



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**UTILIZAÇÃO DO CORANTE AZUL CRESIL BRILHANTE COMO MÉTODO DE SELEÇÃO DE  
OÓCITOS HUMANOS DESTINADOS À MATURAÇÃO *IN VITRO***

Aluno: Diego Duarte Alcoba

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, março de 2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pela confiança depositada em mim, pela presença e orientação constantes e, principalmente, por me permitir traçar e desenvolver minhas ideias.

À minha coorientadora, Dra. Helena von Eye Corleta, que me acompanha desde minha graduação e sempre depositou em mim muita confiança. Obrigado pelas palavras de ânimo, sempre nos momentos necessários.

À Dra. Edimarlei, pelo auxílio no experimento, sem o qual seria impossível realizar; e à Maiara Conzatti, por dividir cada vitória do experimento ao meu lado no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e a todos os seus Docentes, que possibilitaram meu aprendizado e crescimento acadêmico.

Aos meus eternos Mestres, que me iniciaram na caminhada acadêmica: Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, Profa. Dra. Mônica Fernandes, Profa. Elisabeth de Castro e Dra. Anita Mylius Pimentel. Obrigado pelos ensinamentos que carrego comigo até hoje e pelo laço de amizade que foi criado.

A todos os meus colegas de laboratório: Gustavo Ferreira, Ana Satin, Patrícia Martini, Ana Paula Kussler, Vanderlei Biolchi, Gisele Branchini, Fernanda Seibel, Amanda Machado, Carlos Flores, Gabriela Sant'Anna, Caroline Hillebrand, Laura Bessestil, Carolina Luft e Joelson Tomedi, por manterem um ambiente de trabalho agradável e tranquilo.

Aos meus amigos David Kvitko, Gabriela Esteves, Joana Souza, Mariana Rosa, Andreia Garcia, Bárbara Martineli, Gabriela Roncato e Francine Dalpian, pelos momentos de descontração.

À minha família: meu irmão, Rafael Duarte Alcoba, minha dinda, Suzana Duarte e minha tia, Vera Regina, por estarem sempre ao meu lado não me deixando desanimar; agradeço especialmente ao Tiago Schmitz, pela paciência e companheirismo e por sempre apoiar e compreender minhas escolhas e minha dedicação.

Aos responsáveis pelo que sou hoje e por todas as minhas conquistas: minha mãe, Sandra Souza Duarte, e meu pai, Syllas Alcoba Ruiz Júnior. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, entendendo minha ausência, quando necessário, e me motivando a seguir sempre em frente. Vocês são os meus maiores exemplos.

## SUMÁRIO

1.	LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
2.	LISTA DE TABELAS .....	6
3.	LISTA DE FIGURAS .....	7
4.	RESUMO .....	8
5.	ABSTRACT .....	10
6.	INTRODUÇÃO .....	11
7.	HIPÓTESES OPERACIONAIS ( $H_0$ ) E CONCEITUAIS ( $H_c$ ) .....	29
8.	OBJETIVOS .....	31
9.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
10.	RESULTADOS .....	43
11.	DISCUSSÃO .....	54
12.	CONCLUSÕES .....	64
13.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
14.	ANEXOS .....	75

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

°C	.....	Graus Celsius
CCO	.....	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CO	.....	Centro Obstétrico
CO <sub>2</sub>	.....	Dióxido de Carbono
CP	.....	Corpúsculo Polar
ECM	.....	Meio de clivagem inicial ( <i>Early Cleavage Medium</i> )
FIV	.....	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	.....	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	.....	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	.....	Gonadotrofina Coriônica Humana
HCPA	.....	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HMV	.....	Hospital Moinhos de Vento
HTF	.....	Fluido tubário humano ( <i>Human Tubal Fluid</i> )
ICSI	.....	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide ( <i>Intracytoplasmic sperm injection</i> )
LaBiMET	.....	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
LaGOM	.....	Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular
LH	.....	Hormônio Luteinizante
MI	.....	Metáfase I
MII	.....	Metáfase II
MPF	.....	Fator promotor de maturação
MIV	.....	Maturação <i>in vitro</i>
PI	.....	Prófase I
PIV	.....	Produção <i>in vitro</i>

PM ..... Placa metafásica

QVG ..... Quebra da vesícula germinativa

RA ..... Reprodução Assistida

SOP ..... Síndrome do Ovário Policístico

SSS ..... Suplemento substituto de soro (*Substitute Supplement Serum*)

VG ..... Vesícula Germinativa

## 2. LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes submetidas à estimulação hormonal (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 45

**Tabela 2** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes ooforectomizadas (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 45

**Tabela 3** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes que realizaram cesárea (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 47

**Tabela 4** – Avaliação da Retomada de Meiose (RM) dos gametas recuperados das pacientes submetidas à ooforectomia e cesárea (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 47

**Tabela 5** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas dos oócitos recuperados de todas as pacientes analisadas em conjunto (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 49

**Tabela 6** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes submetidas à estimulação hormonal (Controle; BCB) ..... página 49

**Tabela 7** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes submetidas à ooforectomia (Controle; BCB) ..... página 50

**Tabela 8** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes que realizaram cesárea (Controle; BCB) ..... página 50

**Tabela 9** – Avaliação da Retomada de Meiose (RM) dos gametas das pacientes submetidas à ooforectomia e cesárea (Controle; BCB) ..... página 51

**Tabela 10** – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas dos gametas de todas as pacientes analisadas em conjunto (Controle; BCB) ..... página 51

**Tabela 11** – Avaliação da taxa de degeneração dos oócitos das pacientes submetidas à ooforectomia, estimulação hormonal, cesárea e todas as pacientes em conjunto (Controle; BCB +; BCB -) ..... página 53

**Tabela 12** – Avaliação da taxa de degeneração dos oócitos das pacientes submetidas à ooforectomia, estimulação hormonal, cesárea ou todas as pacientes em conjunto (Controle; exposto ao BCB) ..... página 53

### 3. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Maturação oocitária: processos de divisão do material genético do oócito ..... página 12
- Figura 2** – Relação entre a atividade (A) e a atividade específica (B) da enzima G6PDH de acordo com o diâmetro do oócito de murinos ..... página 17
- Figura 3** – Esquematização do processo de seleção dos gametas competentes para a MIV através da coloração com BCB ..... página 18
- Figura 4** – Atividade específica da enzima G6PDH de gametas controle e expostos ..... página 19
- Figura 5** – Desenho experimental realizado para os gametas das pacientes submetidas à estimulação hormonal para tratamento de infertilidade ..... página 34
- Figura 6** – Esquematização temporal do desenho experimental realizado para os oócitos das pacientes submetidas à estimulação hormonal que foram incluídos na pesquisa ..... página 34
- Figura 7** – Esquematização temporal do desenho experimental dos oócitos recuperados após ooforectomia e após.. cesariana ..... página 35
- Figura 8** – Oócitos oriundos de pacientes submetidas à estimulação hormonal após exposição ao corante BCB: (A) BCB positivo; (B) BCB negativo. Magnitude de 200x ..... página 37
- Figura 9** – Oócitos humanos imaturos em estágio de PI após 48 horas de MIV ..... página 39
- Figura 10** – Gametas humanos maduros em estágio de MII após 48 horas de MIV ..... página 40
- Figura 11** – Oócitos humanos imaturos em estágio de MI após 48 horas de MIV ..... página 41

#### 4. RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos é uma técnica de Reprodução Assistida (RA) que apresenta inúmeras vantagens e aplicabilidades. No entanto, a qualidade dos gametas imaturos que são destinados a ela é bastante divergente, tornando-se necessário o desenvolvimento de técnicas que auxiliem na seleção dos gametas competentes, ou seja, aptos à MIV. A partir do conhecimento de que oócitos em fase de crescimento apresentam alta atividade específica da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), e que oócitos que finalizaram seu crescimento apresentam baixa atividade específica dessa enzima, foi proposta a coloração dos gametas com o corante Azul Cresil Brilhante (BCB) como método de seleção dos oócitos competentes. Esse corante é capaz de ser metabolizado pela G6PDH, resultando na coloração dos gametas capacitados (classificados como BCB positivo), mas não dos gametas que ainda estão em fase de crescimento, que permanecem incolores e são classificados como BCB negativo. Em animais, foi demonstrado que essa técnica permite selecionar melhor os gametas e, conseqüentemente, aumentar não só as taxas de maturação oocitária nuclear e citoplasmática, como também as taxas de fertilização, de formação de blastocisto e de nascidos vivos. No entanto, apenas modelos animais foram utilizados até o presente momento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência e a segurança da exposição de gametas humanos ao BCB como método de seleção de gametas competentes antes da MIV. Para isso, três diferentes perfis de pacientes tiveram seus oócitos imaturos incluídos no estudo: 6 pacientes cuja ovulação foi induzida e gametas imaturos foram captados (17 oócitos); 3 pacientes ooforectomizadas (20 oócitos recuperados); e 32 gestantes cujos oócitos foram captados durante a cesareana (92 oócitos recuperados). Os oócitos imaturos foram divididos em dois grupos: controle (colocado imediatamente para MIV) e tratado – exposto a 26 µM de BCB por 60 minutos. Após coloração, de acordo com a coloração do citoplasma, o grupo tratado foi classificado em BCB positivo ou negativo e destinado à MIV. Após 24 e 48 horas de MIV, foi avaliado o grau de maturação nuclear. A taxa de MIV dos oócitos recuperados de pacientes estimuladas e ooforectomizadas foi igual entre os grupos após 24 e 48 horas. No entanto, a taxa de MIV foi significativamente superior no grupo BCB positivo quando comparado com o grupo BCB negativo, tanto para os oócitos de todas as pacientes ( $P = 0,024$  e  $P = 0,015$ ) como quando os oócitos das gestantes ( $P = 0,004$  e  $P = 0,032$ ) foram avaliados separadamente, após 24 e 48 horas de MIV, respectivamente. O grupo controle



foi similar ao grupo BCB positivo. A taxa de retomada de meiose (ausência de vesícula germinativa) após 24 horas foi igual entre os grupos, independente da fonte de recuperação dos gametas. Contudo, ao avaliar todos os gametas após 48 horas de MIV, a taxa de retomada de meiose foi superior no grupo BCB positivo, quando comparado com os demais grupos ( $P = 0,035$ ). Quando os oócitos foram avaliados em conjunto, o grupo BCB positivo apresentou as menores taxas de degeneração ( $P = 0,002$ ). Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que o BCB pode ser um bom marcador na seleção de oócitos humanos competentes e não é tóxico para o gameta humano.

## 5. ABSTRACT

The in vitro maturation (IVM) is an Assisted Reproduction Technique (ART) that presents many advantages. However, the quality of immature oocytes destined to IVM is very divergent. That's why pre-selection procedures of developmentally competent oocytes are important. Growing oocytes synthesize glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), but this enzyme is inactivated in oocytes that have completed their growth phase. Once Brilliant Cresyl Blue (BCB) can be reduced by G6PDH, it is suggested that BCB staining can select fully grown oocytes, when exposed to BCB – the cytoplasm of these eggs will appear blue, being classified as BCB positive, whereas oocytes still in growth phase will not be stained (cytoplasm will appear colourless, being classified as BCB negative). It has been already demonstrated that this selection can improve not only nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, but also fertilization and blastocyst rates. However, only animal models were utilized until the present. Consequently, the aim of the experiment was to evaluate the efficiency and safety of BCB staining as a selection of developmentally competent immature human oocytes before IVM. Three kinds of patients were included in the study: 6 hormonal stimulated patients with immature oocytes at retrieval (17 oocytes); 3 oophorectomized patients (20 oocytes recovered); and 32 pregnant patients during cesarean section (92 oocytes recovered). Immature oocytes were divided into groups: control (disposed directly to IVM) and treated - exposed to BCB 26 $\mu$ M during 60 minutes. After staining, treated group was classified as cytoplasm coloration, BCB positive or negative, and then disposed to IVM. After 24 and 48 hours of IVM, nuclear status was checked. The IVM rate of immature oocytes recovered from stimulated and oophorectomized patients was equal among groups either after 24 or 48 hours of IVM. Nevertheless, IVM was higher in BCB positive compared to BCB negative after 24 and 48 hours of IVM analyzing oocytes recovered from all patients ( $P = 0.024$  and  $P = 0.015$ ), and from cesarean patients ( $P = 0.004$  and  $P = 0.032$ ). The control group was equal to BCB positive. The meiosis resumption rate (absence of germinal vesicle) after 24 hours of IVM was equal among groups, but higher in BCB positive compared to other groups after 48 hours when all gametes were analyzed jointly ( $P = 0.035$ ). Degeneration rate was lower in BCB positive compared to their counterparts when oocytes were analyzed jointly ( $P = 0.002$ ). In conclusion, BCB test can be a good marker in pre-selection procedures of developmentally competent human oocytes and, apparently, it is not toxic to the gamete.

## 6. INTRODUÇÃO

A queda da fertilidade da população mundial (Spira e Multigner, 1998), tornou necessário o desenvolvimento de técnicas de Reprodução Assistida (RA). Atualmente, estima-se que 8 a 15% dos casais em idade reprodutiva apresentem dificuldades reprodutivas. No Brasil, o panorama não é diferente, uma vez que aproximadamente 280 mil casais em idade fértil têm dificuldade para gerar um filho ([http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id\\_area=832](http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=832)). Como formas de tratamento para essa parcela da população, surgiram as tecnologias de RA que possibilitam a gestação por meio da manipulação dos gametas. Uma vez que a função gonadal feminina é complexa e ainda não é completamente compreendida, atenção especial tem sido dada às técnicas que envolvem o desenvolvimento do gameta feminino (o oócito), na última década (Song, Sharp *et al.*, 2010).

