximo, quatro. E nas recomendações a serem seguidas para transferência têm-se que: a) mulheres com até 35 anos: até 2 embriões; b) mulheres entre 36 e 39 anos: até 3 embriões; c) mulheres entre 40 e 50 anos: até 4 embriões; d) nas situações de doação de óvulos e embriões, considera-se a idade da doadora no momento da coleta dos óvulos (MEDICINA, 2013). Dessa forma, pode-se observar que a transferência em D3 aumentaria a chance de gravidez múltipla, quando relacionado ao D5. Além disso, as tubas uterinas e o útero fornecem ambientes nutricionais distintos para o embrião, assim sendo, no dia 3 o embrião formado *in vivo* estaria na tuba uterina e não no útero. Este fato compromete o desenvolvimento e a viabilidade do embrião transferido em estágio de clivagem para a cavidade uterina (GLUJOVSKY *et al.*, 2012).

Portanto, é desejável que a transferência seja realizada com o embrião em um estágio mais avançado, em que o desenvolvimento seria favorável, resultando em taxas de implantação mais elevadas (DAVID *et al.*, 1998; BLAKE *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo transversal com análise de prontuário de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* por injeção intracitoplasmática de espermatozoides, durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram selecionadas um total de 164 pacientes e 1467 oócitos foram fertilizados por ICSI, dos quais 1153 estavam em estágio MII e 314 em estágio MI. Destes, 201 maturaram *in vitro* para MII (MI-MII) e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura embrionária equilibrada “single step” (Global Total, Irvine Scientific). Para correlacionar a idade das mulheres com a obtenção de oócitos em diferentes estágios de maturação e com a formação de blastocistos, a faixa etária foi dividida em: ≤ 34 anos, entre 35-39 anos e ≥ 40 anos. Todas as pacientes tiveram diagnóstico de infertilidade conjugal e indicação para realizar fertilização *in vitro* no Centro de Medicina Reprodutiva Pró Social e Clínica Pronatus em Belém, Pará, Brasil.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Mulheres com idade entre 18 e 45 anos que tenham obtido pelo menos um oócito em estágio MI fertilizado por ICSI, no Centro de Medicina Reprodutiva Pró Social e Clínica Pronatus, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016.

3.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Pacientes que não preencheram os critérios de inclusão; pacientes que realizaram quimioterapia ou radioterapia; casais que realizaram FIV por fator masculino severo e/ou que necessitaram fazer punção de epidídimo e/ou biopsia testicular para obtenção de espermatozoides.

3.5 PROCEDIMENTOS

3.5.1 Protocolo de Indução Ovariana

No protocolo de estimulação ovariana é incluído FSH recombinante (rFSH), antagonistas e recombinante da gonadotrofina coriônica humana (rhCG). Todas as pacientes foram submetidas a uma contagem de folículos antrais no dia 3 do ciclo menstrual e também dosagem de FSH, LH e estradiol. Tratamento com rFSH (Puregon-Organon) era, então, iniciado com doses diárias de d1 200UI, d2 200UI, d3 200 UI, d4 e d5 150 UI. No sexto dia, a USG-TV foi repetida e, a partir deste dia, a cada dois dias. A dose rFSH foi perfeitamente ajustada com base nos resultados de USG, até os folículos atingirem tamanho maior que 17mm, em relação ao número e tamanho dos folículos em desenvolvimento. O GnRH, Orgalutran (Organon 0,25mg/d), foi administrado por via subcutânea (SC) com ciclo de injeção diariamente desde o momento que os folículos atingiram 14mm, até a administração de rhCG (Ovidrel 250mcg, Serono). O rhCG foi administrado quando os folículos atingiram tamanho maior que 17mm, como gatilho de maturação oocitária. A recuperação dos oócitos foi guiada por USG-TV, realizada após 35 horas da administração do rhCG.

3.5.2 Procedimentos Laboratoriais e Tratamento dos Oócitos MI

Às 0 horas os oócitos são recolhidos e, à medida em que os oócitos, ainda com as células do cumulus, são localizados em meio ao líquido folicular, os mesmos são transferidos para uma placa contendo meio de cultura tamponado HAM (Modified HAM's F10, Irvine Scientific) coberto por óleo mineral (Light Oil – Irvine Scientific). Após o rastreamento, todos os oócitos são imediatamente submetidos a uma solução pura de 100µL de hialuronidase (Ingase – solução enzima hialuronidase - 80 IU/ml, Ingamed) por 45s a 1minuto para a remoção das células do cumulus. Em seguida todos os oócitos são transferidos para uma placa com meio de cultura tamponado e suplementado MHM-c (Multipurpose Handling Medium Complete, Irvine Scientific) coberto por óleo mineral, para a remoção mecânica das células da Corona.

Terminada a remoção total das células da Corona, realiza-se em lupa a classificação da maturação oocitária segundo a presença do primeiro corpúsculo polar (MII), ausência de corpúsculo polar (MI) e presença de vesícula germinativa

(VG). Após a classificação e contagem dos oócitos, somente aqueles classificados como MII e MI são transferidos para uma placa com meio de cultura embrionária equilibrada “single step” (Global Total, Irvine Scientific), onde ficarão incubados pós-denudação por até 3h. Determinou-se o prazo máximo de 3h como o limite de incubação para a estabilização dos oócitos maduros MII, assim como tempo limite de maturação *in vitro* dos Imaturos MI, antes da realização da ICSI dos mesmos.

Os oócitos MI foram injetados independentemente de terem apresentado maturação *in vitro* após as 3h de incubação. Em casos de congelamento total de oócitos para uso posterior, os oócitos MII e MI foram congelados em até 2h após a punção folicular, independentemente dos MI terem apresentado maturação *in vitro*. Os MI foram congelados mesmo sem maturação por apresentarem capacidade de maturação no pós-descongelamento em alguns casos.

Para proceder com a ICSI, o parceiro do sexo masculino já teria apresentado a sua amostra de sêmen antes do processo de recuperação de oócitos, após um período de abstinência de 2 a 5 dias. Os espermatozóides são preparados por *swim-up* ou método de dupla centrifugação em gradiente.

A taxa de falha na fertilização foi considerada quando o embrião apresentou outro valor que não 2 pró-núcleos, desconsiderando os embriões degenerados e os não fertilizados.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se os testes de Qui-quadrado. Variáveis contínuas foram analisadas utilizando-se Anova e realizado, quando $p < 0.05$, teste de POST HOC BONFERRONI. Associações foram feitas com teste de Spearman ou regressão logística. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 23.0 para tabulação e análise dos dados.

3.7 ASPÉCTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi realizada em compromisso com a confidencialidade, privacidade e proteção da imagem dos pacientes analisados. As informações foram coletadas de forma anônima em prontuários e os resultados foram apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação dos participantes. Devido a isso, foi

dispensado o uso do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O patrocinador principal desta pesquisa é o Centro Especializado em Medicina de Reprodução Humana LTDA – PRONATUS. A coleta e posterior análise do banco de dados só foi realizada após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, parecer nº 2.170.871.

4 RESULTADOS

Nas características do grupo estudado, conforme descrito na tabela 1, identifica-se um total de 164 pacientes avaliadas. Ao observar a idade das mulheres, tem-se que a média é de 35,6 anos. O tempo de infertilidade apresentado é de 5,6 anos em média. E, em relação à idade das mulheres na menarca, a média foi de 12 anos.

Além disso, pode-se observar que o número total de oócitos obtidos e fertilizados através de ICSI foi de 1467. Destes, 1153 foram obtidos em estágio MII, 314 em estágio MI, no qual 201 maturaram *in vitro* para MII e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura. Assim, a taxa de maturação *in vitro* é de 64,01%, conforme descrito na tabela 1.

TABELA 1 – PERFIL DA AMOSTRA

ITEM	M $\pm$ DP ou N (%) [*]
Total de Pacientes	n = 164
Idade	35,6 $\pm$ 4,2
Tempo de Infertilidade (anos)	5,6 $\pm$ 5,1
Menarca	12 $\pm$ 1,5
Total de Oócitos Avaliados ^{**}	1467 (100%)
MII	1153 (78,6%)
MI total	314 (21,4%)
MI não maturado	113 (7,7%)
MI-MII	201 (13,7%)
Taxa de Maturação	64,01%

^{*}M: média; DP: desvio padrão; N: número

^{**}MII: metáfase II; MI: Metáfase I; MI-MII: MII maturado *in vitro*

Em relação à taxa de fertilização, considerada adequada quando há a formação de 2 pró-núcleos no primeiro dia, pode-se observar, na tabela 2, que os oócitos MI não maturados possuem a menor taxa de fertilização (31,9%), representando, aproximadamente, metade da taxa dos MI que maturaram *in vitro*

para MII (60,2%). Os oócitos MII apresentaram a melhor taxa de fertilização dentre os estágios analisados, com 79,1%.

TABELA 2 – TAXA DE FERTILIZAÇÃO

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de oócitos	2pn (%)	Falha (%)	OR (IC 95%)*	p-value ^d
MI	1153	912 (79,1%)	241 (20,9%)	0,12 (0,081-0,189)	<0.001 ^a
MI	113	36 (31,9%)	77 (68,1%)	0,40 (0,292-0,555)	<0.001 ^b
MI-MII	201	121 (60,2%)	80 (39,8%)	3,25 (1,993-5,301)	<0.001 ^c

*OR: odds-ratio; IC: intervalo de confiança 95%

^aComparação MII x MI

^bComparação MII x MI-MII

^cComparação MI x MI-MII

^dAnova (POST HOC BONFERRONI)

A obtenção de embrião com 1pn ou $\geq$ 3pn foi considerada como falha na fertilização. Assim, encontrou-se que a porcentagem de falha no estágio MI (68,1%) foi maior que três vezes a porcentagem para os oócitos em estágio MII (20,9%). A falha na fertilização dos MII maturados *in vitro* (MI-MII) é cerca de duas vezes maior que os MII maturados *in vivo* (39,8% e 20,9%, respectivamente). Portanto, ao analisar a tabela 2, observa-se que os oócitos MII, além de possuírem a melhor taxa de fertilização, têm também o menor índice de falhas neste processo.

