

Maturação *in Vitro* de Oócitos Provenientes de Ciclos Estimulados para Tratamento com Técnica de Reprodução Assistida

In Vitro Maturation of Oocytes Retrieved After Superovulation in Assisted Reproduction Treatment Cycles

Bossi, Renata; Sales, Liana; Ventura, Bernadete; Sampaio, Marcos; Geber, Selmo
ORIGEN – Centro de Medicina Reprodutiva

Belo Horizonte – Minas Gerais – Brasil
Recebido: 17/02/2004
Avaliado e aceito: 25/02/2004

Abstract

Although superovulation protocols have been used in assisted reproduction treatment for many years many oocytes are still being retrieved at GV stage and therefore are not suitable to use for insemination purposes. The possibility to mature the GV oocytes in vitro offers the opportunity to increase the number of oocytes suitable to be inseminated and consequently might increase the number of embryos to be transferred or frozen. Also, it might reduce the treatment cost. The aim of our study was to evaluate the incidence of in vitro maturation of oocytes in a culture medium without hormonal supplementation, within 24 and 48 hours after retrieval.

A total of 44 patients submitted to IVF that donated their immature oocytes for research were included in the study. All patients had the same superovulation protocol. Once

the follicles reach the size of 17 mm, 10.000 IU of hCG was administered to induce maturation. Oocyte retrieval was performed ~ 34hs later. The GV stage oocytes were placed in 20 µL droplets of hormone free culture media. After 24 hours, oocytes were analyzed and those who presented polar body were considered mature. The remainders were placed in fresh droplets of the same culture media. After more 24 hours oocytes were reanalyzed.

Correspondência para:
Av. Contorno, 7747 - Lourdes
CEP 30010-020 - Belo Horizonte/MG
Tel: (31) 3292-6363
E-mail: origen@origen.com.br

A total of 134 GV stage oocytes were included in our study. After 24 hours, 57.5% of the oocytes were at metaphase II and after 48 hours 63.4% of all GV stage oocytes did reach metaphase II stage. The comparison between the two periods of time did not show statistical significance ($p = 0.16$), demonstrating that the further 24 hours culture did not increase the maturation rate. Our study demonstrates that in vitro oocyte maturation in a hormone free culture media is a feasible procedure. Also, we did observe that extending the maturation time does not increase the maturation rate.

Key words: *oocyte maturation/culture medium/germinal vesicle.*

Introdução

As técnicas de reprodução assistida (TRA) vêm sendo utilizadas como uma excelente alternativa para o tratamento da infertilidade conjugal há mais de 25 anos (Edwards, 2003). Um dos mais importantes passos é obter oócitos em estágio de metáfase II (MII), de forma a se poder utilizá-los para a fertilização assistida e, posteriormente, obter os embriões a serem transferidos para o útero materno. Mais ainda, quanto maior o aproveitamento, maior a quantidade de embriões disponíveis para a transferência.

Para que este objetivo seja alcançado, administra-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) aproximadamente 36 horas antes da aspiração folicular, de modo a induzir a retomada da meiose oocitária (Valle *et al.*, 2002). Apesar do uso rotineiro, nem sempre o efeito observado sobre os oócitos é o mesmo. Segundo Trounson *et al.*, (2001), 5 a 7% dos oócitos aspirados de mulheres com a superovulação para FIV são imaturos, isto é, em estágio de vesícula germinal (VG). Cha e Chian (1998) observaram que 10 a 15% dos oócitos encontravam-se no estágio de vesícula germinal após aspiração folicular.

O real motivo pelo qual estes oócitos não completam a maturação nuclear ainda não é completamente conhecido, mas especula-se que os respectivos folículos podem ser resistentes ou menos suscetíveis à estimulação hormonal (Farhi *et al.*, 1997), podem ser atresícos (Goud *et al.*, 1998) ou podem estar no estágio inicial de desenvolvimento (Kim *et al.*, 2000).