A maturação do gameta ocorre fisiologicamente após o pico de hormônio luteinizante (LH), quando o oócito retoma a meiose e passa pelas modificações finais que o tornam apto a ser fecundado (Adona, Pires *et al.*, 2008). O início da meiose dos gametas femininos de humanos inicia durante o período fetal, mas não ocorre de forma completa, pois o gameta cessa o seu processo divisional (parada da meiose em prófase I – PI), havendo a retomada de sua meiose apenas após a puberdade com a estimulação do LH, como afirmado anteriormente. Até a puberdade, o material genético dos oócitos, que serão ovulados ao longo da vida reprodutiva das mulheres, é contido dentro de estrutura denominada de vesícula germinativa (VG). Com o início dos ciclos menstruais e oscilações das gonadotrofinas (hormônio folículo estimulante – FSH, e LH), ocorre a retomada da meiose dos gametas que estavam em estágio de PI. A retomada da meiose é caracterizada pela quebra da vesícula germinativa (QVG) seguida da formação da placa metafásica (PM), indicando que o oócito completou a fase de PI e iniciou a fase de metáfase I (MI). Apesar de ter retomado a meiose, este oócito ainda é considerado imaturo, pois não concluiu a primeira divisão do seu material genético, e, por isso, não pode ser fecundado. A seguir, coordenado pelas gonadotrofinas, o oócito finaliza a sua primeira divisão meiótica (extruindo metade do seu conteúdo genético em estrutura denominada de corpúsculo polar – CP), e inicia a segunda meiose, onde novamente irá interromper esse processo divisional em metáfase II (MII) até que ocorra a fecundação. A sequência de eventos que inicia com a QVG e culmina na extrusão do CP (indicando que oócito completou a primeira divisão meiótica e iniciou a segunda) torna o gameta apto a ser fecundado, oócito maduro. Todas essas etapas de divisão do material genético do oócito são

denominadas coletivamente de maturação nuclear oocitária (Dekel, 1995; Cha e Chian, 1998; Sathananthan, Selvaraj *et al.*, 2000; Chian, Lim *et al.*, 2004; Adona, Pires *et al.*, 2008), e estão ilustradas na Figura 1.

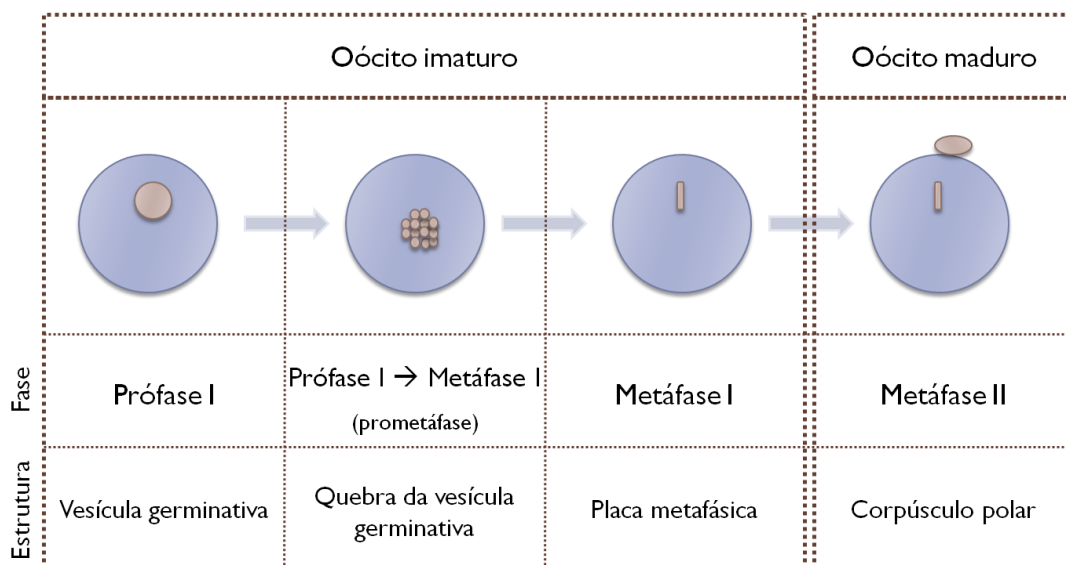


Figura 1 – Maturação oocitária: processos de divisão do material genético do oócito.

Dessa forma, de acordo com a visualização da distribuição do material genético do oócito, sob microscopia de luz, podemos classificá-lo em PI (quando observamos VG), MII (quando observamos CP) ou MI (quando não observamos nenhuma das estruturas citadas anteriormente, visto que, sob microscopia de luz, não conseguimos observar a QVG ou a PM). Os estágios de PI e de MI representam gametas imaturos que ainda não sofreram o processo de maturação, enquanto que gametas MII são considerados maduros (Kim, Lee *et al.*, 2000).

É preciso salientar que durante o processo de maturação não é apenas a configuração da cromatina que sofre alterações; ocorrem modificações no citoplasma do oócito: a maturação citoplasmática. Dessa forma, podemos observar dois processos que ocorrem concomitantemente: a maturação nuclear e a maturação citoplasmática (Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Heleil, Kuzmina *et al.*, 2010). No entanto, enquanto que a maturação nuclear é facilmente confirmada, com a visualização do CP, a maturação citoplasmática, que também é essencial para a fertilização e para o correto desenvolvimento do embrião, permanece difícil de ser mensurada (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012).

Apenas gametas maduros, que tenham completado a primeira divisão meiótica, podem ser destinados a técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) com a produção de embriões. Dessa forma,

temos a possibilidade de utilizar duas fontes de oócitos: os que maturaram *in vivo* e/ou os que maturaram *in vitro* (Dzik, Pereira *et al.*, 2010).

De acordo com o ciclo menstrual, a cada mês, em geral, um único folículo ovariano se desenvolve até o estágio pré-ovulatório, permitindo o processo de maturação *in vivo* e a consequente ovulação de um único gameta. A fim de otimizar as técnicas de FIV, a quantidade de oócitos maduros recuperados pode ser aumentada com a indução da ovulação com gonadotrofinas e indutores da maturação oocitária (Le Du, Kadoch *et al.*, 2005). No entanto, mesmo havendo estimulação hormonal, em muitas situações, gametas imaturos são recuperados (Edirisinghe, Junk *et al.*, 1997; Jaroudi, Hollanders *et al.*, 1997; Liu, Katz *et al.*, 1997), devido à assincronia entre o crescimento e a maturação dos oócitos (Edirisinghe, Junk *et al.*, 1997; Cha e Chian, 1998; Kim, Lee *et al.*, 2000). Além disso, o tratamento hormonal só pode ser oferecido para pacientes pós-púberes, além de haver contraindicação para pacientes portadoras da Síndrome do Ovário Policístico (SOP), pela possibilidade do desenvolvimento de um quadro grave denominado hiperestímulo ovariano (Chian, Lim *et al.*, 2004; Revel, Revel-Vilk *et al.*, 2009; Agdi, Zarei *et al.*, 2010). Adicionalmente, a indução da ovulação não pode ser aplicada em casos oncológicos com neoplasias hormônio dependentes e naquelas situações em que a quimioterapia precisa ser administrada o mais breve possível (Revel, Revel-Vilk *et al.*, 2009; Huang, Chian *et al.*, 2010; Song, Sharp *et al.*, 2010). Consequentemente, em algumas situações, a recuperação de quantidade adequada de oócitos maturados *in vivo* é difícil, sendo necessário realizar a maturação *in vitro* (MIV) do oócito.

A MIV baseia-se em recuperar o oócito sem a utilização de indutores do final da maturação oocitária – gonadotrofina coriônica humana (hCG), e maturá-lo em ambiente artificial (Dzik, Pereira *et al.*, 2010). A primeira descrição da possibilidade de maturação de oócitos em ambiente artificial data de 1965, e foi realizada pelo embriologista Robert Edwards (Edwards, 1965). No entanto, foi apenas em 1991 que houve a descrição do primeiro nascido vivo oriundo de oócito maturado *in vitro* onde não houve nenhuma estimulação ovariana prévia (Cha, Koo *et al.*, 1991; Cha e Chian, 1998). Desde a sua primeira descrição, a MIV de oócitos tem sido incorporada de forma progressiva nas técnicas de RA em mulheres e também em outras espécies envolvendo a PIV de embriões (Wu, Liu *et al.*, 2007). O interesse crescente pela MIV deve-se, em parte, à possibilidade de utilizar o ciclo natural da mulher para a captação de oócitos. Desta forma, além de o procedimento mais barato e apresentar menos complicações, não necessita o uso dos indutores da ovulação cujos efeitos a longo prazo não são totalmente conhecidos, inclusive não foi

descartada a associação das induções de ovulação com algumas neoplasias (Chian, Lim *et al.*, 2004; Tang-Pedersen, Westergaard *et al.*, 2012).

Além dos benefícios citados anteriormente, os estudos referentes à criopreservação e à criação de criobancos de gametas demonstram que a técnica de MIV complementa a criopreservação. Tecnicamente, oócitos maduros são mais difíceis de criopreservar por serem mais suscetíveis a danos no seu fuso meiótico, contrastando com os oócitos imaturos em estágio de PI que são mais fáceis de criopreservar. Dessa forma, vem sendo proposta a realização de criopreservação de oócitos imaturos e posterior MIV após seu aquecimento (Revel, Revel-Vilk *et al.*, 2009; Fasano, Vannin *et al.*, 2010).

Apesar dos inúmeros benefícios citados relacionados à MIV, é reconhecido que existe heterogeneidade nos oócitos recuperados, fato que se apresenta como obstáculo para tal técnica. A heterogeneidade dos gametas recuperados, no que diz respeito ao seu potencial de desenvolvimento, está relacionada à idade da fêmea (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; Pawlak, Pers-Kamczyc *et al.*, 2011; Pawlak, Renska *et al.*, 2011) e ao método de recuperação dos gametas (Alm, Torner *et al.*, 2005; Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010), entre outros fatores (Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008), resultando em interferentes biológicos e técnicos sobre a qualidade do oócito (Bols, E.P.A. *et al.*, 2012). Essa variação dos gametas se reflete no resultado das taxas de MIV, bastante divergentes entre autores, variando de 36,5% (Ben-Ami, Komsky *et al.*, 2010) até 75,2% (Huang, Chian *et al.*, 2010).

A disparidade entre os oócitos pode ser explicada, em parte, pela existência de um evento chamado de crescimento ou de capacitação oocitária. Durante esse processo, o oócito sofre diversas modificações que o tornarão competente para sofrer a maturação e para formar e desenvolver um embrião (Hyttel, Fair *et al.*, 1997). Dessa forma, em uma coorte de oócitos recuperados, encontramos gametas que sofreram o processo de crescimento/capacitação, e, conseqüentemente, são adequados às técnicas de MIV, e gametas que não sofreram esse processo. Uma vez que a falha dos oócitos recuperados em gerar blastocisto pode estar relacionada com a baixa qualidade do gameta feminino recuperado (Alm, Torner *et al.*, 2005), a detecção dos oócitos competentes é essencial para atingir sucesso nas técnicas de MIV e de FIV (Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009). Portanto, a seleção dos gametas competentes é crucial não apenas para a padronização (Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011), mas também para o sucesso das técnicas de RA em animais e em humanos (Wu, Liu *et al.*, 2007; Bols, E.P.A. *et al.*, 2012; Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M. *et al.*, 2012), sendo considerada o maior

determinante para o sucesso nas taxas de gestação (Jiang, Xiong *et al.*, 2010; Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). Além disso, a correta seleção dos gametas permite aprimorar os resultados das técnicas de PIV de embriões e também os resultados das técnicas de criopreservação de oócitos (Hadi, Wahid *et al.*, 2010). Tendo em vista este panorama, a necessidade do desenvolvimento de técnicas de seleção de gametas foi equiparada à descoberta da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e ao desenvolvimento da técnica de transferência nuclear (Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011).

As técnicas de seleção dos gametas competentes deveriam, idealmente, cumprir alguns pré-requisitos: ser método simples e rápido, de baixo custo e de alta confiabilidade e, acima de tudo, não ser tóxico para as células – oócito e células somáticas que estão ao seu redor (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010; Bols, E.P.A. *et al.*, 2012). Infelizmente, considera-se que, no presente momento, nenhuma técnica de seleção de oócitos reúne todos esses pré-requisitos (Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010); além disso, existem poucos marcadores não invasivos que conseguem selecionar os oócitos mais adequados à MIV (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010; Bols, E.P.A. *et al.*, 2012). Por conseguinte, a seleção dos gametas que serão destinados às técnicas de RA permanece como o principal obstáculo para o sucesso da PIV de embriões (Bols, E.P.A. *et al.*, 2012). Por esse motivo, diversas metodologias foram desenvolvidas com o intuito de seleção de gametas; dentre elas, podemos destacar a avaliação morfológica do complexo *cumulus*-oócito (CCO), a aferição da qualidade das células do *cumulus oophorus* e das células murais da granulosa, a observação de componentes químicos do meio de cultivo celular, assim como os componentes do fluido folicular, e a avaliação do perfil bioquímico do oócito por meio da aplicação de corantes.