Quando se faz a comparação estatística da taxa de fertilização entre os grupos, conforme a tabela 2, percebe-se que, ao realizar a FIV, os oócitos MI tem uma chance 88% menor de formar um embrião com 2 pró-núcleos em relação aos oócitos MII. Na correlação de oócitos MII maturados *in vivo* com os maturados *in vitro*, os MI-MII têm uma chance 60% menor de fertilização adequada. E, por fim, na comparação entre os oócitos imaturos, nota-se que os MI-MII têm uma chance 3,25 vezes maior de formar embrião com 2 pró-núcleos quando comparado aos oócitos MI.

A tabela 3 ilustra a incidência de multinucleação nos embriões, na qual se observa que aqueles provenientes de oócitos MI tem a maior porcentagem de multinucleação e possui um risco 2,63 vezes maior de apresentar anormalidade de divisão nuclear em relação aos embriões oriundos de oócitos MII, com

relevância estatística ($p=0.008$). Os oócitos MI-MII tiveram uma incidência de multinucleação maior que oócitos MII, porém na análise estatística não apresentou relevância significativa ($p>0.05$).

TABELA 3 – INCIDÊNCIA DE MULTINUCLEAÇÃO EMBRIONÁRIA

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de oócitos	3pn ou mais (%)	OR (IC 95%)	p-value ^c
MII	1153	3.55%	-	-
MI	113	8.84%	2.63 (1.28-5.41)	0.008 ^a
MI-MII	201	5.47%	1.57 (0.79-3.10)	0.195 ^b

^aComparação MII x MI

^bComparação MII x MI-MII

^c Pearson correlation

Na tabela 4, observa-se que a taxa de formação de blastocisto foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII, com taxa total de 36,4%, sendo que, 74,5% destes formaram em D5 e 25,5% formaram no dia 6 (D6). A menor taxa de formação foi do oócito MI, com apenas um blastocisto formado em D6, totalizando 0,8% do total de oócitos MI que foram fertilizados com ICSI. Já os oócitos MI-MII tiveram uma taxa de formação de 11,4%, superando os oócitos MI, porém inferior a um terço da taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MII.

TABELA 4 – TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS EM RELAÇÃO À MATURAÇÃO DO OÓCITO

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de Oócitos	Blastocistos	D5*	D6*	OR (IC 95%)	p-value ^c
MII	1153	420 (36,4%)	313 (74,5%)	107 (25,5%)	-	-
MI	113	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0.01 (0.003-0.082)	<0.001 ^a
MI-MII	201	23 (11,4%)	16 (69,6%)	7 (30,4%)	0.22 (0.144-0.354)	<0.001 ^b

*D5: dia 5; D6: dia 6

^aComparação MII x MI

^bComparação MII x MI-MII

^cAnova (POST HOC BONFERRONI)

Além disso, através da tabela 4, pode-se afirmar que o risco de oócitos MI não formarem blastocisto é, aproximadamente, 99% em relação aos oócitos em

estágio MII. E, em relação aos oócitos MII maturados *in vitro*, a chance de não formar blastocistos é de 78% quando comparados aos MII maturados *in vivo*. Ambos os resultados com relevância estatística ($p < 0.001$).

Ao analisar a idade com a obtenção de oócitos em diferentes estágios de maturação, de acordo com a tabela 5, percebe-se que a quantidade de oócitos coletados em estágio MII diminui com o aumento da idade ($p = 0.002$). Entretanto, quando se relaciona a idade com a obtenção de oócitos imaturos, apesar dos números de MI e MI-MII diminuírem com avanço da idade, o valor não é estatisticamente significativo ($p = 0.209$ e $p = 0,62$, respectivamente). Logo, pode-se afirmar que a obtenção de oócitos imaturos não se alterou com o aumento da idade da mulher.

TABELA 5 – ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	IDADE			p-value ^a
	≤ 34 anos*	35-39 anos*	≥ 40 anos*	
MI	1,08 (0,73-1,43)	0,93 (0,67-1,18)	0,57 (0,22-0,21)	0.209
MI-MII	1,31 (1,01-1,60)	1,17 (0,94-1,40)	1,39 (0,86-1,92)	0.620
II	9,46 (8,04-10,87)	7,04 (6,28-7,80)	6,78 (5,53-8,03)	0.002

^aAnova (POST HOC BONFERRONI)

*Valores demonstrados na tabela: OR (IC 95%)

Da mesma forma, quando se relaciona a idade da paciente com a formação de blastocisto oriundo de oócito MI-MII, nota-se que a idade não tem influência na taxa de formação de blastocistos destes oócitos ($p = 0.128$), como descrito na tabela 6. Diferente do observado na relação entre idade e formação de blastocisto proveniente de oócitos MII, em que há relevância significativa, demonstrando uma queda na formação de blastocistos oriundos destes oócitos em pacientes acima de 40 anos ($p = 0.03$).

TABELA 6 –TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS	IDADE			p-value ^a
	≤ 34 anos*	35-39 anos*	≥ 40 anos*	
MII	2,85 (2,61-3,01)	2,51 (2,34-2,73)	1,87 (1,71-1,94)	0,03
MI-MII	0,1 (0,01-0,19)	0,2 (0,11-0,28)	0,04 (0,05-0,13)	0,128

^aAnova (POST HOC BONFERRONI)

*Valores demonstrados na tabela: OR (IC 95%)

5 DISCUSSÃO

Na rotina de técnica de reprodução assistida, apesar do uso da estimulação ovariana e do hCG como gatilho para maturação folicular final, nem todos os oócitos recrutados alcançam o estágio de metáfase II. Além disso, alguns destes oócitos maturados *in vivo* não possuem desenvolvimento embrionário esperado para o seu estágio de maturação (BALAKIER *et al.*, 2004). Os gametas coletados ainda imaturos, em metáfase I, são observados principalmente em casos de paciente com pobre resposta e baixa reserva ovariana (STRASSBURGER *et al.*, 2004; VANHOUTTE *et al.*, 2005). Nestes casos, a maturação *in vitro* (IVM) dos oócitos MI para MII é utilizada para aumentar a taxa de fertilização. Strassburger *et al.* (2004) mostraram que a injeção de oócitos MII maturados *in vitro* após 4 horas da coleta possui uma taxa de fertilização maior quando comparado com oócitos MI que foram fertilizados logo após a denudação.

No presente estudo, o tempo de maturação *in vitro* de MI para MII foi de 3 horas, levando a uma taxa de IVM de 64,01% em relação ao total de oócitos MI coletados. Pesquisas têm demonstrado que a taxa de maturação *in vitro* varia de 16,4% a 88,3% e aumenta com o prolongamento do período que o oócito permanece no meio de cultura (CHEN *et al.*, 2000). Em relação ao tempo de incubação, Strassburger *et al.* (2004) encontraram que 13% dos oócitos MI maturaram dentro de 1 hora e que outros 41% maturaram dentro de 2,5 horas, mostrando que a maioria dos oócitos MI (54%) maturaram *in vitro* para MII após 2,5 horas de incubação.

Em seu estudo, Alvarez *et al.* (2013) afirmaram que o oócito imaturo precisa de 2-6 horas para completar a sua maturação *in vitro*. Além disso, concluíram que os oócitos imaturos de mulheres submetidas ao ciclo de FIV podem ser maturados, fertilizados por ICSI e passarem por estágio de clivagem *in vitro*, sendo capazes de produzir gravidez e darem vida a uma criança. Porém, afirma que a performance destes oócitos, no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário, é reduzida quando comparado aos oócitos MII.

Ao avaliar a taxa de fertilização, foi encontrado nesta pesquisa que os oócitos MI apresentaram a menor taxa de fertilização (31,9%) em relação aos outros estágios analisados, enquanto que, os oócitos MII apresentaram a melhor taxa, com 79,1%. Quanto aos oócitos MI-MII, a taxa de fertilização foi 60,2%. A

baixa taxa de fertilização em oócitos imaturos é relatada por diversos estudos, sendo que, em oócitos MI, a taxa de fertilização tem se mostrado inferior aos oócitos MI que maturaram *in vitro* para MII (ALCOBA *et al.*, 2013; STRASSBURGER *et al.*, 2004; DE VICENTIIS; MARTINO; BUFFONE, 2013; VANHOUTTE *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2013; SHU *et al.*, 2007).

Percebe-se, com os resultados deste estudo, que a maturação do oócito tem influência direta na taxa de fertilização. De Vos *et al.* (1999) corroboram com estes achados quando afirmam em seu estudo que a taxa de fertilização de oócitos MII maturados *in vivo* (70,8%) é maior que em oócitos MII maturados *in vitro* (52,7%), com relevância estatística ($p < 0.001$). Todavia, alguns estudos não encontraram esta associação, como o de Alcoba *et al.* (2013), mostrando que a taxa de fertilização de oócitos MII (74,5%) não teve diferença estatística em relação a taxa de oócitos MI-MII (68,2%), $p = 0.336$. O aumento da taxa de fertilização nos oócitos MI-MII em relação aos MI não maturados parece estar relacionado com o fato de que, estes últimos, podem não formar fuso durante a divisão celular (WINDT *et al.*, 2001; LEVRAN *et al.*, 2002) ou ter uma falha para entrar em metáfase (HARTSHONE *et al.*, 1999).

Ao analisar as taxas de fertilização entres os diferentes estágios de maturação, observa-se que os oócitos MI-MII têm 60% menos chances de formar um embrião com 2 pró-núcleos do que aqueles em estágio MII, enquanto os MI têm 88% menos chances em relação aos oócitos MII. Além disso, ao se comparar os oócitos imaturos (MI x MI-MII), nota-se uma chance 3,25 vezes maior de MI-MII ter sucesso na fertilização. Os oócitos que não apresentam 2 pró-núcleos no primeiro dia após ICSI são considerados como tendo falha na fertilização. No presente estudo, foi encontrado que a taxa de falha é maior em oócitos imaturos (MI=68,1% e MI-MII=39,8%) quando comparados aos MII (20,9%). Assim, este resultado sugere que os oócitos MII possuem melhor desenvolvimento embrionário em relação aos oócitos imaturos.