A possibilidade de que a maturação oocitária seja completada *in vitro* após a aspiração vem sendo aventada nas últimas décadas, com o objetivo de se tentar otimizar ainda mais o tratamento pela técnica de reprodução assistida, uma vez que se poderia aproveitar o maior número de oócitos. O primeiro estudo em gametas femininos foi realizado por Pincus & Enzmann (1935), que avaliaram a maturação de oócitos *in vitro*. Neste trabalho, os autores observaram que oócitos de coelhos obtidos de ciclos não-estimulados, ao serem retirados dos folículos maduros, continuaram o processo de meiose. (Salha *et al.*, 1998).

Foi somente três décadas depois que Robert Edwards demonstrou que oócitos humanos imaturos retirados do folículo pré-ovulatório, obtidos de fragmentos de ovário e colocados em meio de cultura apropriado passavam espontaneamente do estágio de vesícula germinal para metáfase II *in vitro* (Edwards, 1965).

A primeira FIV com oócitos humanos maturados *in vitro* realizada com êxito foi reportada por Edwards (1969). Somente depois da descrição do primeiro nascimento após uso da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) é que novos estudos foram realizados para maturar oócitos *in vitro* (Steptoe & Edwards, 1978).

A possibilidade de se proceder a maturação de oócitos em estágio de vesícula germinal *in vitro* pode oferecer a vantagem de aumentar o número de oócitos disponíveis para a inseminação *in vitro*, incrementando o aproveitamento dos mesmos após o estímulo e, em vários casos, podendo até mesmo elevar as chances de ocorrer uma gestação. A maturação *in vitro* pode, ainda, proporcionar diminuição do estímulo ovariano, o que diminui o risco de síndrome de hiperestímulo. Além disso, pode-se reduzir o custo do tratamento de infertilidade, tornando-o mais acessível à população. A maturação *in vitro* de oócitos auxilia, também, o entendimento dos eventos moleculares e celulares envolvidos no processo (Salha *et al.*, 1998).

Diversas alternativas têm sido propostas para aprimorar o processo de maturação *in vitro*, e para cada uma delas diversos resultados têm sido obtidos. Veeck *et al.* (1983) incubaram oócitos imaturos durante 35 horas em meio Ham's F-10 suplementado com 7,5% de soro humano do cordão umbilical. Prins *et al.* (1987) verificaram que as taxas de maturação poderiam ser aumen-

tadas se gonadotrofinas fossem adicionadas ao meio de cultivo. Dandekar *et al.* (1991) testaram cultivar oócitos imaturos utilizando células da granulosa de folículos pré-ovulatórios. Gómez *et al.* (1993) cultivaram oócitos imaturos com as células do *cumulus*, obtidos de ciclos estimulados com FSH, hMG e hCG, estimulados com FSH e hMG somente ou não-estimulados, em meio B2 (Ménézo). Janssenswillen *et al.* (1995) verificaram a eficácia da co-cultura de oócitos imaturos sem *cumulus* com células Vero. Farhi *et al.* (1997) testaram o cultivo dos oócitos imaturos juntamente com espermatozóides e células do *cumulus*. Goud *et al.* (1998) investigaram o efeito da suplementação do meio de cultivo M-199 com EGF na maturação de oócitos *in vitro*. Kim *et al.* (2000) cultivaram as vesículas germinais no meio Tyrode's modificado, suplementado com 10% de líquido folicular inativado com ou sem *cumulus*. Cekleniak *et al.* (2001) compararam as taxas de maturação *in vitro* de oócitos no meio P1 sem glicose e no meio TC199. Hardy *et al.* (2002) cultivaram os oócitos imaturos em *minimal essential media* (MEM) e no TCM199 suplementados com 0,4% de albumina sérica humana.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de maturação de oócitos humanos no estágio de vesícula germinal, *in vitro*, e comparar seu efeito 24 e 48 horas após a aspiração folicular, em meio de cultura sem suplementação hormonal.

Material e Métodos

Indução da superovulação

Foram incluídas neste estudo as pacientes submetidas a tratamento de infertilidade conjugal pela técnica de reprodução assistida, no período de novembro de 2002 a outubro de 2003, na Clínica ORIGEN – Belo Horizonte.