O único método não invasivo de seleção de gametas é a avaliação da morfologia sob microscopia de luz, do CCO (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010), amplamente utilizado e necessário, uma vez que os gametas são obtidos de diferentes folículos e, portanto, divergem entre si (Gandolfi, 1996). Através desse método, avalia-se a homogeneidade do citoplasma do oócito, a quantidade e a qualidade das células do *cumulus oophorus* que recobrem o gameta (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). Apesar de ser rotineiramente aplicado (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008), o método de seleção morfológica é bastante subjetivo (Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Su, Wang *et al.*, 2012), e apresenta baixa acurácia, uma vez que alguns oócitos com morfologia normal (selecionados como adequados por esse método) estão em estado inicial de degeneração (Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007). Além disso, os resultados obtidos após a

seleção morfológica dos gametas são bastantes divergentes devido à imprecisão da seleção realizada (Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Mota, Batista *et al.*, 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011). Adicionalmente, a seleção morfológica não afere fatores determinantes da qualidade do gameta, como a atividade mitocondrial, metabolismo celular e mecanismos moleculares como transcrição gênica e tradução proteica (Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008; Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). Corroborando essas observações, a baixa taxa de formação de blastocisto indica a necessidade de selecionar de forma mais eficaz os gametas competentes, não sendo apenas pela classificação morfológica (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). Dessa forma, a fim de aumentar a eficiência das técnicas de RA, outros métodos de seleção de gametas estão sendo sugeridos.

Uma vez que as células do *cumulus oophorus* são estrutural e fisiologicamente acopladas ao oócito (Alvarez, Ferretti *et al.*, 2012), e que, tanto as células do *cumulus*, quanto as células murais da granulosa são importantes para os processos de maturação e de fertilização do oócito, há tentativas de relacionar a qualidade dessas células somáticas à qualidade oocitária (Tanghe, Van Soom *et al.*, 2002; Janowski, Salilew-Wondim *et al.*, 2012). No entanto, os resultados obtidos até o presente momento são inconsistentes (Janowski, Salilew-Wondim *et al.*, 2012), impossibilitando o seu uso como rotina. Além disso, à primeira vista, a avaliação dessas células somáticas parece ser inviável, uma vez que, para realizar tal aferição, o cultivo celular já deve ter ocorrido e a recuperação do gameta, assim como o seu cultivo, realizada de forma individual. Essas dificuldades, que inviabilizam a utilização destas técnicas como método de seleção oocitária, também foram encontradas quando os substratos utilizados e os metabólitos liberados no meio de cultivo pelo gameta foram dosados (Jiang, Xiong *et al.*, 2010). De modo similar, a avaliação do líquido puncionado, referente ao líquido folicular, apresenta grande variabilidade, pois, juntamente com o líquido puncionado, ocorre a recuperação de sangue, que dilui os componentes presentes no folículo e, por não termos como mensurar o volume de sangue liberado decorrido da punção, não sabemos ao certo o quanto de diluição do líquido folicular ocorreu (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). Dessa forma, tais tecnologias são laboriosas e ainda não apresentam aplicação prática ou em larga escala.

Tendo em vista que os métodos de seleção anteriormente citados não apresentaram a eficácia desejada e que o baixo potencial de desenvolvimento de gametas maturados *in vitro* está relacionado com a qualidade do gameta (Wu, Liu *et al.*, 2007; Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009), foi sugerida a combinação dos critérios de seleção morfológica e bioquímica. Sabe-se que, ao



longo do crescimento/capacitação do oócito, ocorrem modificações metabólicas, havendo alteração da atividade de algumas enzimas chave no metabolismo do gameta (Epstein, Wegienka *et al.*, 1969; Tsutsumi, Satoh *et al.*, 1992). Dentre tais enzimas, destaca-se a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que aumenta sua atividade ao longo do crescimento oocitário. Foi demonstrado que existe uma relação linear direta entre o diâmetro do oócito e a atividade da enzima G6PDH, como representado na Figura 2A. No entanto, o aumento da atividade enzimática que acompanha o aumento do diâmetro do oócito cessa quando o gameta atinge diâmetro aproximado de 85  $\mu\text{m}$ , ou seja, o oócito continua aumentando de volume enquanto que a atividade da enzima G6PDH atinge platô (Figura 2A). Consequentemente, ao avaliar a razão entre a média da atividade enzimática e a média do volume do gameta (atividade específica da enzima G6PDH), foi demonstrado que oócitos que se encontram nas fases finais do crescimento (75 – 100  $\mu\text{m}$ ) são caracterizados por uma razão enzima/volume menor do que a razão encontrada em gametas que estão em estágios iniciais do desenvolvimento (30 – 75  $\mu\text{m}$ ), conforme representado na Figura 2B (Mangia e Epstein, 1975).

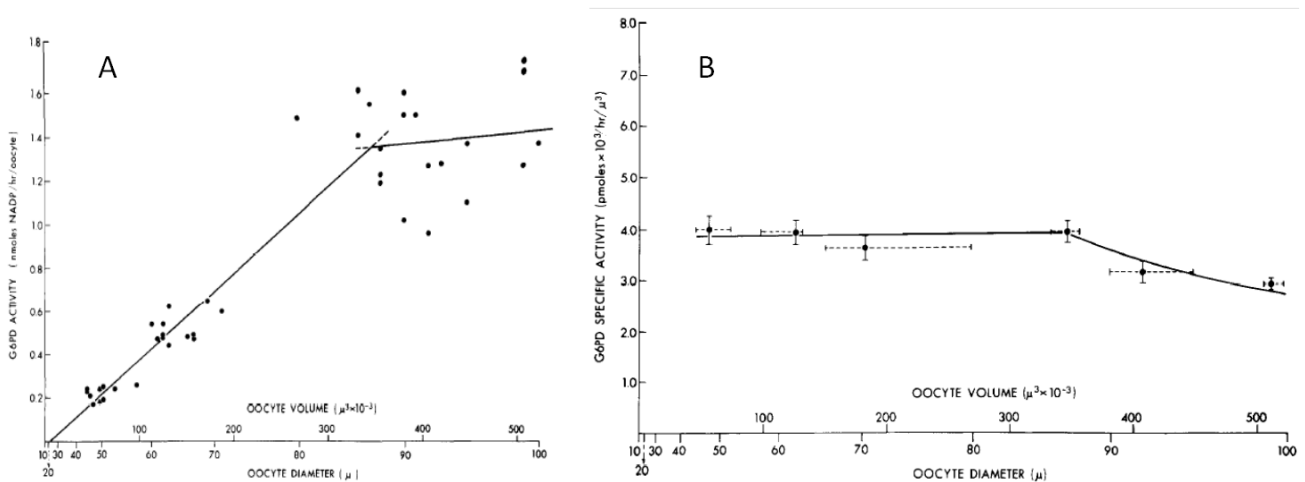


Figura 2 – Relação entre a atividade (A) e a atividade específica (B) da enzima G6PDH de acordo com o diâmetro do oócito de murinos. Retirado de Mangia F & Estein C; Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities, 1975.

Dessa forma, foi sugerido que gametas que ainda não são competentes para o processo de maturação (e demais tecnologias de FIV), por se encontrarem em estágios iniciais do crescimento, apresentam maior atividade específica da enzima G6PDH, contrastando com gametas que já sofreram o processo de crescimento/capacitação, apresentando atividade específica da enzima G6PDH diminuída (Mangia e Epstein, 1975; Tsutsumi, Satoh *et al.*, 1992).

Em 1986, foi sugerido que a atividade específica da enzima G6PDH poderia ser aferida, de forma indireta, através da aplicação de um corante de vitalidade chamado Azul Cresil Brillhante (BCB). Uma vez que esse corante azulado pode ser reduzido a um composto incolor pela G6PDH, concluiu-se que a taxa de redução da coloração azulada corresponderia com o nível de atividade específica da enzima G6PDH (Williams, 1986). Inicialmente, no entanto, o BCB, como método de aferição da atividade específica da enzima G6PDH, foi empregado para realizar sexagem de embriões murinos (Williams, 1986) e estimular o consumo de glicose de embriões bovinos (Tiffin, Rieger *et al.*, 1991). Apenas em 1993, foi sugerido o uso do BCB como método de aferição da atividade específica da enzima G6PDH em oócitos de suínos (Ericsson, Boice *et al.*, 1993). Ericsson propôs a utilização do corante BCB como método de seleção dos gametas competentes para o desenvolvimento: gametas que completaram sua fase de crescimento apresentam menor atividade específica da enzima G6PDH e, conseqüentemente, quando expostos ao BCB apresentam coloração azulada (sendo classificados como BCB positivo), uma vez que o corante não é reduzido pela enzima. Por outro lado, gametas que ainda estão em fase de crescimento apresentam maior atividade específica da enzima G6PDH, a qual reduz o corante a um composto incolor, impedindo a coloração dos gametas, que permanecem incolores (sendo classificados como BCB negativo). A figura 3 ilustra o princípio de aplicação do BCB como método de seleção dos gametas que concluíram o processo de crescimento e que, conseqüentemente, estão aptos à MIV e as demais tecnologias de RA.

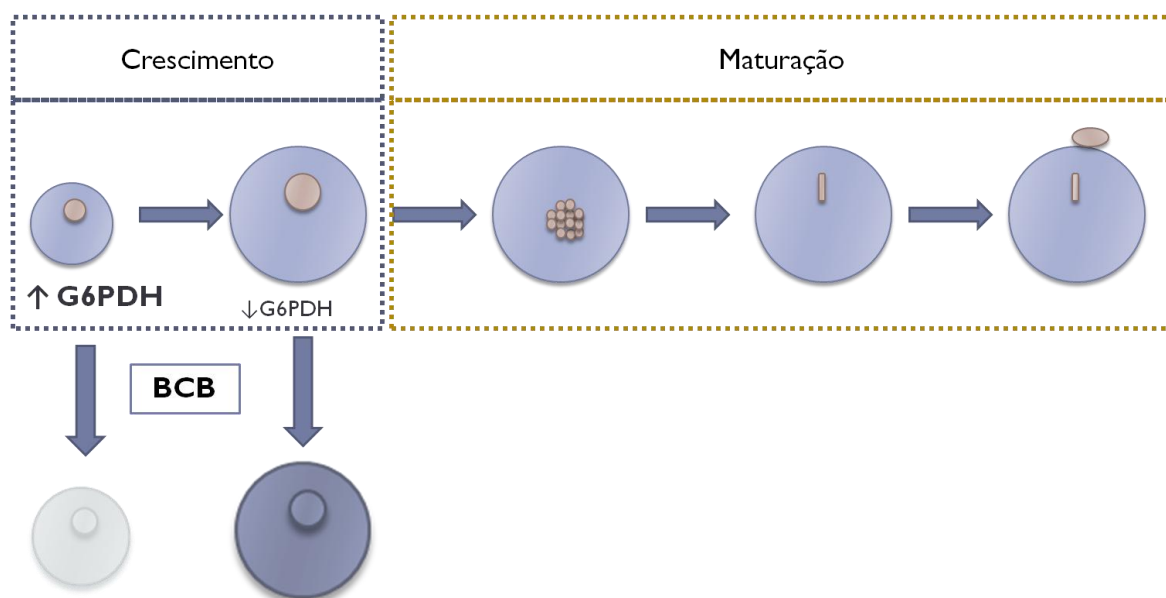


Figura 3 – Esquematização do processo de seleção dos gametas competentes para a MIV através da coloração com BCB.

Além dessa classificação, alguns autores apresentam um terceiro grupo de gametas, aqueles que não apresentam ooplasma totalmente azulado, mas nota-se algum resquício do corante, sendo classificados como BCB intermediário (BCB  $\pm$ ). Esses gametas apresentam intermediária atividade específica da enzima G6PDH, sendo parcialmente competentes, ou seja, possivelmente retomem a meiose, mas dificilmente apresentarão atributos necessários para concluir o processo de maturação (Ericsson, Boice *et al.*, 1993; Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009).

A relação atividade específica da enzima G6PDH/coloração do gameta após exposição ao BCB foi corroborada posteriormente por Alm e colaboradores (Alm, Torner *et al.*, 2005), que demonstraram que oócitos bovinos que permaneceram incolores após exposição ao BCB (BCB negativo) apresentaram 2,5 vezes maior atividade específica da enzima G6PDH quando comparado com oócitos que, após exposição ao BCB, adquiriram coloração azulada (BCB positivo), como representado na Figura 4. Confirmando os resultados anteriormente citados, ao utilizar *probe* específica para a enzima G6PDH mitocondrial, demonstrou-se que essa enzima apresenta maior atividade específica em gametas BCB negativo (Torner, Ghanem *et al.*, 2008).

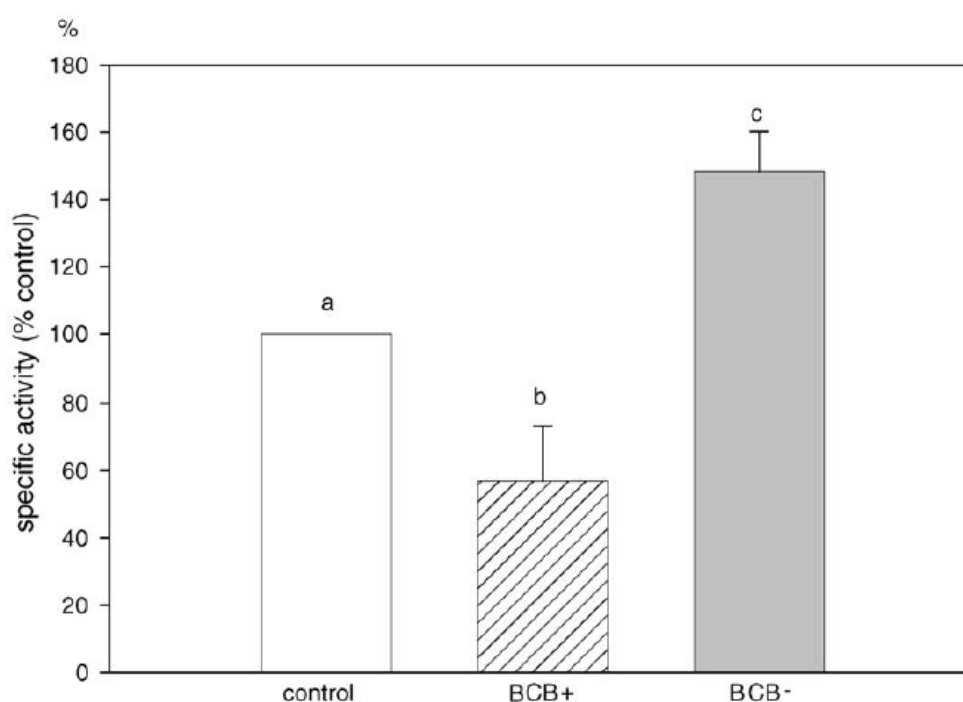


Figura 4 – Atividade específica da enzima G6PDH de gametas controle e expostos ao BCB. Retirado de Alm H, et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by Brilliant Cresyl Blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, 2005.