Durante a fase de crescimento, os oócitos acumulam proteínas e RNAs para completar a divisão meiótica e manter a homeostase celular. Qualquer alteração nesse processo pode acarretar no atraso e falha do desenvolvimento embrionário (TROUNSON; ANDERIESZ; JONES, 2001). A multinucleação tem sido associada negativamente com esse desenvolvimento e com os desfechos de gravidez. Esta anormalidade nuclear tem origem na deficiência de maturação embrionária que

produz defeitos de fuso, fragmentação nuclear ou defeito de migração na anáfase da divisão mitótica (SANFINS *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2001) e Eichenlaub-Ritter *et al.* (2002), relatam que oócitos com ausência de fuso no momento da ICSI têm um potencial de desenvolvimento menor quando comparado a oócitos que possuem fuso. Como resultado, sugerem que um embrião morfologicamente normal oriundo de MI tem uma taxa de implantação reduzida devido a anormalidades cromossômicas frequentes. Ao avaliar oócitos MI-MII, estudos perceberam que a maturação nuclear ocorre antes do citoplasma completar sua maturidade total, implicando em defeitos de organização citoplasmática e do citoesqueleto, alterando a morfogênese do fuso meiótico e resultando em embriões com desorganização nuclear ou anormalidades cromossômicas (NOGUEIRA *et al.*, 2000; SANFINS *et al.*, 2004).

A avaliação da incidência de multinucleação feita neste estudo permite constatar que os embriões derivados de oócitos MI têm maior incidência desta alteração (8,84%) em relação aos outros estágios (MI-MII=5,47% e MII=3,55%). Ao comparar os estágios de maturação com a multinucleação, observou-se que o embrião proveniente de MI tem um risco de 2,63 vezes maior de apresentar anormalidades de divisão celular em relação aos embriões oriundos de MII. Strassburger *et al.* (2004) concordam com nossos resultados quando reportam que a multinucleação de oócitos MI foi maior que oócitos MII e MI-MII (10% vs. 4%), porém relata que não houve diferença entre MII maturados *in vitro* e MII maturados *in vivo*, ambos têm incidência de multinucleação de 4%.

De Vicentiis *et al.* (2013) utilizaram em seu estudo 3 subgrupos para relacionar oócitos maturados *in vitro* com a incidência de multinucleação: a) utilizou o próprio gameta; b) utilizou oócitos doados; c) utilizou espermatozoado doado. Como resultado, afirmou que a multinucleação embrionária está associada ao embrião com baixo potencial de implantação e a frequência é mais observada em embriões derivados de oócitos em estágio MI. No grupo “a” foi demonstrado que a multinucleação em MII foi de 8,5%, MI-MII de 22,6% e MI de 35,9% ($p < 0.0001$), corroborando com nosso resultado. Além disso, a incidência de multinucleação não está correlacionada com a origem dos gametas que foram usados para ICSI, isto quer dizer que, a utilização de gametas doados não modificou o fato de que a imaturidade do oócito é o que aumenta a incidência de multinucleação.

Observou-se nesta pesquisa que a taxa de formação de blastocisto foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII (36,4%), e a menor taxa foi encontrada nos embriões oriundos de MI (0,8%). Já em oócitos MI-MII obteve-se taxa de 11,4%. Um estudo que analisou 214 ciclos de FIV, obteve 2401 oócitos, sendo 73% em estágio MII, 20% em estágio MI e 7% em VG, a taxa de IVM de MI para MII foi cerca de 54% e a taxa de formação de blastocisto proveniente destes oócitos MI-MII foi de 16,7%, sendo inferior a um terço da taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MII que foi de 52%, $p < 0.05$ (SHU *et al.*, 2007), corroborando com os resultados demonstrados neste trabalho.

De Vos *et al.* (1999) e Alcoba *et al.* (2013) não avaliaram blastocistos em seus trabalhos, porém utilizaram a taxa de clivagem em D2 e D3 e mostraram que esta taxa era semelhante em embriões de MII e nos embriões de MI-MII, aproximadamente 80%, confirmando que os oócitos maturados *in vitro* também têm habilidade de gerar embriões de boa qualidade. Entretanto, sabe-se que embriões com 2-3 dias de vida ainda não podem ser adequadamente avaliados em relação a sua qualidade e que a transferência destes embriões está em desuso. Strassburger *et al.* (2004) apresentam valores diferentes em seus resultados, no qual a taxa de clivagem foi similar entre MI e MII (ambos 95%), mas significativamente baixa nos MI-MII (86%), com $p < 0.01$.

Assim, pode-se observar que, embora taxa de clivagem seja similar entre embriões derivados de oócitos MII maturados *in vivo* e *in vitro*, como descrito nos trabalhos citados acima, os resultados do presente estudo afirmam que a porcentagem dos embriões oriundos de MI-MII que se desenvolvem até blastocisto é, significativamente, menor que a taxa de formação de blastocistos oriundos de MII e possui uma chance de 78% de não formar blastocistos. Além disso, é demonstrado que os oócitos MI possuem taxa de formação de blastocisto menor que 1% com a chance de não formar blastocistos de, aproximadamente, 99%. Portanto, os oócitos MI que não maturaram *in vitro* apresentam baixo potencial de desenvolvimento para o estágio de blastocisto.

Ao relacionar a idade das pacientes com a formação de blastocistos, foi demonstrado que, em pacientes acima de 40 anos, há uma queda na formação de blastocistos proveniente de oócitos MII ($p = 0.03$). Ademais, observou-se que o aumento da idade da mulher leva a uma menor obtenção destes oócitos ($p = 0.002$). Su *et al.* (2017) ressaltam a relevância da idade da mulher no sucesso

da FIV, afirmando em seu trabalho que o grupo de mulheres com menos de 40 anos obteve desfechos clínicos mais favoráveis em relação ao grupo de mulheres mais velhas (≥ 40 anos), resultando em maiores taxas de transferência embrionária, de implantação e de gravidez. Dessa forma, a idade avançada da mulher mostra-se como o fator de maior importância para o prognóstico da FIV, uma vez que acarreta na diminuição da quantidade de oócitos e da qualidade embrionária.

A relação da idade e da formação de blastocistos oriundos de MI-MII não teve relevância estatística ($p=0.128$), bem como a relação da idade com a obtenção de oócitos imaturos, MI e MI-MII ($p=0.209$ e $p=0.62$, respectivamente). Assim, podemos concluir que a idade não mostrou influência na obtenção e na taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos imaturos.

Diante destes resultados, a utilização de oócitos MI-MII pode ter de uma singular importância em mulheres com idade avançada que buscam a FIV como forma de superar a infertilidade, pois, apesar de apresentarem menor taxa de formação de blastocistos e maior incidência de multinucleação que os oócitos MII, os oócitos MI-MII ainda são capazes de proporcionar embriões blastocistos de boa qualidade. Por outro lado, oócitos MI que não maturaram *in vitro* não devem ser utilizados, visto que a taxa de formação de blastocistos é, aproximadamente, zero e de baixa qualidade, podendo acarretar em riscos genéticos a embriões oriundos destes oócitos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho poderão auxiliar na conduta frente ao casal infértil que necessita de fertilização *in vitro* para engravidar. Foi possível retirar muitas dúvidas que ainda existiam sobre a utilização de oócitos MI para fins de FIV.

Os oócitos MI que não maturaram *in vitro* apresentam uma chance de apenas 0,8% de formar blastocistos, possuem reduzida taxa de fertilização, alto índice de falhas neste processo e alta incidência de multinucleação embrionária. Assim, estes oócitos possuem um baixo potencial de desenvolvimento embrionário e formam embriões de baixa qualidade, corroborando com estudos já realizados sobre o tema. Portanto, a utilização de oócitos MI em ciclos de FIV não se justifica e deve ser desencorajada.

Por outro lado, a utilização de oócitos MI-MII pode aumentar a quantidade de blastocistos disponíveis para transferência embrionária, embora tenha se observado que a taxa de formação de blastocistos oriundos destes oócitos é, significativamente, menor que as de oócitos MII. Apesar disto, os oócitos MI-MII apresentam melhores taxas de fertilização, de formação de blastocistos e menores índices de multinucleação embrionária quando comparados aos MI não maturados. Ao analisar a taxa de formação de blastocistos em mulheres com idade avançada (acima de 40 anos), as quais possuem baixa reserva ovariana e menor obtenção de oócitos MII, a utilização de oócitos MI-MII pode ser considerada, visto que, tanto a obtenção destes oócitos, quanto a formação de blastocistos oriundos dos mesmos, não demonstraram ter correlação estatística com o aumento da idade.

Indiscutivelmente os oócitos MII tiveram o melhor desempenho em todos os resultados expostos neste estudo, ratificando que o seu uso demonstra desfechos clínicos mais favoráveis nos ciclos de FIV. Entretanto, foi constatado que a quantidade e a qualidade desses ovócitos diminuem com o avanço da idade. Assim, a utilização de MI-MII deve ser estimulada nos centros de Fertilização *in vitro* como alternativa à baixa obtenção de oócitos maduros. Mais pesquisas sobre este tema devem ser feitas, afim de buscar alternativas para minimizar os resultados negativos e a necessidade de tratamentos repetitivos e, consequentemente, aumentar a taxa de sucesso da fertilização *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS

- ALAN, H.D. E CHERNEY, M.D. ***In vitro* Fertilization and Embryo Transfer: A Brief Overview**. The Yale Journal of Biology and Medicine, 1986. 59: p. 409-414.
- ALCOBA, D.D.; PIMENTEL, A.M.; BRUM, I.S.; CORLETA, H.E. **Developmental potential of *in vitro* or *in vivo* matured oocytes**. Zygote 2015Feb;23(1):93-8. Epub 2013 Jun 5.
- AL-INANY, H.G.; ABOULGHAR, M.; MANSOUR, R.; PROCTOR, M. **Recombinant versus urinary human chorionic gonadotrophin for ovulation induction in assisted conception**. Cochrane Database Syst Rev 2005; :CD003719.
- AL-INANY, H.G.; YOUSSEF, M.A.; ABOULGHAR, M., *et al.* **Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology**. Cochrane Database Syst Rev 2011; :CD001750.
- ÁLVAREZ, C.; GARCIA-GARRIDO, C.; TARONGER, R.; DE MERLO, G.G. ***In vitro* maturation, fertilization, embryo development and clinical outcome of human metaphase I oocytes retrieved from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles**. Indian J Med Res 137,February 2013;pp331-338.
- BAKER, V.L.; LUKE, B.; BROWN, M.B., *et al.* **Multivariate analysis of factors affecting probability of pregnancy and live birth with *in vitro* fertilization: an analysis of the Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System**. FertilSteril 2010; 94:1410.
- BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMED, G.; LIBRACH, C. **Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest**. Hum Reprod 2004;19:982-7.
- BANCSI, L.F.; BROEKMANS, F.J.; LOOMAN, C.W.; HABBEMA, J.D.; TEVELDE, E.R. **Predicting poor ovarian response in IVF: use of repeat basal FSH measurement**. J Reprod Med. 2004 Mar;49(3):187-94.
- BLAKE, D.A., *et al.*, **Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception**. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD002118.
- BOISO, I.; VEIGA, A.; EDWARDS, R.G. **Fundamentals of human embryonic growth *in vitro* and the selection of high-quality embryos for transfer**. Reprod Biomed Online 2002; 5:328.
- BROEKMANS, F.J.; KWEE, J.; HENDRIKS, D.J.; MOL, B.W.; LAMBALK, C.B. **A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome**. Hum Reprod Update. 2006 Nov-Dec;12(6):685-718.
- BUKMAN, A.; HEINEMAN, M.J. **Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility**. Hum Reprod Update. 2001 Nov-Dec;7(6):581-90.