Todas as pacientes incluídas no estudo foram submetidas à indução da superovulação. O tratamento iniciava com a administração do análogo do GnRH para dessensibilização da hipófise (Geber *et al.*, 2002). Após a confirmação através de ultra-sonografia endovaginal e da dosagem do estradiol sérico, iniciava-se a indução da superovulação com gonadotrofinas. A dose era adequada de acordo com a resposta individual, monitorada através da ultra-sonografia seriada e

da dosagem de estradiol. Quando os folículos alcançavam diâmetro médio de 17 mm e os níveis de estradiol encontraram-se compatíveis, administrava-se hCG, na dose de 10.000 UI, por via intramuscular. A punção folicular era realizada aproximadamente 34 horas após.

Fertilização *in vitro* e maturação de oócitos

Os oócitos foram desnudados enzimática e mecanicamente, e o estágio de maturação era confirmado em microscópio invertido (Nikon – Japão), utilizando aumento de 400 X. Eram classificados como imaturos ou vesícula germinal se possuísem núcleo contendo um nucléolo; maturidade intermediária ou metáfase I (MI) se não possuísem corpúsculo polar e núcleo com nucléolo; maduros ou metáfase II (MII) se possuísem corpúsculo polar no espaço perivitelínico.

Os oócitos em estágio MII foram inseminados pela técnica de FIV clássica ou por ICSI, de acordo com a indicação. Os oócitos em estágio VG, doados para o estudo, foram então incubados para análise da maturação *in vitro*. Inicialmente, os VG foram colocados em placas de cultivo de 60 mm X 15 mm (Corning – EUA) contendo gotas de 20 μ l de meio de cultura Earle (Sigma – EUA) suplementado com 10% de substituto sintético do soro (SSS) (Irvine Scientific – EUA) e 0,47 mM de piruvato (Sigma – EUA), cobertas com óleo mineral (Sigma – EUA) pré-filtrado e incubados durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37° C (Geber *et al.*, 2002).

Passado este período, os oócitos foram avaliados para verificar o estágio de maturação. Os oócitos que não se encontravam no estágio MII foram mantidos em cultura por mais 24 horas, e posteriormente avaliados com relação ao grau de maturação. Os resultados obtidos nas 24 horas foram então comparados com o observado em 48 horas.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de *student* para amostras pareadas e análise de correlação para avaliação do efeito da idade sobre a incidência de oócitos em estágio de VG. Foi considerado $p < 0,05$ como nível de significância estatística.

Resultados

Um total de 326 mulheres submetidas a tratamento de infertilidade conjugal pelas técnicas de reprodução assistida foi avaliado, no período de 4 de novembro de 2002 a 15 de outubro de 2003. A idade variou de 15 a 44 anos, com média de $34,7 \pm 5,08$ anos.

Foram obtidos 4.320 oócitos das 326 pacientes, dos quais 3.425 (79%) eram metáfase II, 554 (13%) eram metáfase I e 341 (8%) eram VG. O total de oócitos obtidos por paciente variou de 1 a 48, com média de $13,25 \pm 9,15$.

Quando estudamos os efeitos da idade da paciente sobre a proporção de VG, não identificamos qualquer efeito significativo ($p = 0,358$), o que demonstra que o número de VG não foi influenciado pela idade (Figura 1).

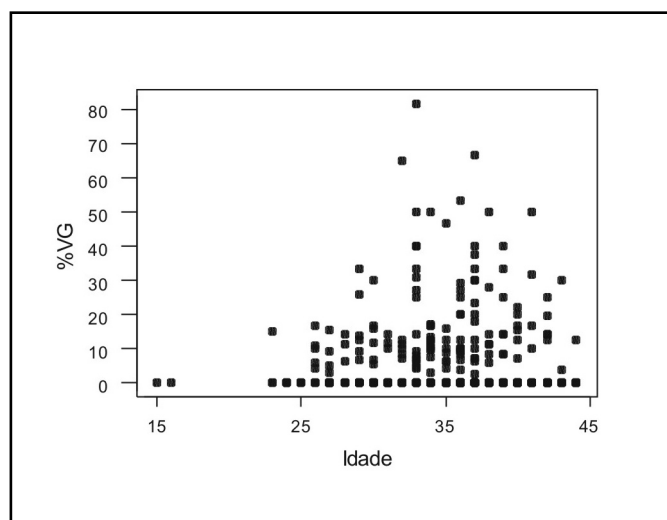


Figura 1 – Correlação entre idade das pacientes e proporção de vesículas germinais.