É preciso salientar o fato de que a classificação dos gametas entre os grupos BCB positivo e BCB negativo deve levar em consideração única e exclusivamente a coloração do ooplasma, independente da coloração das células do *cumulus oophorus*, pois a coloração dessas células somáticas nem sempre condiz com a coloração do gameta (Wu, Liu *et al.*, 2007; Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009) e não interfere na classificação (Wu, Liu *et al.*, 2007).

A partir dos primeiros experimentos de Ericsson e colaboradores (1993), concluindo que gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de maturação nuclear, de penetração de espermatozoide e de fertilização (quando comparado com gametas BCB negativo e com o grupo controle), outros experimentos surgiram a fim de demonstrar que o corante BCB pode ser utilizado como método eficaz na seleção dos gametas competentes - mais aptos à MIV e às tecnologias de RA. Desde então, a aplicação do BCB tem demonstrado resultados satisfatórios ao observarmos que gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de maturação nuclear (MIV), penetração de espermatozoide, FIV, clivagem embrionária e formação de blastocisto, quando comparados com os gametas classificados como BCB negativo, como demonstra a terceira coluna dos Anexos 15.1 e 15.2. Uma vez que os desfechos que apresentam maior impacto sobre as técnicas de RA são as características do blastocisto e, por fim, a taxa de nascidos vivos, a aplicação do BCB demonstrou ser bastante eficaz, visto que gametas BCB positivo apresentaram os melhores resultados nessas aferições quando comparados com seus homólogos (BCB negativo e controle), como demonstrado na terceira coluna do Anexo 15.3.

Além dos benefícios citados, foi observado que a aplicação do BCB otimizou os resultados referentes à criopreservação. Ao selecionar os gametas competentes através da aplicação do BCB antes da vitrificação, foi demonstrado que gametas BCB positivo, pós-aquecimento, apresentaram maiores taxas de MIV (Hadi, Wahid *et al.*, 2010) e de desenvolvimento até estágio de blastocisto (Rodriguez Villamil, Ongaratto *et al.*, 2012).

Ao observarmos melhores resultados nas técnicas de RA com gametas BCB positivo, em relação aos seus homólogos BCB negativo, questionou-se a possibilidade de os oócitos, já no momento da coloração com BCB, apresentarem graus de maturidade (nuclear e citoplasmática) diferentes, o que explicaria a diferença dos resultados encontrados. No entanto, foi demonstrado que, no momento da recuperação dos gametas, os oócitos, independente do grupo a que pertencem (controle, BCB positivo ou BCB negativo), encontravam-se imaturos, em estágio de PI, em iguais proporções (Alm, Torner *et al.*, 2005). No entanto, apesar de estarem todos em estágio de PI, ao avaliar a configuração da cromatina, foi demonstrado que gametas BCB positivo

encontram-se, em sua maioria, em estágios finais da PI (diacinese), enquanto que os gametas BCB negativo encontram-se em estágios anteriores (início do diplóteno) (Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Egerszegi, Alm *et al.*, 2010); apesar disso, do ponto de vista de maturação nuclear, ambos os gametas são classificados como imaturos e em estágio de PI. Ao avaliar a maturidade citoplasmática dos gametas expostos ao BCB, foi observado que, assim como a maturidade nuclear, os gametas positivos e negativos apresentam os mesmos níveis de maturidade citoplasmática antes da maturação, ao avaliar a concentração de glutatona (GSH), importante marcador da maturação citoplasmática (Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009). Da mesma forma, a atividade do fator promotor de maturação (MPF), indutor do processo de maturação, foi igual, antes da MIV, entre gametas BCB positivo e negativo (Catalá, M. T., Izquierdo, D. *et al.*, 2011). Dessa forma, podemos concluir que, antes da MIV, os gametas BCB positivo e negativo apresentam, aparentemente, os mesmos níveis de maturidade nuclear e citoplasmática, havendo diferenças visíveis, através da avaliação dos resultados, somente após a maturação do gameta. Esse fato indica que existem alterações subcelulares, que não conseguimos mensurar ao avaliar apenas a morfologia do gameta antes de destiná-lo às técnicas de MIV e de FIV, entre oócitos corados e não corados pelo BCB. Foi proposto, então, que a baixa atividade específica da enzima G6PDH encontrada nos gametas BCB positivo não é o único fator associado com a competência do gameta. Por esse motivo, marcadores moleculares têm sido procurados a fim de auxiliar no entendimento do porquê de gametas BCB positivo serem mais competentes dos que os BCB negativo. Foi demonstrado que gametas BCB positivo expressam mais genes relacionados com a tradução proteica, como o *RPL24* (Ghanem, Hölker *et al.*, 2007), com o crescimento e o desenvolvimento folicular, como a adiponectina e seus receptores (Tabandeh, Golestani *et al.*, 2012), e com o controle do número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) (Opiela, Lipiński *et al.*, 2010). Por outro lado, gametas BCB negativo expressam mais genes relacionados à atresia folicular (*PTTG1*), com supressão do crescimento do folículo (*MSX1*) (Ghanem, Hölker *et al.*, 2007) e com apoptose (*Bax*) (Su, Wang *et al.*, 2012), quando comparado com seus homólogos positivos. Apesar dos indicativos de diferenças moleculares, há estudos que demonstram que a expressão de alguns genes não difere entre gametas BCB positivo e negativo, como o caso dos genes *MAPK* e *AKT1* (Torner, Ghanem *et al.*, 2008), *COX1*, *ATP1A1*, relacionados com o metabolismo (Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011) e *NASP*, *H2A.Z*, *PDRX1* e *EEF1A1*, relacionados com a qualidade oocitária (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). Estudos mais amplos demonstraram que 185 genes são expressos de forma diferente entre oócitos BCB positivo e BCB negativo; os genes mais expressos nos gametas BCB positivo estão relacionados com o controle do ciclo celular, com a transcrição gênica

e com a tradução proteica, enquanto que os genes mais expressos nos gametas negativos estão relacionados com o controle da síntese de ATP e com a atividade mitocondrial (Torner, Ghanem *et al.*, 2008). Apesar da maior expressão de genes relacionados com a atividade mitocondrial em gametas BCB negativo, foi demonstrado que esses oócitos não apresentam modificações na dinâmica da atividade mitocondrial ao longo da sua maturação nuclear (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010) e que, após 24 horas de MIV, esses gametas apresentam menor atividade mitocondrial quando comparado com seus homólogos positivos (Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011). Mais recentemente, foi descoberto que os gametas positivos e negativos também apresentam diferenças nos seus mecanismos epigenéticos. Foi observado maior acetilação de histonas, e conseqüentemente maior transcrição gênica pela presença de cromatina mais frouxa, em embriões oriundos de oócitos BCB positivo, quando comparados com os negativos (Su, Wang *et al.*, 2012).

Diante do exposto, conclui-se que o BCB auxilia na seleção de gametas não somente com relação à atividade enzimática, mas também com relação ao seu perfil de expressão gênica (Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011).

Corroborando a ideia de que gametas corados e não corados pelo BCB apresentam diferenças subcelulares, e, partindo do princípio que existe uma clara relação entre o ambiente folicular e a qualidade do oócito (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010), a classificação dos gametas de acordo com o BCB e a qualidade do folículo e do CCO a que ele pertencia foi estudada. Foi demonstrado que gametas BCB positivo, em geral, são recuperados de folículos com diâmetros maiores (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005) e pertencentes a CCOs de grau I, melhor qualidade (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004), expandidos (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011), contrastando com gametas BCB negativos, que são recuperados de folículos pequenos e de CCOs compactos (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011). Esse ambiente folicular explicaria o maior diâmetro do gameta BCB positivo em relação ao do gameta BCB negativo encontrados na maioria dos experimentos (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M. *et al.*, 2012; Wang, Lin *et al.*, 2012) – Anexo 15.1, embora essa observação seja questionada por alguns autores (Castaneda, Kaye *et al.*, 2013). No entanto, como afirmado anteriormente, relacionar a qualidade do gameta com o seu ambiente folicular é tarefa laboriosa, pois a relação específica entre o oócito e o seu ambiente folicular é perdida visto que são aspirados vários folículos por vez (Bols, E.P.A. *et al.*,

2012), o que dificulta o uso do líquido folicular como método de seleção de oócitos (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010).

É conhecido o fato de que a maturação citoplasmática é essencial para a correta fertilização e desenvolvimento do embrião (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012); por esse motivo, tentou-se relacionar a seleção dos gametas com BCB e a avaliação da maturação citoplasmática. Alguns marcadores de maturação citoplasmática são sugeridos, como a concentração de GSH no ooplasma, a biogênese mitocondrial, assim como o número de cópias do mtDNA e a quantidade de lipídeos no citoplasma do gameta. A GSH participa de várias funções celulares, como transporte de aminoácidos, síntese proteica e proteção contra dano oxidativo (Urdeneta, Jiménez-Macedo *et al.*, 2003); o número de cópias do mtDNA está relacionado com a produção de ATP, molécula importante durante o processo de maturação do gameta (El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006); e o acúmulo de lipídeos ocorre visando a suprir o metabolismo do embrião nos estágios iniciais (Castaneda, Kaye *et al.*, 2013). Experimentos demonstraram que gametas BCB positivo apresentam maior concentração de GSH no ooplasma (Wu, Liu *et al.*, 2007; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Wang, Lin *et al.*, 2012), maior quantidade no número de cópias de mtDNA (El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006; Spikings, Alderson *et al.*, 2007), maior produção de ATP (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012) e maior concentração de lipídeos no ooplasma (Castaneda, Kaye *et al.*, 2013), quando comparado com gametas BCB negativo, indicando maior grau de maturidade citoplasmática desses gametas. Outra forma de avaliar a maturação citoplasmática é pela observação da distribuição das mitocôndrias e dos grânulos corticais – gametas que apresentam mitocôndrias próximas ao núcleo e com grânulos na periferia são classificados como maduros (Opiela, Lipiński *et al.*, 2010; Silva, Rodriguez *et al.*, 2011). Foi demonstrado que gametas BCB positivo apresentam maiores taxas de maturação citoplasmática, ao avaliar o padrão de distribuição de mitocôndrias (Wu, Liu *et al.*, 2007; Silva, Rodriguez *et al.*, 2011), entretanto alguns autores não confirmam estes resultados (Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011; Castaneda, Kaye *et al.*, 2013), demonstrando que gametas BCB positivo e negativo apresentam o mesmo padrão de distribuição das mitocôndrias no ooplasma. Da mesma forma, a taxa de maturação citoplasmática, a partir da avaliação dos grânulos corticais, foi superior no grupo BCB positivo, comparando com seus homólogos BCB negativo e controle (Silva, Rodriguez *et al.*, 2011).

É preciso salientar o fato de que apesar do conhecimento da interação entre o BCB e a enzima G6PDH, a base bioquímica do metabolismo do corante ainda não está completamente conhecida (Alm, Torner *et al.*, 2005; Sugulle, Dochi *et al.*, 2008; Kempisty, Jackowska *et al.*, 2011;

Silva, Rodriguez *et al.*, 2011). Foi sugerido que o BCB apresenta papel deceptor de elétrons durante a oxidação da glicose (Alm, Torner *et al.*, 2005; Silva, Rodriguez *et al.*, 2011). Diante desse desconhecimento, uma preocupação entre os pesquisadores é a possibilidade de efeitos tóxicos do BCB sobre o gameta feminino. No entanto, aparentemente, o BCB não afeta a viabilidade dos oócitos e nem dos embriões oriundos de gametas expostos (Tiffin, Rieger *et al.*, 1991; Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; Alm, Torner *et al.*, 2005; Bhojwani, Alm *et al.*, 2007; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Sugulle, Dochi *et al.*, 2008).

A segurança da aplicação do BCB pode ser inferida através da observação de que blastocistos oriundos de oócitos expostos, tanto os positivos como os negativos, apresentaram morfologia normal, indicando que o BCB não apresenta efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário (Alm, Torner *et al.*, 2005; Bhojwani, Alm *et al.*, 2007; Sugulle, Dochi *et al.*, 2008). Apesar disso, os resultados referentes apenas ao grupo de gametas BCB negativo não são satisfatórios; há relatos de que grande parte desses gametas degenera (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005), de que não conseguem ser fertilizados (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010), e de que não evoluem até blastocisto (Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006), produzem blastocistos com menor diâmetro (Bhojwani, Alm *et al.*, 2007) ou com menor número de blastômeros após FIV convencional (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). Além disso, talvez mais importante do que as análises citadas, no grupo de gametas BCB negativo, não houve relato de nascidos vivos (Su, Wang *et al.*, 2012). Dessa forma, sugeriu-se que gametas BCB positivo podem superar os possíveis danos causados pela exposição ao BCB, enquanto que os gametas BCB negativo poderiam ser mais suscetíveis aos efeitos provocados pela exposição ao corante (Mota, Batista *et al.*, 2010).