CAMARGOS, A.F.; MELO, V.H.; CARNEIRO, M.M.; REIS, F.M. (2007) **Ginecologia ambulatorial baseada em evidências científicas**, cap. 19,273-281.

CHA, K.Y.; CHAIN, R.C. **Maturation *in vitro* of imature human oocytes for clinical use**. Hum Reprod Update 1998, 66:103-120.

CHEN, S.U.; CHEN, H.F.; LIEN, Y.R.; HO, H.N.; CHANG, H.C.; YANG, Y.S. **Schedule to inject *in vitro* matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection**. Arch Androl 2000;44:197-205.

DAVID, K.G., *et al.* **A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization**. Human Reproduction 1998. 13: p. 3434-3440.

DE SUTTER, P.; DHONT, M. **Poor response after hormonal stimulation for *in vitro* fertilization is not related to ovarian aging**. FertilSteril 2003, 79:1294-1298.

DE VICENTIIS, S.; DE MARTINO, E.; BUFFONE, M.G. **Use of metaphase I oocytes matured *in vitro* is associated with embryo multinucleation**. Fertil. Steril. 2013 Feb;99:414-21. No 2, Vol. 99. 2013.

DE VOS, A.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. ***In vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection**. Hum. Reprod. 14, 1859-63. 1999.

DOMINKO T.; FIRST, N.L. **Timing of meiotic progression in bovine oocytes and effect on early embryo development**. Mol ReprodDev1997;47:456-67.

EDWARDS, R.G. **Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes**. Lancet 2, 926-9. 1965.

EICHNLAUB-RITTER, U.; SHEN, Y.; TINNEBERG, H.R. **Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus**. Reprod Biomed Online 2002;5:117-24.

FABER, B.M., *et al.* **Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders**. FertilSteril 1998, 69:826-830.

GLUJOVSKY, D.; BLAKE, D.; FARQUHAR, C.; BARDACH, A. **Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology**. Cochrane Database Syst Rev 2012; 7:CD002118.

GRIESINGER, G.; VENETIS, C.A.; MARX, T., *et al.* **Oral contraceptive pill pretreatment in ovarian stimulation with GnRH antagonists for IVF: a systematic review and meta-analysis**. FertilSteril 2008; 90:1055.

HARTSHONE, G.; MONTGOMERY, S.; KLENTZERIS, L. **A case of failure oocyte maturation *in vivo* and *in vitro***. Fertil Steril 1999; 71,567-570.

HUANG, Z.; LI, J.; WANG, L., *et al.* **Brief co-incubation of sperm and oocytes for *in vitro* fertilization techniques.** Cochrane Database Syst Rev 2013; 4:CD009391.

HUDDLESTON, H.G.; CEDARS, M.I.; SOHN, S.H., *et al.* **Racial and ethnic disparities in reproductive endocrinology and infertility.** Am J ObstetGynecol 2010; 202:413.

INGERSLEV, H.J.; HØJGAARD, A.; HINDKJAER, J.; KESMODEL, U. **A randomized study comparing IVF in the unstimulated cycle with IVF following clomiphene citrate.** Hum Reprod 2001; 16:696.

KÄLLÉN, B.; FINNSTRÖM, O.; LINDAM, A., *et al.* **Malignancies among women who gave birth after *in vitro* fertilization.** Hum Reprod 2011; 26:253.

KWAN, I.; BHATTACHARYA, S.; KNOX, F.; MCNEIL, A. **Pain relief for women undergoing oocyte retrieval for assisted reproduction.** Cochrane Database Syst Rev 2013; 1:CD004829.

LEVRAN, D.; FARHI, J.; NACHUM, H.; GLEZERMAN, M.; WEISSMAN, A. **Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility.** Hum Reprod 2002; 17,1604-1609.

MAHMOUD, M.K.; PUNUKOLLU, D.; MAHMOOD, T. ***In vitro* fertilization.** Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine, 2013. 23(8): p. 238-246.

MALIZIA, B.A.; HACKER, M.R.; PENZIAS, A.S. **Cumulative live-birth rates after *in vitro* fertilization.** N Engl J Med 2009; 360:236.

MEDICINA, C.F.d., **RESOLUÇÃO CFM Nº 2.013/2013.2013.**

MEDICINE, Practice Committee of the American Society for Reproductive. **Blastocyst production and transfer in clinical assisted reproduction.** FertilSteril 2004; 82 Suppl 1:S149.

MOHIYIDDEEN, L.; NEWMAN, W.G.; MCBURNEY, H.; MULUGETA, B.; ROBERTS, S.A.; NARDO, L.G. **Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphisms are not associated with ovarian reserve markers.** FertilSteril. 2012 Mar;97(3):677-81.

MOLLOY, D.; HARRISON, K.; BREEN, T.; HENNESSEY, J. **The predictive value of idiopathic failure to fertilize on the first *in vitro* fertilization attempt.** FertilSteril 1991; 56:285.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia clínica.** 8a ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2008.

MORENO, C., *et al.* **Intracitoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients.** Hum Reprod 1998, 13:2126-2129.

NOGUEIRA, D.; STASSEN, C.; VAN DE VELDE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A. **Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in-vitro matured oocytes.** FertilSteril 2000;74:295-8.

ONTARIO, Health Quality. ***In vitro* fertilization and multiple pregnancies: an evidence-based analysis.** Ontario Health Technology Assessment Series, 2006.

PREVENTION, C.D.C. **National Public Health Action Plan for the Detection, Prevention, and Management of Infertility.** Atlanta, Georgia: Centers for DiseaseControl and Prevention; june 2014.

ROSENWAKS, J.Y.J.H.A.Z. **Assisted reproductive techniques.** human fertility: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2014. 1154.

SANFINS, A.; PLANCHA, C.E.; OVERSTROM, E.W.; ALBERTINI, D.F. **Meiotic spindle morphogenic in *in vivo* and *in vitro* matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmatic quality.** Hum Reprod 2004;19:2889-99.

SCHEFFER, G.J.; BROEKMANS, F.J.; LOOMAN, C.W.; BLANKENSTEIN, M.; FAUSER, B.C.; TEJONG, F.H., *et al.* **The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age.** Hum Reprod. 2003 Apr;18(4):700-6.

SHIN, S.B.; CHO, J.W.; LEE, S.H.; YANG, K.M.; LEE, H.S. **Fertilization and pregnancy potential of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles.** Clin Exp Reprod Med 2013;40(1):7-11.

SHU, Y.; GEBHARDT, J.; WATT, J.; LYON, J.; DASIG, D.; BEHR, B. **Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulates intracytoplasmic sperm injection cycles.** FertilSteril 2007 May;85(5):1022-7. Eupub 2007 jan 29.

SILVA, A.L.B.; VILODRE, L.C.F. **Avaliação da reserva ovariana: métodos atuais.** Rev. Femina. Mar 2009, vol 37, nº 3.

SMITZ, J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE, L.; DE MATOS, D.G.; CORTVRINDT, R. **Oocyte *in vitro* maturation.** In Textbook of Assisted Reproductive Technology Volume Chapter 10. 2nd edition, Edited by: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Londen: Martin Dunitz LTD; 2004: 125-161.

SON, W.Y.; LEE, S.Y.; LIM, J.H. **Fertilization, cleavage an blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in *in vitro* maturation cycles.** Hum. Reprod. 20, 3204-7. 2005

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. **Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy.** Lancet 1976; 1:880.

STEWART, R.G.; LAN, L.; SHAH, A.A., *et al.* **Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: an analysis of 256,381 *in vitro* fertilization cycles.** FertilSteril 2014; 101:967.

STOUFFER, R.L.; ZELINSK-WOOTEN, M.B. **Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: quality vs quantity.** ReprodBiolEndocrinol 2004, 2:32.

STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; KASTERSTEIN, M.; RON-EL, R. **The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued *in vitro* matured MII oocytes.** Hum Reprod 2004, 19:1587-1590.

SU, Y.T.; LIN, P.Y.; HUANG, F.T.; LIN, Y.J.; TSAI, Y.R.; LAN, K.C. **Age is a major prognosticator in extremely low oocyte retrieval cycles.** Fertil Steril april 2017; Vol. 56;175-180.

SUNKARA, S.K.; RITTENBERG, V.; RAINE-FENNING, N., *et al.* **Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles.** Hum Reprod 2011; 26:1768.

TALAULIKAR, V.S.; ARULKUMARAN,S. **Maternal, Perinatal and Long-Term Outcomes After Assisted Reproductive Techniques (Art): Implications For Clinical Practice.** European Jorنال Obstet Gynecol Reprod Biol ,2013 .170(1):P.13-9

TRIWITAYAKORN, A.; SUWAJANAKORN, S.; PRUKSANANONDA, K.; SEREEPAPONG, W.; AHNONKITPANIT,V. **Correlation between human follicular diameter and oocytes outcomes in na ICSI program.** J Assist Reprod Genet 2003, 20: 143-147.

TROUNSON, A.O.; ANDERIESZ, C.; JONES, G.M. **Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence.** Reproduction 2001;121:51-75.

VAN WELY, M.; WESTERGAARD, L.G.; BOSSUYT, P.M.; VAN DER VEEN, F. **Effectiveness of human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles: a meta-analysis.** FertilSteril 2003; 80:1086.

VANHOUTTE, L.; DE SUTTER, P.; VAN DER ELST, J.; DHONT, M. **Clinical benefit of methaphase I oocytes.** Reprod Biol Endocrinil 2005;3:71.

WANG, W.H.; MENG, L.; HACKETT, R.J.; KEEFE, D.L. **Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spidles imaged by Polscope before insemination.** Hum Reprod 2001;16:1464-8.