Cento e oitenta e nove pacientes (58%) não apresentaram oócitos em estágio VG, sendo assim excluídas da avaliação. No grupo de 137 mulheres que apresentaram pelo menos um VG, o número total de oócitos obtidos foi 2.254, sendo 341 (15,12%) em estágio VG, com média de $2,5 \pm 2,3$, tendo sido encontrado um máximo de 15. Quando avaliamos a porcentagem de VG por paciente, encontramos uma variação de 2,5 a 82% (mediana = 12,5%).

Para análise da maturação *in vitro*, foram incluídos os oócitos em estágio VG de 44 pacientes (idade média de $36 \pm 3,2$; variação de 27 a 43 anos). O número total de oócitos obtidos foi de 678, com média de $15,4 \pm 8,8$ (variação de 3 a 39) por paciente. Destes, 134 (21,7%) encontravam-se em estágio VG. A média de oócitos em estágio VG, por paciente, na amostra foi de $3 \pm 3,0$, variando de 1 a 15. A porcentagem de VG por paciente neste grupo variou de 4,2 a 75%.

Do total de 134 VG estudados, 77 (57,5%) apresentaram maturação *in vitro* nas primeiras 24 horas de cultura, sendo que 21 (15,7%) atingiram o estágio MI e 56 (41,8%) atingiram o estágio MII (Tabela I). Dois oócitos (1,5%) apresentaram divisão celular (partenogênese).

Os oócitos foram observados após mais 24 horas, e dos 55 VG que não haviam sofrido processo de maturação inicialmente, oito (14,5%) apresentaram maturação *in vitro*, sendo três para MI e cinco para MII (Tabela I). Observamos também que dois oócitos (3,6%) apresentaram fenômeno de partenogênese. Ao final do período de 48 horas, 45 oócitos (33,6%)

Tabela I
Maturação de Oócitos In Vitro

Estágio	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Final
VG	134	55 (41%)	45 (81,8%)	45 (33,6%)
MI	–	21 (15,7%)	3 (5,5%)	13 (9,7%)
MI	–	56 (41,8%)	5 (9%)	68 (50,7%)
MI + MII	–	77 (57,5%)	8 (14,5%)	85 (63,4%)

permaneceram em estágio VG, 85 (63,4%) passaram pelo processo de maturação *in vitro* e quatro apresentaram divisão celular sem que tivéssemos identificado a maturação celular. A partenogênese foi observada também em quatro oócitos que haviam amadurecido nas primeiras 24 horas, perfazendo um total de oito embriões partenogênicos no final do estudo.

Quando comparamos a incidência de maturação *in vitro* nas primeiras 24 horas com o obtido no período total, isto é, somados os dois períodos (Tabela I), observamos que não houve uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,16$).

Discussão

O presente estudo confirmou a possibilidade de maturar oócitos em estágio VG expostos ao efeito do hCG, *in vivo*, em meio de cultura sem a adição de hormônios. Do total de oócitos obtidos, 341 (8%) encontravam-se em estágio VG, o que está em acordo com o encontrado por Cha & Chian (1998), que identificaram 10 a 15% de imaturidade, e com Trounson *et al.* (2001), que observaram 5 a 7% de imaturidade. Estes resultados foram inferiores ao encontrado por Veeck *et al.* (1983), Prins *et al.* (1987), Goud *et al.* (1993), Janssenswillen *et al.* (1995), Farhi *et al.* (1997) e Hardy *et al.* (2002), que descreveram uma incidência de imaturidade superior a 15%. O único estudo em que foi encontrada frequência menor que 5% foi o de Avrech *et al.* (1997), que observaram 4,4% de imaturos de um total de 3.520 oócitos.