Apesar da preocupação do efeito do BCB sobre o gameta, nascimentos de suínos (Coy, Romar *et al.*, 2005) e de bovinos (Su, Wang *et al.*, 2012) gerados por oócitos que foram expostos ao BCB já foram relatados. Su e colaboradores (2012) demonstraram que a taxa de nascidos vivos no grupo BCB positivo é superior quando comparado com a taxa observada no grupo BCB negativo e, até mesmo, com o grupo controle.

Embora a exposição dos gametas uma única vez ao BCB aparentemente não altere a viabilidade das células, foi demonstrado que a exposição ao corante em dois momentos apresenta efeitos negativos: provoca diminuição da expressão gênica e proteica de componentes importantes para a fertilização, como componentes da matriz extracelular e da zona pelúcida (Kempisty, Jackowska *et al.*, 2011). Além disso, a exposição dos gametas ao BCB duas vezes diminuiu as taxas de FIV e impediu a formação de blastocisto (Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006).



Dessa forma, ao observar que a simples exposição dos gametas ao BCB é similar à eficácia da dupla exposição, deve-se utilizar apenas uma única aplicação do corante (antes do processo de MIV), pois a exposição excessiva do gameta ao BCB diminui a viabilidade oocitária e compromete a sua competência para o desenvolvimento (Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006). Apesar de ser observado prejuízo quando o gameta é exposto duas vezes ao corante, recentemente foi demonstrado que a exposição do oócito ao BCB e posterior exposição do zigoto ao corante (como método de seleção não apenas dos gametas, mas também dos zigotos com maior potencial), aumentou as taxas de formação de blastocisto, em comparação com os grupos BCB negativo e controle (Mirshamsi, Karamishabankareh *et al.*, 2013). Dessa forma, os autores sugerem que a seleção dupla com BCB (seleção dos gametas e dos zigotos) parece ser melhor do que realizar apenas a seleção oocitária.

Diante do exposto, alguns autores concordam que a aplicação do BCB como método de seleção de gametas competentes traz benefícios sobre os resultados de PIV de embriões (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005; Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009; Karami-Shabankareh e Mirshamsi, 2012). No entanto, cabe salientar que o BCB não conseguiu prever a qualidade de oócitos equinos (Pereira, Lorenzo *et al.*, 2013) e que, ao avaliar algumas variáveis, alguns autores não encontraram diferença entre o grupo BCB positivo e o grupo controle (Anexos 15.1, 15.2 e 15.3). O real benefício da aplicação do BCB é questionado por alguns autores, uma vez que, idealmente, deveria fornecer resultados superiores dos gametas BCB positivo com relação aos gametas controle (Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Mota, Batista *et al.*, 2010; Opiela, Lipiński *et al.*, 2010). Catalá e colaboradores (2012) indicaram que a aplicação do BCB só apresenta vantagem quando é utilizado FIV convencional (por aumentar a taxa de formação de blastocisto), não havendo benefício quando a fertilização é por ICSI. Adicionalmente, foi sugerido que a aplicação do BCB para seleção de gametas competentes não é adequada para a PIV de embriões utilizando modelos animais, devido ao tempo despendido para realizar tal técnica, sendo mais aplicável à espécie humana, na qual se trabalha com número inferior de gametas (Bols, E.P.A. *et al.*, 2012).

Apesar da discussão sobre o benefício da aplicação do BCB, a maioria dos autores sugere que a exposição dos gametas a este corante ainda é melhor do que apenas a avaliação morfológica, uma vez que após aplicação do BCB muitos gametas que foram selecionados pela morfologia adequada acabam sendo descartados por não apresentarem perfil bioquímico ideal

(Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004). Podemos confirmar essa informação ao observar que a taxa de gametas BCB positivo, apesar de variável, nunca se aproxima dos 100%, indicando que alguns gametas selecionados pela classificação morfológica são indicados como inviáveis através da seleção com BCB (Bols, E.P.A. *et al.*, 2012). A taxa de gametas classificados como positivo após exposição ao BCB varia de acordo com a idade da doadora (Pawlak, Renska *et al.*, 2011), com a condição ovariana (Mirshamsi, Karamishabankareh *et al.*, 2013), com a espécie animal utilizada, com a presença ou ausência de estimulação hormonal, assim como com o tamanho do folículo ao qual o gameta é recuperado (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010). Por conseguinte, encontramos uma grande variação na taxa de gametas classificados como BCB positivo, variando de 44% (Tabandeh, Golestani *et al.*, 2012) até 85% (Coy, Romar *et al.*, 2005).

Apesar da ampla utilização do corante BCB em espécies animais, com o intuito de otimizar as técnicas de RA, é notável a grande variação entre os protocolos utilizados. Podemos observar variação inter e intraespécie, havendo três variáveis que divergem de acordo com os estudos: o veículo utilizado para diluir o corante (diluyente), a concentração do corante e o tempo de exposição dos gametas ao BCB (Anexo 15.4).

Pouco é relatado sobre a importância do correto diluyente para utilização do BCB. No entanto, sabe-se que devemos suprimir o vermelho de fenol, indicador de pH, pois ele pode interferir na coloração azulada do BCB (Wu, Liu *et al.*, 2007).

Com relação à concentração, a de 26  $\mu\text{M}$  é a mais aceita e aplicada pelos pesquisadores. Foi demonstrado que concentrações superiores, 39  $\mu\text{M}$  (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007) e 52  $\mu\text{M}$  (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Wang, Lin *et al.*, 2012), não apresentam vantagens sobre a concentração de 26  $\mu\text{M}$ . Da mesma forma, concentração inferior (13  $\mu\text{M}$ ) não conseguiu selecionar número satisfatório de gametas (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Wu, Liu *et al.*, 2007; Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011). No entanto, a concentração de 26  $\mu\text{M}$  ainda é questionada por alguns autores, que demonstraram que concentração de 13  $\mu\text{M}$  (Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011) ou que concentração intermediária entre 13 e 20  $\mu\text{M}$  (Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011) podem ser mais adequadas. Por conseguinte, foi sugerido que, para cada espécie, seja importante padronizar a concentração do BCB (Wang, Lin *et al.*, 2012).

Assim como a concentração, o tempo de exposição dos gametas ao BCB varia na literatura, apesar de haver tendência de exposição dos gametas ao BCB por 90 minutos. O tempo de exposição dos oócitos ao corante vem sendo discutido, uma vez que este fator poderia afetar o

desenvolvimento oocitário dos gametas selecionados por essa técnica (Goovaerts, Leroy *et al.*, 2010). Alguns autores defendem a ideia de que 60 minutos (Wu, Liu *et al.*, 2007) ou até 90 minutos (Sugulle, Dochi *et al.*, 2008) são insuficientes para selecionar corretamente os gametas, uma vez que a célula não teria tempo suficiente para metabolizar o corante. Por outro lado, ao testar diferentes tempos de exposição (30, 60 e 90 minutos), Alcoba e colaboradores (2011) demonstraram que a exposição dos oócitos de ratos por 60 minutos ao BCB é suficiente para realizar a seleção de forma adequada, não havendo prejuízos sobre a qualidade do gameta. Além disso, foi demonstrado que a permanência dos gametas por mais tempo ao BCB não necessariamente altera a classificação realizada.

Apesar das divergências entre protocolos e resultados encontrados nas diferentes espécies animais utilizadas, a utilização de modelos animais como forma de inferir o resultado encontrado em humanos é de extrema importância (Mohammadi-S A, 2011). A aplicação do BCB como método de seleção de gametas competentes tem sido amplamente empregada em diversas espécies animais, já havendo descrição na literatura de sua utilização em: **bovinos** (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; Alm, Torner *et al.*, 2005; Sugulle, Katakawa *et al.*, 2006; Bhojwani, Alm *et al.*, 2007; Ghanem, Hölker *et al.*, 2007; Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008; Sugulle, Dochi *et al.*, 2008; Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Hadi, Wahid *et al.*, 2010; Heleil, Kuzmina *et al.*, 2010; Mota, Batista *et al.*, 2010; Opiela, Lipiński *et al.*, 2010; Koester, Mohammadi-Sangcheshmeh *et al.*, 2011; Silva, Rodriguez *et al.*, 2011; Janowski, Salilew-Wondim *et al.*, 2012; Rodriguez Villamil, Ongaratto *et al.*, 2012; Sohel, Salilew-Wondim *et al.*, 2012; Su, Wang *et al.*, 2012; Tabandeh, Golestani *et al.*, 2012; Castaneda, Kaye *et al.*, 2013; Mirshamsi, Karamishabankareh *et al.*, 2013), **suínos** (Ericsson, Boice *et al.*, 1993; Roca, Martinez *et al.*, 1998; Coy, Romar *et al.*, 2005; El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006; Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006; Spikings, Alderson *et al.*, 2007; Egerszegi, Alm *et al.*, 2010; Kempisty, Jackowska *et al.*, 2011; Pawlak, Pers-Kamczyc *et al.*, 2011; Pawlak, Renska *et al.*, 2011; Alvarez, Ferretti *et al.*, 2012), **caprinos** (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Rodríguez-González, López-Bejar *et al.*, 2003; Urdaneta, Jiménez-Macedo *et al.*, 2003), **roedores** (Wu, Liu *et al.*, 2007; Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011), **equinos** (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011; Pereira, Lorenzo *et al.*, 2013), **bubalinos** (Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007), **ovinos** (Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011; Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012; Karami-Shabankareh e Mirshamsi, 2012; Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M. *et al.*, 2012; Wang, Lin *et al.*, 2012) e **caninos** (Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009) – Anexo 15.4. Até o presente momento, o uso deste corante para selecionar oócitos humanos não foi descrito,

provavelmente pela dificuldade em adquirir gametas femininos que possam ser destinados à pesquisa prejudica o desenvolvimento das técnicas de RA (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). No entanto, mesmo que a maioria do nosso conhecimento advenha da reprodução animal, o oócito humano apresenta inúmeras peculiaridades (Chian, Lim *et al.*, 2004), sendo necessário testar a eficácia da aplicação do BCB em humanos.

## 7. HIPÓTESES OPERACIONAIS ( $H_0$ ) E CONCEITUAIS ( $H_c$ )

**8.1**  $H_0$ : a taxa de maturação nuclear é igual entre o grupo de gametas controle (não exposto ao BCB) e os grupos tratados com BCB classificados como positivo ou negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas;

$H_c$ : a taxa de maturação nuclear é igual entre os grupos controle e tratado com BCB classificado como positivo e estes são superiores ao grupo tratado com BCB classificado como negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas.

**8.2**  $H_0$ : a taxa de retomada de meiose é igual entre o grupo de gametas controle (não exposto ao BCB) e os grupos tratados com BCB classificados como positivo ou negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas;

$H_c$ : a taxa de retomada de meiose é igual entre os grupos controle e tratado com BCB classificado como positivo, e estes são superiores ao grupo tratado com BCB classificado como negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas.

**8.3**  $H_0$ : as taxas de maturação nuclear e de retomada de meiose são iguais entre os grupos controle e tratado (exposto ao BCB, independente do resultado da coloração);

$H_c$ : as taxas de maturação nuclear e de retomada de meiose são iguais entre os grupos controle e tratado com BCB, independente da fonte da fonte de recuperação dos gametas.

**8.4**  $H_0$ : a taxa de degeneração é igual entre o grupo de gametas controle (não exposto ao BCB) e os grupos tratados com BCB classificados como positivo ou negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas;

$H_c$ : a taxa de degeneração é superior no grupo de gametas classificado como BCB negativo, independente da fonte de recuperação dos gametas.

**8.5**  $H_0$ : a taxa de degeneração é igual entre os grupos controle e tratado (exposto ao BCB, independente do resultado da coloração);

$H_c$ : a taxa de degeneração é igual entre os grupos controle e tratado com BCB, independente da fonte da fonte de recuperação dos gametas.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficiência e a segurança da seleção de oócitos humanos destinados à MIV através da aplicação do corante BCB.

### **8.2 Objetivos específicos**

- Comparar as taxas de maturação nuclear, retomada de meiose e degeneração entre os grupos controle e tratado com BCB classificados como positivo ou negativo;
- Comparar as taxas de maturação nuclear, retomada de meiose e degeneração entre os grupos controle e exposto ao BCB.

## **9. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **9.1 Delineamento do estudo**

Estudo experimental *in vitro*.

### **9.2 Local de execução**

As soluções e reagentes necessários para os experimentos foram preparadas no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A recuperação e a MIV dos oócitos oriundos das pacientes submetidas à estimulação hormonal foi realizada no Núcleo de Reprodução Humana Gerar do Hospital Moinhos de Vento; a recuperação dos oócitos das pacientes submetidas à ooforectomia ou à cesárea foi realizada, respectivamente, no Bloco Cirúrgico e no Centro Obstétrico (CO), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e a MIV desses gametas no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular (LaGOM) do HCPA.