WINDT, M.L.; COETZEE, K.; KRUGER, T.F.; MARINO, H.; KITSHOFF, M.S.; SOUSA, M. **Ultrastructural evaluation of recurrent and *in vitro* maturation resistant metaphase I arrested oocytes.** Hum Reprod 2001; 16,2394-2398.

APÊNDICE A
ARTIGO

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS APÓS A
INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE EM
OÓCITOS EM METÁFASE I DE MULHERES SUBMETIDAS À
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO***

EVALUATION OF BLASTOCYST FORMATION RATE AFTER INTRACYTOPLASMIC
SPERM INJECTION IN METAPHASE I OOCYTES OF WOMEN SUBMITTED TO *IN
VITRO* FERTILIZATION

Yasmin Cristina Costa MACIEL¹; João Paolo BILIBIO².

RESUMO

Objetivo: Avaliar a taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MI.

Tipo de estudo: Transversal.

Local da pesquisa: Pronatus – Centro Especializado em Medicina de Reprodução Humana LTDA, durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016.

Pacientes: Foram selecionadas 164 pacientes, com idade entre 18 e 45 anos, que pelo menos um oócito MI foi fertilizado por ICSI.

Intervenção: Nenhuma.

Resultados: No total, 1467 oócitos foram fertilizados por ICSI, os quais 1153 estavam em estágio MII e 314 em MI. Destes, 201 maturaram *in vitro* para MII (MI-MII) e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura. A idade média das pacientes foi de 35,6 anos. A taxa de maturação *in vitro* foi de 64,01%. A taxa de fertilização em oócitos MI foi a menor (31,9%), enquanto que os oócitos MII tiveram a melhor taxa (79,1%). A comparação da taxa de fertilização mostrou que os oócitos MI possuem uma chance 88% menor de formar embrião com 2 pró-núcleos em relação aos oócitos MII ($p<0.001$). Notou-se que os embriões provenientes de MI têm a maior incidência de multinucleação e possuem um risco 2,63 vezes maior de apresentarem anormalidades de divisão celular em relação aos MII ($p=0.008$). A taxa de formação de blastocistos foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII (36,4%) e a taxa nos embriões de MI-MII foi de 11,4% nos oócitos MI de 0,8%. O risco de oócitos MI não formarem blastocisto é de 99% em relação aos MII ($p<0.001$). Ao correlacionar a idade com a obtenção de oócitos e com a formação de blastocistos, observou-se que, a quantidade de oócitos MII diminui com o aumento da idade ($p=0.002$) e que há queda na formação de blastocistos oriundos destes oócitos em pacientes acima de 40 anos ($p=0.03$).

Conclusão: A utilização de oócitos MI na FIV deve ser desencorajada, pois possuem baixo potencial de desenvolvimento embrionário e forma embriões de baixa qualidade, com taxa de formação de blastocisto menor que 1%. Entretanto, o uso de MI-MII pode ser estimulado nos ciclos de FIV como alternativa à baixa obtenção de oócitos MII em mulheres com idade avançada.

Palavras-chave: Blastocistos. Metáfase I. Fertilização *in vitro*.

¹Aluna de Graduação do Curso de Medicina da Universidade Federal do Pará. Belém, Pará, Brasil.

²Professor Doutor Curso de Medicina da Universidade Federal do Pará. Belém, Pará, Brasil.

INTRODUÇÃO

A fertilização *in vitro* (FIV) é um procedimento realizado para tentar superar diversos tipos de infertilidade feminina e masculina. Ao longo do ciclo de FIV, com duração de, aproximadamente, duas semanas, ocorre as etapas de estimulação ovariana, aspiração de oócitos dos folículos ovarianos, fertilização no laboratório, seleção do embrião e sua transferência para a cavidade uterina¹.

Durante a aspiração oocitária pode haver coleta de oócitos maduros em metáfase II (MII), ou meioticamente imaturos, em metáfase I (MI) e em vesícula germinal (VG). A proporção dos óocitos imaturos coletados oscila entre 15 a 20%^{2,3}. Além disso, os oócitos em estágio MI podem, espontaneamente, maturar *in vitro* para MII em poucas horas (MI-MII)⁴.

Ainda não se sabe ao certo a explicação da não responsividade de alguns oócitos à estimulação ovariana, mas é possível que os diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos produzam um variado grau de maturação após a estimulação. Dessa forma, durante a aspiração são coletados oócitos de grupos heterogêneos de folículos⁵.

A resposta ovariana à estimulação é variável e depende fortemente da reserva ovariana de cada mulher. Com o aumento da idade há uma diminuição da quantidade e da qualidade de oócitos obtidos, portanto a idade é considerada o principal influenciador desta resposta⁶. O aumento crescente de casais que buscam técnicas de reprodução assistida (TRA), bem como o número cada vez maior de mulheres acima de 40 anos que desejam uma nova ou a primeira gravidez, levam os especialistas da área a sempre estarem em busca de melhores resultados.

Sabe-se que o aumento da taxa de gravidez está relacionado diretamente ao número de embriões em estágio de blastocisto obtidos no ciclo de FIV, e este número depende da quantidade e qualidade dos oócitos MII coletados. Como a obtenção destes oócitos é inversamente proporcional à idade da paciente, se discute, como alternativa, o uso de oócitos MI para FIV, principalmente em casais com idade avançada. Portanto, o objetivo desta pesquisa é avaliar se a fertilização de oócitos imaturos, em estágio MI, pode aumentar a quantidade de embriões que cheguem ao estágio de blastocisto e, consequentemente, melhorar as chances de gravidez.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo

Foi realizado um estudo do tipo transversal com análise de prontuário de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* por injeção intracitoplasmática de espermatozoides, durante o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016.

Seleção de pacientes

Foram selecionadas um total de 164 pacientes e 1467 oócitos foram fertilizados por ICSI, os quais 1153 estavam em estágio MII e 314 em estágio MI. Destes, 201 maturaram *in vitro* para MII (MI-MII) e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura embrionária equilibrada “single step” (Global Total, Irvine Scientific). As pacientes com idade entre 18 e 45 anos que obtiveram pelo menos um oócito em estágio MI fertilizado por ICSI, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2016. Para correlacionar a idade das mulheres com a obtenção de oócitos em diferentes estágios de maturação e com a formação de blastocistos, a faixa etária foi dividida em: ≤ 34 anos, entre 35-39 anos e ≥ 40 anos. Todas as pacientes tiveram diagnóstico de infertilidade conjugal e indicação para realizar fertilização *in vitro* no Centro de Medicina Reprodutiva Pró Social e Clínica Pronatus em Belém, Pará, Brasil.

Procedimentos

Protocolo de Indução Ovariana

No protocolo de estimulação ovariana é incluído FSH recombinante (rFSH), antagonistas e recombinante da gonadotrofina coriônica humana (rhCG). Todas as pacientes foram submetidos a uma contagem de folículos antrais no dia 3 do ciclo menstrual e também dosagem de FSH, LH e estradiol. Tratamento com rFSH (Puregon-Organon) era então iniciado com doses diárias de d1 200UI, d2 200UI, d3 200 UI, d4 e d5 150 UI. No sexto dia, a USG-TV foi repetida e, a partir deste dia, a cada dois dias. A dose rFSH foi perfeitamente ajustada com base nos resultados de USG, até os folículos atingirem tamanho maior que 17mm, em relação ao número e tamanho dos folículos em desenvolvimento. O GnRH, Orgalutran (Organon 0,25mg/d), foi administrado por via subcutânea (SC) com ciclo de injeção diariamente desde o momento que os folículos atingiram 14mm, até a administração de rhCG (Ovidrel 250mcg, Serono). O rhCG foi administrado quando os folículos atingiram tamanho maior que 17mm, como gatilho de maturação oocitária. A recuperação dos oócitos foi guiada por USG-TV, realizada após 35 horas da administração do rhCG.

Procedimentos Laboratoriais e Tratamento dos Oócitos MI

Às 0 horas os oócitos são recolhidos e, à medida em que os oócitos, ainda com as células do cumulus, são localizados em meio ao líquido folicular, os mesmos são transferidos para uma placa contendo meio de cultura tamponado HAM (Modified HAM's F10, Irvine Scientific) coberto por óleo mineral (Light Oil – Irvine Scientific). Após o rastreamento, todos os oócitos são imediatamente submetidos a uma solução pura de 100µL de hialuronidase (Ingase – solução enzima hialuronidase - 80 IU/ml, Ingamed) por 45s a 1minuto para a remoção das células do cumulus. Em seguida todos os oócitos são transferidos para uma placa com meio de cultura tamponado e suplementado MHM-c (Multipurpose Handling Medium Complete, Irvine Scientific) coberto por óleo mineral, para a remoção mecânica das células da Corona.

Terminada a remoção total das células da Corona, realiza-se em lupa a classificação da maturação oocitária segundo a presença do primeiro corpúsculo polar (MII), ausência de corpúsculo polar (MI) e presença de vesícula germinativa (VG). Após a classificação e contagem dos oócitos, somente aqueles classificados como MII e MI são transferidos para uma placa com meio de cultura embrionária equilibrada “single step” (Global Total, Irvine Scientific), onde ficarão incubados pós-denudação por até 3h. Determinou-se o prazo máximo de 3h como o limite de incubação para a estabilização dos oócitos maduros MII, assim como tempo limite de maturação *in vitro* dos Imaturos MI, antes da realização da ICSI dos mesmos.

Os oócitos MI foram injetados independentemente de terem apresentado maturação *in vitro* após as 3h de incubação. Em casos de congelamento total de oócitos para uso posterior, os oócitos MII e MI foram congelados em até 2h após a punção folicular, independentemente dos MI terem apresentado maturação *in vitro*. Os MI foram congelados mesmo sem maturação por apresentarem capacidade de maturação no pós-descongelamento em alguns casos.

Para proceder com a ICSI, o parceiro do sexo masculino já teria apresentado a sua amostra de sêmen antes do processo de recuperação de oócitos, após um período de abstinência de 2 a 5 dias. Os espermatozóides são preparados por swim-up ou método de dupla centrifugação em gradiente.

A taxa de falha na fertilização foi considerada quando o embrião apresentou outro valor que não 2 pró-núcleos, desconsiderando os embriões degenerados e os não fertilizados.