Quando as pacientes que não apresentaram oócitos imaturos foram excluídas do estudo, a frequência passou a ser de 15,12% (341 VG de 2.254 oócitos). Ainda assim, a frequência se manteve semelhante à observada na maioria dos estudos. Uma possível explicação para esta variação observada na literatura seria a seleção do grupo de estudo, pois, como visto nos resultados do presente trabalho, quando são incluídas todas as pacientes a frequência é de 8%.

Com relação à idade das pacientes, não se observou correlação entre o envelhecimento e a incidência de oócitos imaturos, ou seja, a idade da mulher não influenciou o número de vesículas germinais.

Uma revisão da literatura mostrou a carência de estudos que enfatizassem esta possível correlação. De todo modo, a ausência desta parece ser um bom sinal, principalmente para as mulheres com idade avançada que necessitam submeter-se a tratamento de FIV.

No presente estudo foi obtida uma média de 2,5 oócitos em VG por paciente, sendo semelhante à média de VG obtida por Janssenswillen *et al.* (1995), que foi de 2,4 por paciente, e inferior à observada por Nogueira *et al.* (2000), que observaram uma média de 4,1.

Os resultados demonstraram uma taxa de maturação *in vitro* de 63,4% no período de 48 horas pós-aspiração, com os oócitos mantidos em meio de cultura sem suplementação hormonal. Estes achados são semelhantes aos observados na literatura para os estudos que também não suplementaram o meio de cultura com hormônios. Comparando-se as taxas de maturação de VG cultivadas em meio sem adição de hormônios, sem co-cultivo e sem espermatozóides com as obtidas no presente estudo após 24 horas, nossos resultados foram superiores aos demais (57,5%). Para alguns estudos, as taxas do presente estudo apresentaram-se superiores, mesmo quando os oócitos imaturos foram cultivados em meio com hormônios, em co-cultivo e com espermatozóides.

Dentre os estudos que utilizaram suplementação hormonal, o de Prins *et al.* (1987) apresentou taxas de maturação superiores às por nós observadas; entretanto, os autores utilizaram número muito reduzido de oócitos. Mais recentemente, Goud *et al.* (1998) também observaram maior taxa de maturação *in vitro*, mas, da mesma forma, o número estudado de oócitos imaturos foi reduzido, pois subgrupos foram criados, podendo induzir a algum viés na conclusão. No trabalho realizado por Cekleniak *et al.* (2001), as taxas obtidas foram inferiores às obtidas no presente estudo. Conseqüentemente podemos sugerir, através destas comparações, que não existe diferença entre cultivar os oócitos em meio de cultura com ou sem suplementação hormonal.

Por fim, ao analisarmos os nossos resultados, que comparam as taxas de maturação nas primeiras 24 horas com as obtidas após 48 horas acumuladas, não observamos diferenças significativas. Este resultado demonstra que não se justifica aguardar um período mais prolongado para obter maior número de oócitos maduros. Podemos concluir, com este estudo, que a maturação de oócitos *in vitro* pode ocorrer com sucesso quando estes são obtidos de ciclos estimulados e cultivados em meio sem a necessidade de suplementação hormonal.

A maturação de oócitos *in vitro* vem se mostrando uma técnica bastante promissora, porém deve ser realizada com cautela até que mais estudos comprovem sua real eficiência em proporcionar gestação normal e que, a partir daí, possa ser utilizada de forma rotineira quando do uso de técnicas de reprodução assistida.

Resumo

Os estudos sobre maturação de oócitos *in vitro* iniciaram-se em 1935, com Pincus e Enzmann, e após o nascimento da primeira criança por FIV, grandes avanços foram observados nas técnicas de reprodução humana assistida. O presente estudo avaliou 326 pacientes submetidas a superovulação para realização de FIV. Observou-se que 8% dos oócitos destas pacientes eram imaturos. Uma amostra de 44 pacientes foi estudada objetivando-se verificar a taxa de maturação *in vitro* de oócitos em vesícula germinal, após 24 e 48 horas de cultivo. Destas, obteve-se um total de 134 oócitos imaturos, que foram incubados em meio de cultura sem suplementação de hormônios. Após este tempo, se fosse observada a presença de corpúsculo polar, esses oócitos eram considerados maduros ou em metáfase II. Caso não houvesse corpúsculo polar e vesícula germinal, os oócitos eram considerados em metáfase I. Esses e os que ainda possuíam vesícula germinal voltaram para estufa por mais 24 horas, quando foram observados novamente. A taxa de maturação ao final de 24 horas foi de 57,5 e de 63,4% ao final de 48 horas. Podemos concluir, com este estudo, que a maturação de oócitos *in vitro* pode

ocorrer com sucesso quando estes são obtidos de ciclos estimulados e cultivados em meio sem a necessidade de suplementação hormonal. Mais ainda, a manutenção do processo por mais 24 horas não aumenta a taxa de maturação.