### **9.3 Pacientes e Desenho Experimental**

O estudo envolveu pacientes com três perfis fisiológicos diferentes:

- Pacientes submetidas à estimulação hormonal para tratamento de infertilidade

As pacientes que realizaram procedimento de FIV após indução da ovulação para tratamento de infertilidade no Núcleo de Reprodução Humana Gerar do Hospital Moinhos de Vento e que apresentaram, no momento da punção ovariana, gametas imaturos, foram convidadas a participar do estudo. O protocolo de estimulação ovariana foi escolhido pelo médico assistente, independente deste estudo. Foram utilizadas gonadotrofinas purificadas ou recombinantes, associadas à agonista ou antagonista do GnRH. Conforme controle ecográfico da ovulação, foi administrado hCG urinário ou recombinante 36 horas antes da captação dos oócitos. A punção ovariana foi guiada por ultrassom transvaginal com agulha apropriada (*CCD Laboratoire 132230301 – set de punção single lumen, agulha 30 cm com válvula*). Os CCOs recuperados foram transferidos para placa de cultivo com meio ECM (*Early Cleavage Medium - Irvine Scientific 90138*)



suplementado com 10% de soro (*Substitute Serum Supplement - Irvine Scientific 99193*) onde permaneceram por período de 4 horas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ambiente umidificado. Cabe salientar que, quando manejados fora da incubadora, os gametas foram manipulados no meio HTF modificado (*Human Tubal Fluid HEPES - Irvine Scientific 90126*) suplementado com 10% de soro. Após 4 horas de recuperação dos CCOs, as células do *cumulus oophorus* foram removidas através de tratamento enzimático - solução de hialuronidase (*Irvine Scientific – 90101*). Os CCOs foram expostos por 25 segundos a esta solução e transferidos para o meio HTF modificado para que, com auxílio de pipeta, fossem retiradas por completo as células do *cumulus oophorus*. Após a remoção destas células somáticas, os oócitos foram avaliados sob microscopia óptica – microscópio invertido com magnitude de 400 x (Nikon – TS100) a fim de aferir seu grau de maturidade nuclear para serem classificados em: PI, quando havia presença de VG; MII, quando havia extrusão do primeiro CP; ou MI, quando não havia nenhuma das estruturas citadas anteriormente. Os gametas MII foram destinados às técnicas de FIV, enquanto que gametas PI e MI foram classificados como imaturos e destinados à MIV. Tais oócitos foram transferidos para placas de cultivo contendo microgotas de 20 µL de meio - ECM suplementado com 10% de soro, encobertos por óleo mineral (*Irvine Scientific - 9305*), onde permaneceram por período de 24 horas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ambiente umidificado. Após 24 horas de MIV, os gametas foram novamente avaliados com relação ao grau de maturidade nuclear; caso houvesse ocorrido maturação do gameta, ele era destinado às técnicas de FIV a fim de aumentar a quantidade de embriões disponíveis para a paciente. Nos casos em que não ocorreu a maturação nuclear (*in vitro*), os oócitos foram destinados à nossa pesquisa após o consentimento da paciente. Cabe salientar que, na rotina da Clínica, os gametas imaturos são descartados. Esses gametas, que seriam naturalmente descartados por não terem maturado nem *in vivo* nem *in vitro* por 24 horas, foram então divididos em grupo controle (destinado novamente à MIV) e grupo experimental (exposto ao corante BCB – procedimento descrito adiante); após exposição ao BCB, os gametas do grupo experimental foram classificados como positivos (azulados após exposição ao corante) ou negativos (incolores após exposição ao corante) e destinados à MIV, assim como o grupo controle. Após mais 24 e 48 horas de MIV (considerando o tempo de inclusão dos gametas no estudo), foi aferido novamente o grau de maturação nuclear dos oócitos. Os fluxogramas a seguir (Figura 5 e Figura 6) ilustram o desenho experimental utilizado para o grupo de pacientes submetidas à indução da ovulação, descrito acima.

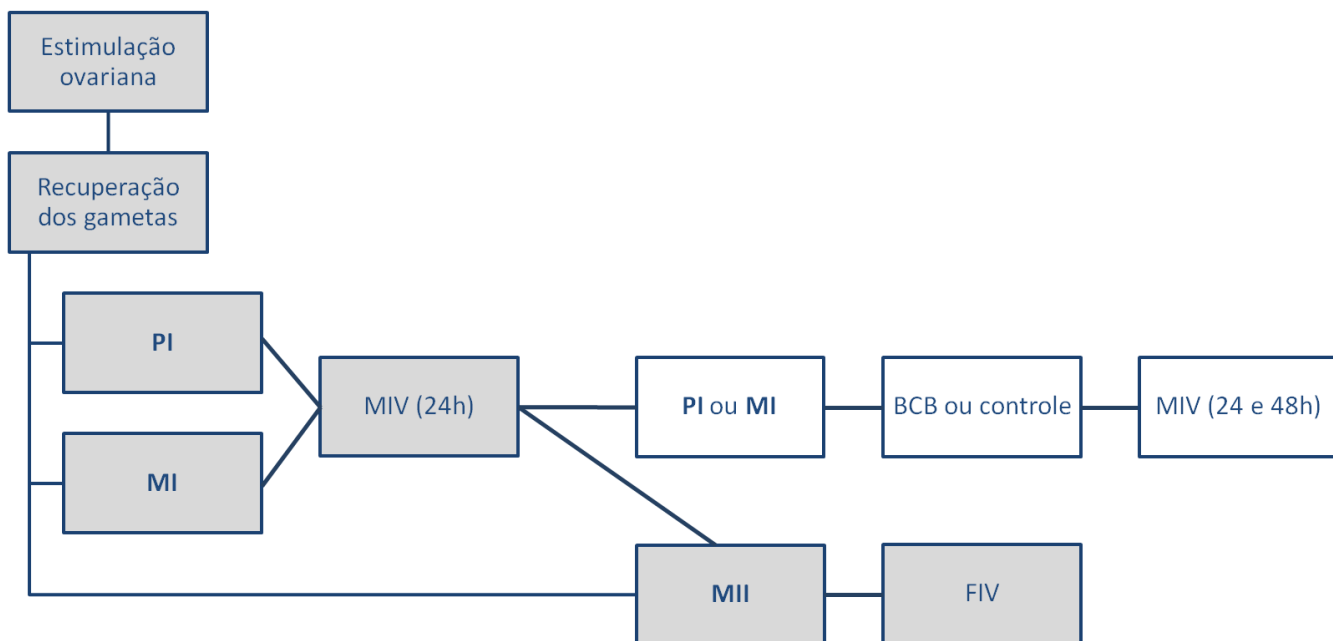


Figura 5 – Desenho experimental realizado para os gametas das pacientes submetidas à estimulação hormonal. Os quadros na cor cinza indicam o fluxograma rotineiro utilizado na Clínica, enquanto que os quadros na cor branca indicam os procedimentos adicionais que foram realizados para execução do estudo.

Dia 1	Dia 2	Dia 3
Avaliação do grau de maturidade Coloração com BCB	Avaliação do grau de maturidade (MIV 24 horas)	Avaliação do grau de maturidade (MIV 48 horas)

Figura 6 – Esquematização temporal do desenho experimental realizado para os oócitos das pacientes submetidas à estimulação hormonal que foram incluídos na pesquisa.

- Pacientes submetidas à ooforectomia:

Foram convidadas a participar do estudo pacientes do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCPA com indicação de remoção cirúrgica do ovário (ooforectomia) de acordo com seu médico assistente, independente desse estudo. Foram incluídas apenas pacientes com idade entre 20 e 40 anos e excluídas pacientes portadoras da SOP. As pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 15.5), cuja aplicação ocorreu no dia ou no turno anterior à cirurgia, quando a paciente encontrava-se internada no Hospital.

Após a remoção cirúrgica do ovário, procurou-se região ovariana saudável que apresentasse macroscopicamente aspecto fisiológico (presença de folículos visíveis, etc.), e, então, foi realizada punção ovariana em todos os folículos visíveis. Para executar a aspiração folicular, utilizou-se seringa plástica de 10 mL contendo 5 mL de soro fisiológico aquecido e uma agulha de 22 gauge (agulha cinza – 0,7 mm de calibre). Nos casos em que não havia região ovariana saudável, a paciente era excluída da pesquisa, uma vez que se tornava impossível realizar a aspiração folicular. Após a recuperação dos CCOs no líquido folicular puncionado, os gametas eram divididos de acordo com seu grupo experimental: grupo controle e grupo exposto ao BCB. O grupo controle foi destinado imediatamente à MIV, enquanto que o grupo experimental foi exposto ao corante BCB (procedimento descrito adiante) e classificado em oócitos positivos (com coloração azulada) e negativos (gametas incolores); após tal classificação, os gametas eram destinados à MIV. Decorridas 24 horas de MIV, as células do *cumulus oophorus* eram removidas, utilizando o mesmo protocolo aplicado com os gametas das pacientes submetidas à estimulação hormonal, descrito anteriormente, e foi aferido o grau de maturação nuclear dos três diferentes grupos (controle, BCB positivo e BCB negativo). Após mais 24 horas de MIV, era avaliado novamente o grau de maturação nuclear nos três diferentes grupos. O fluxograma a seguir (Figura 7) indica o delineamento experimental realizado para as pacientes submetidas à ooforectomia.

Dia 1	Dia 2	Dia 3
Recuperação do gameta Coloração com BCB	Retirada das células do <i>cumulus</i> Avaliação do grau de maturidade (MIV 24 horas)	Avaliação do grau de maturidade (MIV 48 horas)

Figura 7 – Esquemática temporal do desenho experimental dos oócitos recuperados após ooforectomia e após cesariana.

- Pacientes submetidas à cesariana:

Foram convidadas a participar do estudo as gestantes do CO do HCPA que realizariam cesárea no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital. Foram incluídas apenas pacientes de baixo risco com idade entre 20 e 40 anos que tiveram indicação de cesariana por motivos alheios a esse estudo (cesárea eletiva - desproporção céfalo-pélvica, apresentação pélvica). As pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Anexo 15.6), cuja aplicação ocorreu após o obstetra assistente indicar a necessidade de realizar cesárea.

A cesariana era realizada pela técnica habitual. Após a histerorrafia, os ovários eram identificados, expostos e a punção ovariana realizada. Todos os folículos visíveis eram puncionados utilizando seringa plástica de 10 mL contendo 5 mL de soro fisiológico aquecido e uma agulha de 22 gauge (agulha cinza – 0,7 mm de calibre), da mesma forma como descrito para o grupo de pacientes submetidas à ooforectomia. Nos casos em que houve sangramento do ovário, as punções eram interrompidas, e se realizava compressão do local com gaze; quando este procedimento não era suficiente para hemostasia, era realizada cauterização. Após a recuperação dos CCOs, os gametas foram submetidos aos mesmos procedimentos dos gametas captados das pacientes submetidas à ooforectomia – Figura 7.

#### **9.4 Cálculo do tamanho de amostra**

Inicialmente, foi realizado o cálculo de tamanho de amostra tendo como base resultados anteriores utilizando modelo animal (Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011), resultando na necessidade de 72 gametas por grupo. A partir da aquisição dos resultados do próprio experimento, utilizando gametas humanos, foi novamente calculado o tamanho de amostra necessário para indicar diferença estatística na taxa de maturação *in vitro* e de retomada de meiose entre os gametas classificados como BCB positivos e BCB negativos, resultando na necessidade de 32 gametas para cada grupo. O cálculo de tamanho da amostra foi realizado com auxílio do programa Winpepi.

#### **9.5 Coloração dos Gametas com Azul Cresil Brillhante (BCB)**

Os CCOs destinados à exposição ao corante (grupo experimental) foram incubados em solução de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline - Irvine Scientific - Ref.: 9236*) contendo 26 µM de BCB (Sigma, B-5388), por 60 minutos (temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa). Decorrido o tempo de exposição, os CCOs foram lavados em três gotas de 20 µM de DPBS, com o objetivo de remover todo o corante dos gametas, e, durante esta lavagem, os oócitos foram classificados como BCB positivo (+), quando apresentavam citoplasma azulado, ou como BCB negativo (-), quando permaneciam incolores, como representado na Figura 8. A classificação dos gametas foi realizada através de avaliação sob

esteromicroscópio com magnitude de 50x. Após a classificação dos gametas expostos ao corante, os oócitos foram lavados em três gotas de 20  $\mu$ M de meio de MIV (descrito a seguir), para remoção de qualquer resquício de DPBS, e, então, transferidos para o meio de MIV.

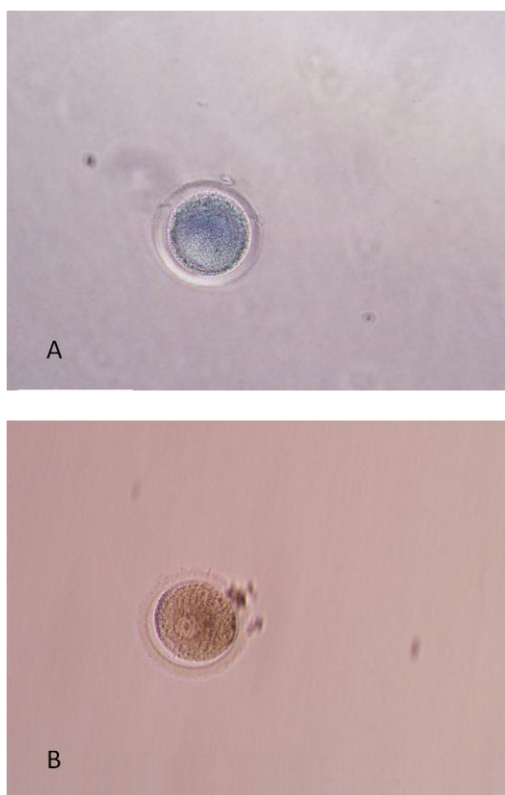


Figura 8 – Oócitos de pacientes submetidas à estimulação hormonal após exposição ao corante BCB: (A) BCB positivo; (B) BCB negativo. Magnitude de 200x.

### 9.6 Maturação *in vitro* (MIV)

Os gametas foram transferidos individualmente para placas de cultivo contendo microgotas de 20  $\mu$ M de meio de MIV: ECM suplementado com 10% de soro e 75 U.I. de FSH e de LH (Menopur® 75 U.I. Ferring - Menotropina) encobertos com óleo mineral. As placas contendo os gametas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de umidade relativa por até 48 horas.