Análise estatística

Variáveis categóricas foram comparadas utilizando-se os testes de Qui-quadrado. Variáveis contínuas foram analisadas utilizando-se Anova e realizado, quando $p < 0.05$, test de

POST HOC BONFERRONI. Associações foram feitas com teste de Spearman ou regressão logística. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 23.0 para tabulação e análise dos dados.

RESULTADOS

Nas características do grupo estudado, conforme descrito na tabela 1, identifica-se um total de 164 pacientes avaliadas. Ao observar a idade das mulheres, tem-se que a média é de 35,6 anos. O tempo de infertilidade apresentado é de 5,6 anos em média. E, em relação à idade das mulheres na menarca, a média foi de 12 anos.

Além disso, pode-se observar que o número total de oócitos obtidos e fertilizados através de ICSI foi de 1467. Destes, 1153 foram obtidos em estágio MII, 314 em estágio MI, no qual 201 maturaram *in vitro* para MII e 113 permaneceram em estágio MI após 3 horas no meio de cultura. Assim, a taxa de maturação *in vitro* é de 64,01%, conforme descrito na tabela 1.

TABELA 1 – PERFIL DA AMOSTRA

ITEM	M $\pm$ DP ou N (%)*
Total de Pacientes	n = 164
Idade	35,6 $\pm$ 4,2
Tempo de Infertilidade (anos)	5,6 $\pm$ 5,1
Menarca	12 $\pm$ 1,5
Total de Oócitos Avaliados**	1467 (100%)
MII	1153 (78,6%)
MI total	314 (21,4%)
MI não maturado	113 (7,7%)
MI-MII	201 (13,7%)
Taxa de Maturação	64,01%

*M: média; DP: desvio padrão; N: número

**MII: metáfase II; MI: Metáfase I; MI-MII: MII maturado *in vitro*

Em relação à taxa de fertilização, considerada adequada quando há a formação de 2 pró-núcleos no primeiro dia, pode-se observar que os oócitos MI não maturados possuem a menor taxa de fertilização (31,9%), representando, aproximadamente, metade da taxa dos MI que

maturaram *in vitro* para MII (60,2%). Os oócitos MII apresentaram a melhor taxa de fertilização dentre os estágios analisados, com 79,1%.

TABELA 2 – TAXA DE FERTILIZAÇÃO

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de oócitos	2pn (%)	Falha (%)	OR (IC 95%)*	p-value ^d
MI	1153	912 (79,1%)	241 (20,9%)	0,12 (0,081-0,189)	<0.001 ^a
MII	113	36 (31,9%)	77 (68,1%)	0,40 (0,292-0,555)	<0.001 ^b
MI-MII	201	121 (60,2%)	80 (39,8%)	3,25 (1,993-5,301)	<0.001 ^c

*OR: odds-ratio; IC: intervalo de confiança 95%

^aComparação MII x MI

^bComparação MII x MI-MII

^cComparação MI x MI-MII

^dAnova (POST HOC BONFERRONI)

A obtenção de embrião com 1pn ou ≥ 3 pn foi considerada como falha na fertilização. Assim, encontrou-se que a porcentagem de falha no estágio MI (68,1%) foi maior que três vezes a porcentagem para os oócitos em estágio MII (20,9%). A falha na fertilização dos MII maturados *in vitro* (MI-MII) é cerca de duas vezes maior que os MII maturados *in vivo* (39,8% e 20,9%, respectivamente). Portanto, ao analisar a tabela 2, observa-se que os oócitos MII, além de possuírem a melhor taxa de fertilização, têm também o menor índice de falhas neste processo.

Quando se faz a comparação estatística da taxa de fertilização entre os grupos, conforme a tabela 2, percebe-se que, ao realizar a FIV, os oócitos MI tem uma chance 88% menor de formar um embrião com 2 pró-núcleos em relação aos oócitos MII. Na correlação de oócitos MII maturados *in vivo* com os maturados *in vitro*, os MI-MII têm uma chance 60% menor de fertilização adequada. E, por fim, na comparação entre os oócitos imaturos, nota-se que os MI-MII têm uma chance 3,25 vezes maior de formar embrião com 2 pró-núcleos quando comparado aos oócitos MI.

A tabela 3 ilustra a incidência de multinucleação nos embriões, na qual se observa que aqueles provenientes de oócitos MI tem a maior porcentagem de multinucleação e possui um risco 2,63 vezes maior de apresentar anormalidade de divisão nuclear em relação aos embriões oriundos de oócitos MII, com relevância estatística ($p=0.008$). Os oócitos MI-MII tiveram uma incidência de multinucleação maior que oócitos MII, porém na análise estatística não apresentou relevância significativa ($p>0.05$).

TABELA 3 – INCIDÊNCIA DE MULTINUCLEAÇÃO EMBRIONÁRIA

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de oócitos	3pn ou mais (%)	OR (IC) IC 95%	p-value ^c
MII	1153	3.55%	-	-
MI	113	8.84%	2.63 (1.28-5.41)	0.008 ^a
MI-MII	201	5.47%	1.57 (0.79-3.10)	0.195 ^b

^aComparação MII x MI^bComparação MII x MI-MII^c Pearson correlation

Na tabela 4 observa-se que a taxa de formação de blastocisto foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII com taxa total de 36,4%, sendo que 74,5% destes formaram em D5 e 25,5% formaram em D6. A menor taxa de formação foi do oócito MI, com apenas um blastocisto formado em D6, totalizando 0,8% do total de oócitos MI que foram fertilizados com ICSI. Já os oócitos MI-MII tiveram uma taxa de formação de 11,4%, superando os oócitos MI, porém inferior a um terço da taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MII.

Além disso, através da tabela 4 pode-se afirmar que o risco de oócitos MI não formarem blastocisto é, aproximadamente, 99% em relação aos oócitos em estágio MII. E, em relação aos oócitos MII maturados *in vitro*, a chance de não formar blastocistos é de 78% quando comparados aos MII maturados *in vivo*. Ambos os resultados com relevância estatística ($P < 0.001$).

TABELA 4 – TAXA DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS EM RELAÇÃO À MATURAÇÃO DO OÓCITO

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	Total de Oócitos	Blastocistos	D5	D6	OR (IC 95%)	p-value ^c
MII	1153	420 (36,4%)	313 (74,5%)	107 (25,5%)	-	-
MI	113	1 (0,8%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)	0.01 (0.003-0.082)	<0.001 ^a
MI-MII	201	23 (11,4%)	16 (69,6%)	7 (30,4%)	0.22 (0.144-0.354)	<0.001 ^b

^aComparação MII x MI^bComparação MII x MI-MII^cAnova (POST HOC BONFERRONI)

Ao analisar a idade com a obtenção de oócitos em diferentes estágios de maturação, de acordo com a tabela 5, percebe-se que a quantidade de oócitos coletados em estágio MII diminui

com o aumento da idade ($p=0.002$). Entretanto, quando se relaciona a idade com a obtenção de oócitos imaturos, apesar dos números de MI e MI-MII diminuírem com avanço da idade, o valor de p não é estatisticamente significativo ($p=0.209$ e $p=0,62$, respectivamente). Logo, pode-se afirmar que a obtenção de oócitos imaturos não se alterou com o aumento da idade da mulher.

TABELA 5 – ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	IDADE			p-value ^a
	≤ 34 anos*	35-39 anos*	≥ 40 anos*	
MII	9,46 (8,04-10,87)	7,04 (6,28-7,80)	6,78 (5,53-8,03)	0.002
MI	1,08 (0,73-1,43)	0,93 (0,67-1,18)	0,57 (0,22-0,21)	0.209
MI-MII	1,31 (1,01-1,60)	1,17 (0,94-1,40)	1,39 (0,86-1,92)	0.620

^aAnova (POST HOC BONFERRONI)

*Valores demonstrados na tabela: OR (IC 95%)

Da mesma forma, quando se relaciona a idade da paciente com a formação de blastocisto oriundo de oócito MI-MII, nota-se que a idade não tem influência na taxa de formação de blastocistos destes oócitos ($p=0.128$), como descrito na tabela 6. Diferente do observado na relação entre idade e formação de blastocisto proveniente de oócitos MII, em que há relevância significativa, demonstrando uma queda na formação de blastocistos oriundos destes oócitos em pacientes acima de 40 anos ($p=0.03$).

TABELA 6 – FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

ESTÁGIO DE MATURAÇÃO DO OÓCITO	IDADE			p-value ^a
	≤ 34 anos	35-39 anos	≥ 40 anos	
MII	2,85 (2,61-3,01)	2,51 (2,34-2,73)	1,87 (1,71-1,94)	0,03
MI-MII	0,1 (0,01-0,19)	0,2 (0,11-0,28)	0,04 (0,05-0,13)	0,128

^aAnova (POST HOC BONFERRONI)

*Valores demonstrados na tabela: OR (IC 95%)

DISCUSSÃO

Na rotina de técnica de reprodução assistida, apesar do uso de estimulação ovariana e do hCG como gatilho para maturação folicular final, nem todos os oócitos recrutados alcançam o estágio de metáfase II. Além disso, alguns destes oócitos maturados *in vivo* não possuem desenvolvimento embrionário esperado para o seu estágio de maturação⁷. Os gametas coletados ainda imaturos, em metáfase I, são observados principalmente em casos de paciente com pobre resposta e baixa reserva ovariana^{4,8}. Nestes casos, a maturação *in vitro* (IVM) dos oócitos MI para MII é utilizada para aumentar a taxa de fertilização. Strassburger *et al.* mostraram que a injeção de oócitos MII maturados *in vitro* após 4 horas da coleta possui uma taxa de fertilização maior quando comparado com oócitos MI que foram fertilizados logo após a denudação⁴.

No presente estudo, o tempo de maturação *in vitro* de MI para MII foi de 3 horas, levando a uma taxa de IVM de 64,01% em relação ao total de oócitos MI coletados. Pesquisas têm demonstrado que a taxa de maturação *in vitro* varia de 16,4% a 88,3% e aumenta com o prolongamento do período que o oócito permanece no meio de cultura⁹. Em relação ao tempo de incubação, Strassburger *et al.* encontraram que 13% dos oócitos MI maturaram dentro de 1 hora e que outros 41% maturaram dentro de 2,5 horas, mostrando que a maioria dos oócitos MI (54%) maturaram *in vitro* para MII após 2,5 horas de incubação⁴.