Unitermos: *maturação in vitro, vesícula germinal, oócitos imaturos*

Referências

1. Avrech O. M., Goldman G. A., Rufas O., Stein A., Amit S., Yoles I., Pinkas H., Fisch B. – Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J. Assist. Reprod. Gen.*, v. 14, n. 6, 337-342, 1997.
2. Cekleniak N. A., Combelles C. M. H., Ganz D. A., Fung J., Albertini D. F., Racowsky C. – A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil. Steril.*, v. 75, n. 6, 1185-1193, 2001.
3. Cha K., Chian R. – Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reprod. Update*, v. 4, n. 2, 103-120, 1998.
4. Dandekar P. V., Martin M. C., Glass R. H. – Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil. Steril.*, v. 55, n. 1, 95-99, 1991.
5. Edwards R. G. – Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, v. 2, 926-929, 1965.
6. Edwards R. G. – Introducción: los comienzos de la fertilización in vitro y sus derivados. *In: Riquez F., Edwards R. Reproducción asistida moderna. Buenos Aires: Reproductive Health Care, Cap. 1, 19-34, 2003.*
7. Farhi J., Nahum H., Zakut H., Levran D. – Incubation with sperm enhances in vitro maturation of the oocyte from the germinal vesicle to the metaphase II stage. *Fertil. Steril.*, v. 68, n. 2, 318-322, 1997.
8. Geber S., Sales L., Sampaio M. A. C. – Laboratory techniques for human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 5 (2):211-218, 2002.
9. Geber S., Sales L., Sampaio M. A. C. – Comparison between a single dose of goserelin and multiple daily doses of leuprolide acetate for pituitary suppression in IVF treatment: a clinical endocrinological study of the ovarian response. *Journal of Assist. Reprod. Genetics*, 19 (7):293-298, 2002.
10. Gómez E., Tarín J. J., Pellicer A. – Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.*, v. 60, n. 1, 40-46, 1993.
11. Goud P. T., Goud A. P., Qian C., Laverge H., Van der Elst J., De Sutter P., Dhont M. – In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cell and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reprod.*, v. 13, n. 6, 1638-1644, 1998.
12. Hardy K., Franks S., Roberts R. – Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Human Reprod.*, v. 17, n. 11, 2950-2956, 2002.
13. Janssenswillen C., Nagy P., Van Steirteghem, A. – Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. *Human Reprod.*, v. 10, n. 2, 375-378, 1995.

14. Kim B., Lee S., Kim K., Han C., Kim J. – In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil. Steril.*, v. 74, n. 6, 1153-1158, 2000.
15. Nogueira D., Staessen C., Van de Velde H., Van Steirteghem A. – Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil. Steril.*, v. 74, n. 2, 295-298, 2000.
16. Prins G. S., Wagner C., Weidel L., Gianfortoni J., Marut E. L., Scommegna A. – Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil. Steril.*, v. 47, n. 6, 1035-1037, 1987.
17. Salha O., Abusheika N., Sharma V. – Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reprod. Update*, v. 4, n. 6, 816-832, 1998.
18. Trounson A., Anderiesz C., Jones G. – Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, v. 1, n. 121, 51-75, 2001.
19. Valle M., Sampaio M. A. C., Lemgruber M., Geber S. – Comparison between the effect of 10.000 IU and 5.000 IU of hCG, on the incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.*, 76 (3S):89, 2002.
20. Veeck L. L., Wortham Jr. E., Witmyer J., Sandow B. A., Acosta A. A., Garcia J. E., Jones G. S., Jones Jr. H. W. – Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, v. 39, n. 5, 594-602, 1983.