Optou-se por não remover as células do *cumulus oophorus* antes de realizar as primeiras 24 horas de MIV, a fim de avaliar o grau de maturidade do gameta para os oócitos recuperados das pacientes submetidas à ooforectomia e à cesárea, pois foi demonstrado que não há relação entre o grau de maturidade do gameta antes da MIV e o grupo a que ele pertence - controle, BCB positivo ou BCB negativo (Alm, Torner *et al.*, 2005). Dessa forma, podemos partir do pressuposto

de que os gametas dos três grupos apresentavam os mesmos níveis de maturação nuclear quando foram destinados à MIV. Além disso, as células do *cumulus oophorus* não foram removidas antes de realizar as primeiras 24 horas de MIV, pois há descrição de que tais células somáticas, quando presentes durante a MIV, podem aumentar as taxas de maturação nuclear e citoplasmática, auxiliando processo divisional do gameta (Ben-Ami, Komsky *et al.*, 2010).

### **9.7 Avaliação da progressão da meiose**

A avaliação do grau de maturação nuclear dos gametas oriundos de pacientes submetidas à ooforectomia e à cesárea ocorreu 24 horas após a sua recuperação. Para realizar tal aferição, torna-se necessário a remoção das células somáticas que estão ao redor do gameta. O método de remoção das células do *cumulus oophorus* através da exposição do CCO à solução de hialuronidase e remoção mecânica das células, com auxílio de pipeta, descrito para os gametas das pacientes submetidas à estimulação ovariana, foi da mesma forma realizado para os gametas das pacientes submetidas à ooforectomia e à cesárea.

A classificação dos gametas na espécie humana, de acordo com o grau de maturação nuclear, pode ser realizada utilizando apenas a microscopia de luz. No entanto, em outras espécies animais, é necessário utilizar substâncias fluorescentes que permitam a visualização da configuração da cromatina. A fim de confirmarmos a nossa avaliação feita sob microscopia de luz simples, alguns gametas, no início de experimento, foram incubados por 5 minutos com solução de 5 mg/mL de Hoechst (Sigma, B2261), diluído em PBS. Após incubação, os gametas foram visualizados através de microscopia de fluorescência para avaliação da configuração da cromatina e confirmação da classificação anteriormente feita por microscopia de luz. Tendo em vista que a avaliação utilizando fluoróforos é dispensável para a espécie humana, e que esta avaliação apenas confirmava a nossa avaliação feita com microscopia de luz, passamos a avaliar os gametas apenas utilizando esse segundo método, uma vez que a avaliação com fluoróforos é mais laboriosa e onerosa.

Como descrito anteriormente, os gametas foram classificados em PI (oócito imaturo em estágio de prófase I, apresentando VG visível) - representado na Figura 9; MII (oócito com CP visível, indicando que completou meiose I) – representado na Figura 10; e MI (oócito que não apresentava nenhuma das estruturas citadas anteriormente, indicando que houve retomada da meiose pela ausência de VG, mas não foi finalizada a primeira meiose, pela ausência do CP) –

representado na Figura 11. Foi considerada maturação nuclear completa quando os gametas estavam em estágio de MII, e retomada de meiose quando os gametas estavam nos estágios MI ou MII. Cabe salientar que os gametas que apresentavam citoplasma vacuolizado, com grânulos escurecidos e espaço perivitelino aumentado foram considerados como degenerados – outro desfecho aferido a fim de avaliar a taxa de degeneração dos gametas.

Realizada avaliação do estágio de maturação nuclear, os oócitos foram incubados novamente, por mais 24 horas, em meio de MIV, e, então, aferido novamente o seu grau de maturidade.

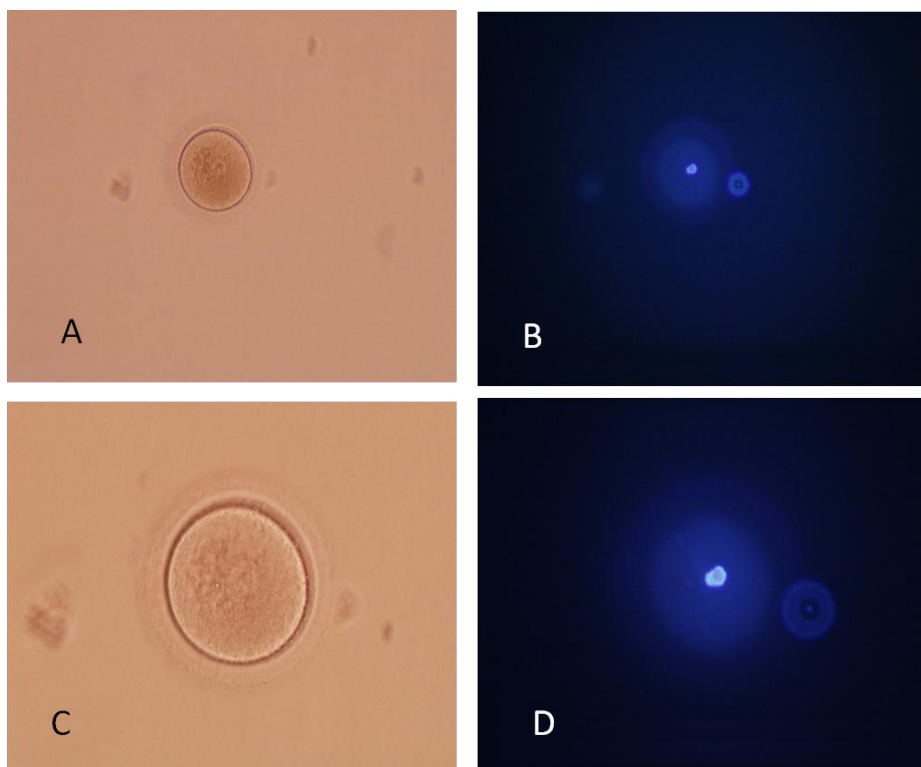


Figura 9 – Oócitos humanos imaturos em estágio de PI após 48 horas de MIV. Observar presença de VG no centro do gameta. Avaliação feita com microscopia de luz (A e C) e confirmação através de microscopia de fluorescência (B e D). Magnitude de 200 x (A e B) e de 400 x (C e D).

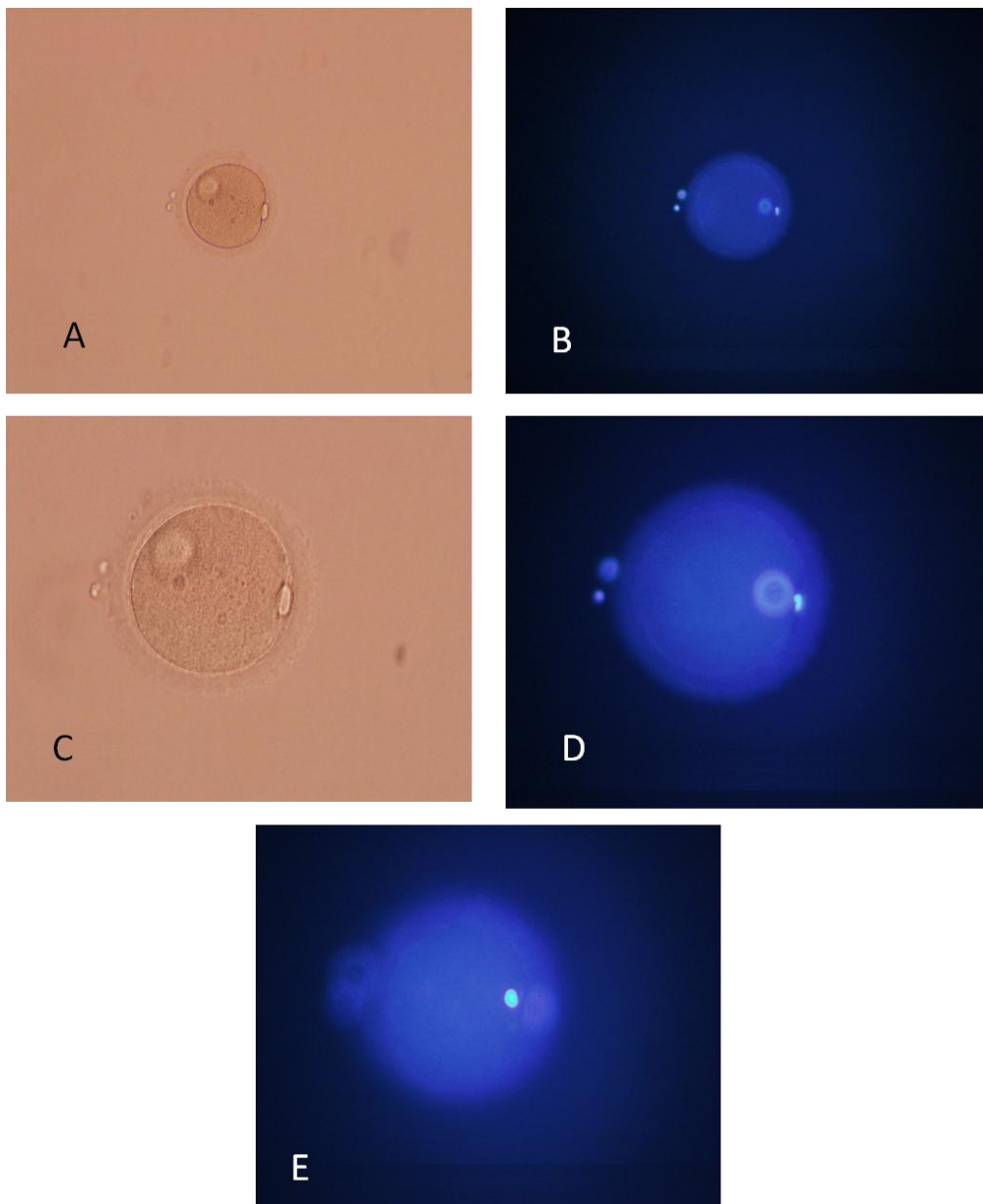


Figura 10 – Oócitos humanos maduros em estágio de MII após 48 horas de MIV. Notar presença de CP na lateral direita do gameta. Avaliação feita com microscopia de luz (A e C) e confirmação através de microscopia de fluorescência (B, D - com foco no CP, e E – com foco na placa metafásica formada ao lado do CP). Magnitude de 200 x (A e B) e de 400 x (C, De E).



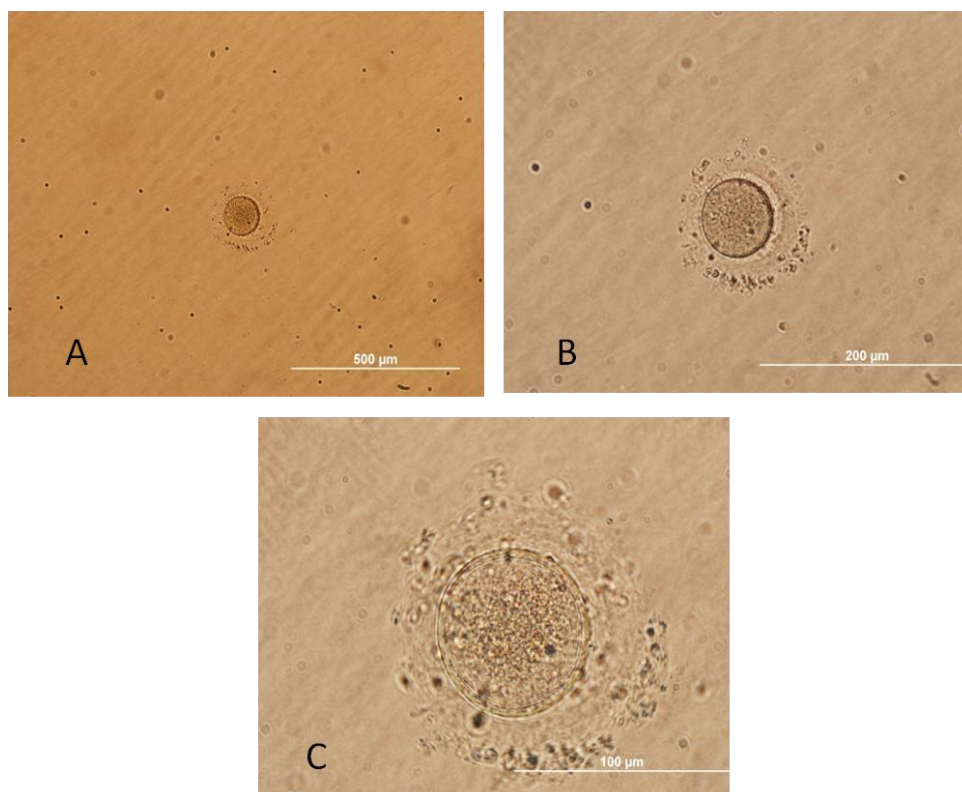


Figura 11 – Oócitos humanos imaturos em estágio de MI após 48 horas de MIV. Notar ausência das estruturas visualizadas nas figuras anteriores. Magnitude de 100 x (A), de 200 x (B) e de 400 x (C).

### 9.8 Descarte dos resíduos

De acordo com a Resolução nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005, que dispõe sobre o tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde, os resíduos biológicos gerados nesse estudo (células humanas) fazem parte do grupo A3. Esses resíduos foram acondicionados em sacos brancos contendo o símbolo universal de risco biológico, sem quaisquer outros tipos de resíduos misturados (algodão, gaze, compressas, etc.). A correta segregação dos resíduos e sua destinação, de acordo com a RDC nº 306, é responsabilidade da própria unidade geradora, por isso seguiu o plano de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde das Unidades onde o experimento foi realizado.