Em seu estudo, Alvarez *et al.* afirmaram que o oócito imaturo precisa de 2-6 horas para completar a sua maturação *in vitro*. Além disso concluíram que, os oócitos imaturos provenientes de mulheres submetidas ao ciclo de FIV podem ser maturados, fertilizados por ICSI e passarem por estágio de clivagem *in vitro*, sendo capazes de produzir gravidez e darem vida a uma criança. Porém, afirma que a performance destes oócitos, no que diz respeito ao desenvolvimento embrionário, é reduzida quando comparado aos oócitos MII¹⁰.

Ao avaliar a taxa de fertilização, foi encontrado nesta pesquisa que oócitos MI apresentaram a menor taxa de fertilização (31,9%) em relação aos outros estágios analisados, enquanto que, os oócitos MII apresentaram a melhor taxa, com 79,1%. Quanto aos oócitos MI-MII, a taxa de fertilização foi 60,2%. A baixa taxa de fertilização em oócitos imaturos é relatada por diversos estudos, sendo que em oócitos MI a taxa de fertilização tem se mostrado inferior aos oócitos MI que maturaram *in vitro* para MII^{4,8,11,12,13,14}.

Percebe-se, com os resultados deste estudo, que a maturação do oócito tem influência direta na taxa de fertilização. De Vos *et al.* corroboram com estes achados quando afirmam em seu estudo que a taxa de fertilização de oócitos MII maturados *in vivo* (70,8%) é maior que em oócitos MII maturados *in vitro* (52,7%), com relevância estatística ($p < 0.001$)¹⁵. Todavia, alguns estudos não encontraram esta associação, como o de Alcoba *et al.*, mostrando que a taxa de

fertilização de oócitos MII (74,5%) não teve diferença estatística em relação a taxa de oócitos MI-MII (68,2%), $p=0.336^{11}$. O aumento da taxa de fertilização nos oócitos MI-MII em relação aos MI não maturados parece estar relacionado com o fato de que, estes últimos, podem não formar fuso durante a divisão celular^{16,17} ou ter uma falha para entrar em metáfase¹⁸.

Ao analisar as taxas de fertilização entres os diferentes estágios de maturação, observa-se que os oócitos MI-MII têm 60% menos chances de formar um embrião com 2 pró-núcleos do que aqueles em estágio MII, enquanto MI têm 88% menos chances em relação aos oócitos MII. Além disso, ao se comparar os oócitos imaturos (MI x MI-MII), nota-se uma chance 3,25 vezes maior de MI-MII ter sucesso na fertilização. Os oócitos que não apresentam 2 pró-núcleos no primeiro dia após ICSI são considerados como tendo falha na fertilização. No presente estudo, foi encontrado que a taxa de falha é maior em oócitos imaturos (MI=68,1% e MI-MII=39,8%) quando comparados aos MII (20,9%). Assim, este resultado sugere que os oócitos MII possuem melhor desenvolvimento embrionário em relação aos oócitos imaturos.

Durante a fase de crescimento, os oócitos acumulam proteínas e RNAs para completar a divisão meiótica e manter a homeostase celular. Qualquer alteração nesse processo pode acarretar no atraso e falha do desenvolvimento embrionário¹⁹. A multinucleação tem sido associada negativamente com esse desenvolvimento e com os desfechos de gravidez. Esta anormalidade nuclear tem origem na deficiência de maturação embrionária que produz defeitos de fuso, fragmentação nuclear ou defeito de migração na anáfase da divisão mitótica²⁰. Wang *et al.* e Eichenlaub-Ritter *et al.*, relatam que oócitos com ausência de fuso no momento da ICSI têm um potencial de desenvolvimento menor quando comparado a oócitos que possuem fuso. Como resultado, sugerem que um embrião morfollogicamente normal oriundo de MI tem uma taxa de implantação reduzida devido a anormalidades cromossômicas frequentes^{21,22}. Ao avaliar oócitos MI-MII, estudos perceberam que a maturação nuclear ocorre antes do citoplasma completar sua maturidade total, implicando em defeitos de organização citoplasmática e do citoesqueleto, alterando a morfogênese do fuso meiótico e resultando em embriões com desorganização nuclear ou anormalidades cromossômicas^{20,23}.

A avaliação da incidência de multinucleação feita neste estudo permite constatar que os embriões derivados de oócitos MI têm maior incidência desta alteração (8,84%) em relação aos outros estágios (MI-MII=5,47% e MII=3,55%). Ao comparar os estágios de maturação com a multinucleação, observou-se que o embrião proveniente de MI tem um risco de 2,63 vezes maior de apresentar anormalidades de divisão celular em relação aos embriões oriundos de MII. Strassburger *et al.* (2004) concordam com nossos resultados quando reportam que a multinucleação de oócitos MI foi maior que oócitos MII e MI-MII (10% vs. 4%), porem relata

que não houve diferença entre MII maturados *in vitro* e MII maturados *in vivo*, ambos têm incidência de multinucleação de 4%.

De Vicentiis *et al.* utilizaram em seu estudo 3 subgrupos para relacionar oócitos maturados *in vitro* com a incidência de multinucleação: a) utilizou o próprio gameta; b) utilizou oócitos doados; c) utilizou espermatozoado doado. Como resultado, afirmou que a multinucleação embrionária está associada ao embrião com baixo potencial de implantação e a frequência é mais observada em embriões derivados de oócitos em estágio MI. No grupo “a” foi demonstrado que a multinucleação em MII foi de 8,5%, MI-MII de 22,6% e MI de 35,9% ($p < 0.0001$), corroborando com nosso resultado. Além disso, a incidência de multinucleação não está correlacionada com a origem dos gametas que foram usados para ICSI, isso quer dizer que, a utilização de gametas doados não modificou o fato de que a imaturidade do oócito é o que aumenta a incidência de multinucleação¹².

Observou-se nesta pesquisa que a taxa de formação de blastocisto foi maior nos embriões oriundos de oócitos MII (36,4%), e a menor taxa foi encontrada nos embriões oriundos de MI (0,8%). Já em oócitos MI-MII obteve-se taxa de 11,4%. Um estudo que analisou 214 ciclos de FIV, obteve 2401 oócitos, sendo 73% em estágio MII, 20% em estágio MI e 7% em VG, a taxa de IVM foi cerca de 54% e a taxa de formação de blastocisto proveniente destes oócitos MI-MII foi de 16,7%, sendo inferior a um terço da taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos MII que foi de 52%, $p < 0.05$ ¹⁴, corroborando com o resultado demonstrado neste trabalho.

De vos *et al.* e Alcoba *et al.*, não avaliaram blastocisto em seus trabalhos, porém utilizaram a taxa de clivagem em D2 e D3 e mostraram que essa taxa era semelhante em embriões de MII e nos embriões de MI-MII, aproximadamente 80%, confirmando que os oócitos maturados *in vitro* também têm habilidade de gerar embriões de boa qualidade. Entretanto, sabe-se que embriões com 2-3 dias de vida ainda não podem ser adequadamente avaliados em relação a sua qualidade e que a transferência destes embriões está em desuso^{11,15}. Strassburger *et al.* apresentam valores diferentes em seus resultados, no qual a taxa de clivagem foi similar entre MI e MII (ambos 95%), mas significativamente baixa nos MI-MII (86%), com $p < 0.01$ ⁴.

Assim, pode-se observar que, embora taxa de clivagem seja similar entre embriões derivados de oócitos MII maturados *in vivo* e *in vitro*, como descrito nos trabalhos citados acima, os resultados do presente estudo afirmam que a porcentagem dos embriões oriundos de MI-MII que se desenvolvem até blastocisto é significativamente menor que a taxa de formação de blastocistos oriundos de MII e possui uma chance de 78% de não formar blastocistos. Além disso, é demonstrado que os oócitos MI possuem taxa de formação de blastocisto menor que 1% com a chance de não formar blastocistos de, aproximadamente, 99%. Portanto, os oócitos MI

que não maturaram *in vitro* apresentam baixo potencial de desenvolvimento para o estágio de blastocisto.

Ao relacionar a idade das pacientes com a formação de blastocistos, foi demonstrado que, em pacientes acima de 40 anos, há uma queda na formação de blastocistos proveniente de oócitos MII ($p=0.03$). Ademais, observou-se que o aumento da idade da mulher leva a uma menor obtenção destes oócitos ($p=0.002$). Su *et al.*, ressaltam a relevância da idade da mulher no sucesso da FIV, afirmando em seu trabalho que o grupo de mulheres com menos de 40 anos obteve desfechos clínicos mais favoráveis em relação ao grupo de mulheres mais velhas (≥ 40 anos), resultando em maiores taxas de transferência embrionária, de implantação e de gravidez⁶. Dessa forma, a idade avançada da mulher mostra-se como o fator de maior importância para o prognóstico da FIV, uma vez que acarreta na diminuição da quantidade de oócitos e da qualidade embrionária.

A relação da idade e da formação de blastocistos oriundos de MI-MII não teve relevância estatística ($p=0.128$), bem como a relação da idade com a obtenção de oócitos MI e de MI-MII ($p=0.209$ e $p=0.62$, respectivamente). Assim, podemos concluir que a idade não mostrou influência na obtenção e na taxa de formação de blastocistos oriundos de oócitos imaturos.

Diante destes resultados, a utilização de oócitos MI-MII pode ter de uma singular importância em mulheres com idade avançada que buscam a FIV como forma de superar a infertilidade, pois, apesar de apresentarem menor taxa de formação de blastocistos e maior incidência de multinucleação que os oócitos MII, os oócitos MI-MII ainda são capazes de proporcionar embriões blastocistos de boa qualidade. Por outro lado, oócitos MI que não maturaram *in vitro* não devem ser utilizados, visto que a taxa de formação de blastocistos é, aproximadamente, zero e de baixa qualidade, podendo trazer riscos genéticos a embriões oriundos destes oócitos.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho poderão auxiliar na conduta frente ao casal infértil que necessita de fertilização *in vitro* para engravidar. Foi possível retirar muitas dúvidas que ainda existiam sobre a utilização de oócitos MI para fins de FIV.

Oócitos MI que não maturaram *in vitro* apresentam uma chance de apenas 0,8% de formar blastocistos, possuem reduzida taxa de fertilização, alto índice de falhas neste processo e alta incidência de multinucleação embrionária. Assim, estes oócitos possuem um baixo potencial de desenvolvimento embrionário e formam embriões de baixa qualidade, corroborando com

estudos já realizados sobre o tema. Portanto, a utilização de oócitos MI em ciclos de FIV não se justifica e deve ser desencorajada.

Por outro lado, a utilização de oócitos MI-MII pode aumentar a quantidade de blastocistos disponíveis para transferência embrionária, embora tenha se observado que a taxa de formação de blastocistos oriundos destes oócitos é, significativamente, menor que as de oócitos MII. Apesar disto, os oócitos MI-MII apresentam melhores taxas de fertilização, de formação de blastocistos e menores índices de multinucleação embrionária quando comparados aos oócitos MI não maturados. Ao analisar a taxa de formação de blastocistos em mulheres com idade avançada (acima de 40 anos), as quais possuem baixa reserva ovariana e menor obtenção de oócitos MII, a utilização de oócitos MI-MII pode ser considerada, visto que, tanto a obtenção destes oócitos, quanto a formação de blastocistos oriundos dos mesmos, não demonstraram ter correlação estatística com o aumento da idade ($p=0.620$).

Indiscutivelmente os oócitos MII tiveram o melhor desempenho em todos os resultados expostos neste estudo, ratificando que o seu uso demonstra desfechos clínicos mais favoráveis nos ciclos de FIV. Entretanto, foi constatado que a quantidade e a qualidade desses ovócitos diminuem com o avanço da idade. Assim, a utilização de MI-MII deve ser estimulada nos centros de Fertilização *in vitro* como alternativa à baixa obtenção de oócitos maduros. mais pesquisas sobre este tema devem ser feitas, afim de buscar alternativas para minimizar os resultados negativos e a necessidade de tratamentos repetitivos e, conseqüentemente, aumentar a taxa de sucesso da fertilização *in vitro*.

REFERÊNCIAS

1. Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. Lancet 1976; 1:880.
2. Cha KY, Chain RC. Maturation *in vitro* of imature human oocytesfor clinical use. Hum Reprod Update 1998, 66:103-120.
3. Smitz J, Nogueira D, Vanhoutte L, de Matos DG, Cortvrindt R. Oocyte *in vitro* maturation. In Textbook of Assisted Reproductive Technology Volume Chapter 10. 2nd edition, Edited by: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Londen: Martin Dunitz LTD; 2004: 125-161.
4. Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Kasterstein M, Ron-El R. The outcome of ICSI of immature MI oocytes and rescued *in vitro* matured MII oocytes. Hum Reprod 2004, 19:1587-1590.

5. Stouffer RL, Zelinsk-Wooten MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: quality vs quantity. *ReprodBiolEndocrinol* 2004, 2:32.
6. Su YT, Lin PY, Huang FT, Lin YJ, Tsai YR, Lan KC. Age is a major prognosticator in extremely low oocyte retrieval cycles. *Fertil Steril* april 2017; Vol. 56;175-180.
7. Balakier H., Sojecki A., Motamed G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during methaphase II arrest. *Hum Reprod* 2004;19:982-7.
8. Vanhoutte L, De Sutter P, Van der Elst J., Dhont M. Clinical benefit of methaphase I oocytes. *Reprod Biol Endocrinil* 2005;3:71.
9. Chen SU, Chen HF, Lien YR, Ho HN, Chang HC, Yang YS. Schedule to inject *in vitro* matured oocytes may increase pregnancy after instracytoplasmatic sperm injection. *Arch Androl* 2000;44:197-205.
10. Álvarez C, Garcia-Garrido C, Taronger R, de Merlo GG. *In vitro* maturation, fertilization, embryo developmente and clinical outcome of human methaphase I oocytes retrivied from stimulated intracytoplasmatic sperm injection cycles. *Indian J Med Res* 137,February 2013;pp331-338.
11. Alcoba D.D., Pimentel A.M., Brum I.S., Corleta H.E. Developmental potential of *in vitro* or *in vivo* matured oocytes. *Zygote* 2015Feb;23(1):93-8. Eupub 2013 Jun 5.
12. De Vicentiis S., De Martino E., Buffone M.G. Use of metaphase I oocytes matured *in vitro* is associated with embryo multinucleation. *Fertil. Steril.* 2013 Feb;99:414-21. No 2, Vol. 99. 2013.
13. Shin SB, Cho JW, Lee SH, Yang KM, Lee HS. Fertilization and pregnancy potential of immature oocytes from stimulated intracytoplasmatic sperm injection cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2013;40(1):7-11.
14. Shu Y., Gebhardt J., Watt J., Lyon J., Dasig D., Behr B. Fertilizantion, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimuladesintracytoplasmatic sperm injection cycles. *FertilSteril* 2007 May;85(5):1022-7. Eupub 2007 jan 29.
15. De Vos A., Van de Velde H., Joris H., Van Steirteghem A. *In vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmatic sperm injection. *Hum. Reprod.* 14, 1859-63. 1999.
16. Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Marino H, Kitshoff MS, Sousa M. Ultrastructural evaluation of recurrent and *in vitro* maturation resistant metaphase I arrested oocytes. *Hum Reprod* 2001; 16,2394-2398.
17. Levran D, Farhi J, Nachum H, Glezerman M, Weissman A. Maturation arrest of human

- oocytes as a cause of infertility. Hum Reprod 2002; 17,1604-1609.
18. Hartshone G, Montgomery S, Klentzeris L. A case of failure oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*, Fertil Steril 1999; 71,567-570.
 19. Trounson AO, Anderiesz C, Jones GM. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. Reproduction 2001;121:51-75.
 20. Sanfins A, Plancha CE, Overstrom EW, Albertini DF. Meiotic spindle morphogenic in *in vivo* and *in vitro* matured mouse oocytes: insights into the relationship between nuclear and cytoplasmatic quality. Hum Reprod 2004;19:2889-99.
 21. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. Hum Reprod 2001;16:1464-8.
 22. Eichnlaub-Ritter U, Shen Y, Tinneberg HR. Manipulation of the oocyte: possible damage to the spindle apparatus. Reprod Biomed Online 2002;5:117-24.
 23. Nogueira D, Stassen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in-vitro matured oocytes. FertilSteril 2000;74:295-8.

ANEXO A**FICHA DE COLETA DE DADOS**

Prontuário: _____

Nome do paciente: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Data de Inclusão: ____/____/____ Idade na inclusão: ____

HÁBITOS:

Tabagismo: (0) não (1) sim ____ cigarros dia ____ tempo de uso em anos

Etilismo: (0) não (1) sim

(1) cerveja ____ copos semana (2) Vinho ____ copos semana (3) Destilados ____ copos semana

Drogas ilícitas: (0) não (1) sim. Qual e quanto tempo? _____

Atividade física: (0) não (1) sim.

HISTÓRIA GINECOLOGIA:

Menarca : _____

Ciclos menstruais: Regular (0) intervalo.....dias. Irregular (1) variação (min:.....max:..... dias)

Dismenorréia: (0) não (1) sim. TPM: (0) não (1) sim. Sinais ovulatórios: muco: (0) não (1) sim.

CONTRACEPÇÃO:

(0) nadaanos

(1) oral combinado:.....anos.

(2) oral progesterona:.....anos.

(3) DIU cobre:.....anos.

(4) DIU progesterona.....anos.

(5) Implante subdérmico.....anos.

(6) Anel vaginal.....anos.

(7) transdérmico.....anos.

(8) laqueadura/salpingec.....anos.

INFERTILIDADE: (1) primária (2) secundária**Tempo de infertilidade**.....anos.**Causas de infertilidade:**

(1) Tubário (2) Masculino (3) ISCA (4) Endometriose (5) Ovariano (6) Doença auto imune

(7) Hiperprolactinemia (8) Mioma uterino (9) SOP (10) DIP (11) outros _____

EXAMES PRÉ- FIV:

Dosagens hormonais:

3º dia do ciclo: FSH: _____ LH: _____ Estradiol: _____ HAM: _____

EXAMES COMPLEMENTARES NO CICLO FIV/ICSI:**Dosagens hormonais**

No dia do hCG: Estradiol: _____ Progesterona: _____ LH: _____

Ultrasonografia transvaginal

1º Eco : início da indução (basal)

OD: nº de folículos antrais:

OE: nº de folículos antrais:

Eco PRÉ PUNÇÃO: ____ dias de indução

Endometrio: Espessuramm

OD : (.....)folículos ≤12mm

(.....) folículos 12 a 14 mm

(.....)folículos 14,1 a 16,9mm

(.....)folículos ≥ 17mm

OE: (.....)folículos ≤12mm

(.....) folículos 12 a 14 mm

(.....)folículos 14,1 a 16,9mm

(.....)folículos ≥ 17 mm**TIPO DE PROTOCOLO:**

(1) Agonista Longo (2) Antagonista

VARIÁVEIS AVALIADAS NO LABORATÓRIO:

No. folículos identificados:

No. MII ____ No. MI ____ No. MI-MII ____ No.VG ____ No. ZR ____ No. ATR ____

EVOLUÇÃO DOS MII FERTILIZADOS:**D0 do embrião:** ≤ 5 cel(....) 6cel(.....) 7cel(.....) 8cel(....) ≥ 9 cel

N°. oócitos injetados MII: :(.....)

(....)

D1 embrião:

sem pn(....) 2pn(.....) 3pn ou mais(.....)

D5 embrião

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

D2 embrião:1 cel(....) 2cel(.....) 3cel(.....) 4cel(....) ≥ 5 cel**D6 embrião**

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

(....)

D3 embrião**EVOLUÇÃO DOS MI FERTILIZADOS:****D0 do embrião:** ≤ 5 cel(....) 6cel(.....) 7cel(.....) 8cel(....) ≥ 9 cel

N°. oócitos injetados MI: :(.....)

(....)

D1 embrião:

sem pn(....) 2pn(.....) 3pn ou mais(.....)

D5 embrião

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

D2 embrião:1 cel(....) 2cel(.....) 3cel(.....) 4cel(....) ≥ 5 cel**D6 embrião**

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

(....)

D3 embrião**EVOLUÇÃO DOS MI-MII FERTILIZADOS****D0 do embrião:**

N°. oócitos injetados MI-MII: :(.....)

 ≤ 5 cel(....) 6cel(.....) 7cel(.....) 8cel(....) ≥ 9 cel**D1 embrião:**

(....)

sem pn(....) 2pn(.....) 3pn ou mais(.....)

D5 embrião

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

D2 embrião:1 cel(....) 2cel(.....) 3cel(.....) 4cel(....) ≥ 5 cel**D6 embrião**

Blastocistos G1 (....) Blastocistos G2(.....) não formou(.....)

(....)

D3 embrião