## 9.9 Análise estatística

Para avaliar a taxa de maturação *in vitro* dos oócitos recuperados das pacientes submetidas à estimulação hormonal, foi aplicado o teste exato de Fisher, devido ao reduzido número amostral e à ausência de resultados positivos em um dos grupos. Os resultados referentes à taxa de maturação *in vitro* dos oócitos recuperados das pacientes submetidas à ooforectomia foram avaliados através do teste  $\chi^2$ , complementado pela análise dos resíduos ajustados, quando apropriado. Para avaliar as demais variáveis, foi aplicado o teste de Equações de Estimação Generalizada (*Generalized Estimating Equations* – GEE), seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou LSD (*Last Square Mean*). O teste de GEE é o mais indicado para as avaliações realizadas em nosso trabalho, pois permite a observação de diversas medidas de uma mesma variável em um mesmo sujeito, levando em consideração a relação da amostra com o sujeito ao qual ela foi coletada (Guimarães e Hirakata, 2013); devido ao número amostral, como afirmado anteriormente, esse teste não pode ser aplicado para todas as avaliações, sendo aplicado o teste correspondente que permite avaliação com menor número amostral. Para todos os testes, foi considerada diferença estatisticamente significativa quando  $P \leq 0,05$ . Todas as análises foram feitas através do processador de dados SPSS 19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

## 9.10 Aspectos éticos

Este trabalho está de acordo ética e metodologicamente com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resoluções 196/96 e 303/00 do Conselho Nacional de Saúde), e foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – parecer nº 058/2012, registro na CONEP nº 16682; processo nº 25000.173001/2011-64, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 11/0341), reconhecido pela CONEP e pelo *Office for Human Research Protection*.

## 10. RESULTADOS

### 11.1 Taxas de maturação nuclear (MIV) e de Retomada de meiose (RM)

Seis pacientes submetidas à estimulação ovariana e captação de óvulos que apresentaram oócitos imaturos no dia da captação dos gametas e no dia subsequente participaram do estudo. Foram utilizados 17 oócitos recuperados dessas pacientes para o experimento; os demais foram utilizados para técnicas de FIV, pois eram gametas maduros no dia de sua recuperação ou maturaram nas primeiras 24 horas. Dentre os 17 oócitos imaturos, quatro (23,5%) foram destinados ao grupo controle, e 13 (76,5%) foram expostos, de acordo com o protocolo descrito anteriormente, ao corante BCB. Após a exposição dos gametas ao BCB, apenas 2 gametas (11,8%) permaneceram incolores e foram classificados como BCB negativo, enquanto que os outros 11 (64,7%) apresentaram coloração azulada sendo classificados como BCB positivo – dentre os gametas expostos ao BCB, 84,6% foram classificados como BCB positivo, e 15,4% classificados como BCB negativo. Não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de maturação nuclear (taxa de gametas que atingiram estágio de MII) entre os três grupos (controle, BCB positivo e BCB negativo), independente do tempo de MIV (24 ou 48 horas), como representado na Tabela 1.

Cabe salientar que, uma vez que alguns gametas recuperados encontravam-se em estágio de MI, ou seja, retomaram a meiose *in vivo* mas não concluíram o processo divisional, permanecendo imaturos, foi desconsiderada a avaliação da taxa de retomada de meiose para os oócitos oriundos desse grupo de pacientes.

Seis pacientes que realizaram remoção cirúrgica do ovário no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCPA foram convidadas a participar do estudo. Em apenas três casos, foi possível realizar a punção ovariana; nos demais, não foi possível identificar regiões macroscopicamente saudáveis para serem puncionadas. Nos três casos puncionados, 20 oócitos foram recuperados (média de 7,3 oócitos por paciente), sendo 6 deles (30,0%) destinados ao grupo controle e 14 (70%) destinados ao grupo experimental exposto ao BCB. Após a exposição dos gametas do grupo experimental ao corante, apenas 3 (15%) permaneceram incolores e foram classificados como BCB negativo, e os 11 restantes (55%) apresentaram coloração azulada, sendo classificados como BCB

positivo – dentre os gametas expostos ao BCB, 78,5% foram classificados como BCB positivo, e 21,5% como BCB negativo.

Não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de maturação nuclear entre os três grupos, independente do tempo de MIV, como representado na Tabela 2. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de retomada de meiose (taxa de gametas que atingiram estágio de MI, mas não concluíram a divisão meiótica e não atingiram estágio de MII) entre os três grupos após 24 horas de MIV. Todavia, após 48 horas de MIV dos gametas classificados como BCB positivo a taxa de retomada de meiose foi superior à observada no grupo BCB negativo ( $P < 0,001$ ). Ao avaliar esse parâmetro, o grupo controle não se diferenciou dos demais (Tabela 2).

Tabela 1 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes submetidas à estimulação hormonal (6 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%).  $P = 0,784$  e  $P = 0,622$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente - Teste exato de Fisher.

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)
Controle	4 (23,5)	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)
BCB +	11 (64,7)	4/11 (36,4)	6/11 (54,5)
BCB -	2 (11,8)	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)
Total	17	6/17 (35,3)	8/17 (47,1)

Tabela 2 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes submetidas à ooforectomia (3 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de  $\chi^2$  para avaliar maturação *in vitro* ( $P > 0,999$  e  $P = 0,313$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente) e Teste de GEE seguido do teste de Bonferroni para retomada de meiose em 24 horas ( $P = 0,164$ ) e 48 horas ( $**P < 0,001$  em relação ao grupo BCB -).

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	6 (30,0)	1/6 (16,7)	4/6 (66,7)	4/6 (66,7)	5/6 (83,3)
BCB +	11 (55,0)	2/11 (18,2)	6/11 (54,5)	8/11 (72,7)	9/11 (81,8) **
BCB -	3 (15,0)	0/3 (0,0)	0/3 (0,0)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)
Total	20	3/20 (15,0)	10/20 (50,0)	14/20 (70,0)	16/20 (80,0)

Quarenta e três pacientes que realizaram cesárea eletiva no Centro Obstétrico do HCPA foram convidadas a participar do estudo. Trinta e seis concordaram em participar e seus ovários foram puncionados, havendo recuperação de gametas em 32 pacientes – em 4 não foram encontrados oócitos no líquido puncionado. Nas 32 punções efetivas, 92 oócitos foram recuperados, média de 3 oócitos/paciente. Dentre os 92 gametas recuperados, 38 (41,3%) foram destinados ao grupo controle, e 54 (58,7%) foram expostos ao BCB. Após a exposição dos gametas do grupo experimental ao corante, 37 (40,2%) oócitos permaneceram incolores e foram classificados como BCB negativo, e os 17 restantes (18,5%) apresentaram coloração azulada, sendo classificados como BCB positivo – dentre os gametas expostos ao BCB, 31,5% foram classificados como BCB positivo, e 68,5% como BCB negativo.

Após 24 horas de MIV, a taxa de maturação nuclear dos oócitos dos grupos controle e BCB positivo foi superior à observada no grupo de gametas BCB negativo ( $P = 0,004$ ), como representado na Tabela 3. De forma similar, a taxa de maturação nuclear após 48 de MIV foi superior no grupo BCB positivo, quando comparado com o grupo BCB negativo ( $P = 0,032$ ). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e BCB negativo ao avaliar essa variável. Não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de retomada de meiose entre os três grupos, independente do tempo de MIV (24 ou 48 horas), como representado na Tabela 3.

A taxa de retomada de meiose dos oócitos recuperados das pacientes submetidas à ooforectomia e à cesárea foi avaliada em conjunto a fim de aumentar o número de oócitos por grupo. Os gametas recuperados das pacientes submetidas à estimulação hormonal não foram acrescentados nessa avaliação, pois a avaliação dessa variável não era adequada para esse grupo de gametas, uma vez que alguns já haviam retomado a meiose *in vivo*, como mencionado anteriormente. Esta avaliação conjunta (Tabela 4) resultou em 112 oócitos, dentre os quais 44 (39,3%) representaram o grupo controle, e 68 (60,7%) representaram o grupo experimental exposto ao BCB. Os três grupos não diferiram no que diz respeito à retomada de meiose após 24 horas de MIV. No entanto, ao avaliar a taxa de retomada de meiose após 48 horas de MIV, o grupo BCB positivo apresentou valores superiores quando comparado com os demais grupos ( $P = 0,035$ ).

Tabela 3 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de oócitos recuperados de pacientes que realizaram cesárea (32 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de GEE seguido do teste de Bonferroni ( \* $P = 0,004$  para MIV de 24 em relação ao grupo BCB negativo; #  $P = 0,032$  para MIV de 48 horas em relação ao grupo BCB negativo;  $P = 0,258$  e  $P = 0,293$  para retomada de meiose em 24 e 48 horas, respectivamente).

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	38 (41,3)	12/38 (31,6) *	16/38 (42,1)	16/38 (42,1)	17/38 (44,7)
BCB +	17 (18,5)	8/17 (47,1) *	10/17 (58,8) #	11/17 (64,7)	11/17 (64,7)
BCB -	37 (40,2)	3/37 (8,1)	8/37 (21,6)	16/37 (43,2)	16/37 (43,2)
Total	92	23/92 (25,0)	34/92 (37,0)	43/92 (46,7)	44/92 (47,8)

Tabela 4 – Avaliação da Retomada de Meiose (RM) dos gametas recuperados das pacientes submetidas à ooforetomia e à cesárea. Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de GEE seguido do teste de LSD ( $P = 0,071$  e  $P = 0,035$  para RM de 24 e 48 horas, respectivamente). \* diferença significativa em relação aos demais grupos.

	n (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	44 (39,3)	20/44 (45,5)	22/44 (50,0)
BCB +	28 (25,0)	19/28 (67,9)	20/28 (71,4) *
BCB -	40 (35,7)	18/40 (45,0)	18/40 (45,0)
Total	112	57/112 (50,9)	60/112 (53,6)

Da mesma forma, foi avaliada a taxa de maturação nuclear dos oócitos recuperados de todas as pacientes em conjunto – incluindo os resultados dos gametas das pacientes submetidas à estimulação ovariana. Dessa forma, obtivemos, como total, 129 gametas, dentre os quais 48 (37,2%) participaram do grupo controle, e 81 (62,8%) participaram do grupo experimental exposto ao BCB - dentre estes, 39 (30,2%) foram classificados como BCB positivo, e 42 (32,6%), como BCB negativo, como representado na Tabela 5. Dentre os gametas expostos ao BCB, 48,1% foram classificados como BCB positivo, e 51,9% foram classificados como BCB negativo. A taxa de maturação nuclear foi superior nos grupos controle e BCB positivo quando comparado com o grupo BCB negativo, independente do tempo de MIV (Tabela 5).

A fim de demonstrar se havia diferença entre o grupo controle e o grupo experimental (independente da classificação do gameta após exposição ao BCB – unindo os resultados dos gametas BCB positivo e negativo), foram avaliadas as taxas de MIV e de retomada de meiose dos grupos controle e experimental. Essas avaliações foram feitas a fim de aferir se a manipulação adicional realizada no grupo experimental iria interferir na viabilidade do gameta. Foi observado que o grupo controle e o grupo experimental apresentaram as mesmas taxas de MIV e de retomada de meiose para os gametas das pacientes submetidas à estimulação hormonal (Tabela 6), ooforectomia (Tabela 7) e cesárea (Tabela 8); quando essas taxas foram avaliadas nos gametas de todas as pacientes em conjunto, também não houve diferença (Tabelas 9 e 10).



Tabela 5 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas dos oócitos recuperados de todas as pacientes analisadas em conjunto (41 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de GEE seguido do teste de Bonferroni ( $P = 0,024$  e  $P = 0,015$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente). \* diferença significativa em relação ao BCB negativo.

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)
Controle	48 (37,2)	15/48 (31,3) *	22/48 (45,8) *
BCB +	39 (30,2)	14/39 (35,9) *	22/39 (56,4)*
BCB -	42 (32,6)	3/42 (7,1)	8/42 (19,0)
Total	129	32/129 (24,8)	52/129 (40,3)

Tabela 6 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes submetidas à estimulação hormonal (6 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%);  $P = 0.548$  e  $P > 0.999$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente - Teste exato de Fisher.

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)
Controle	4 (23,5)	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)
BCB	13 (76,5)	4/13 (30,8)	6/13 (46,2)
Total	17	6/17 (35,3)	8/17 (47,1)

Tabela 7 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes submetidas à ooforectomia (3 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de  $\chi^2$  para avaliar maturação *in vitro* ( $P > 0.999$  e  $P = 0.628$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente) e Teste de GEE para avaliar retomada de meiose ( $P = 0.797$  e  $P = 0.744$  para retomada de meiose de 24 e 48 horas, respectivamente).

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	6 (30.0)	1/6 (16.7)	4/6 (66.7)	4/6 (66.7)	5/6 (83.3)
BCB	14 (70.0)	2/14 (14.3)	6/14 (42.9)	10/14 (71.4)	11/14 (78.6)
Total	20	3/20 (15.0)	10/20 (50.0)	14/20 (70.0)	16/20 (80.0)

Tabela 8 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) e da Retomada de Meiose (RM) em 24 e 48 horas de gametas de pacientes que realizaram cesárea (32 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%); Teste de GEE ( $P = 0.207$  e  $P = 0.381$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente e  $P = 0.490$  e  $P = 0.642$  para avaliar RM em 24 e 48 horas, respectivamente).

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	38 (41.3)	12/38 (31.6)	16/38 (42.1)	16/38 (42.1)	17/38 (44.7)
BCB	54 (58.7)	11/54 (20.4)	18/54 (33.3)	27/54 (50.0)	27/54 (50.0)
Total	92	23/92 (25.0)	34/92 (37.0)	43/92 (46.7)	44/92 (47.8)

Tabela 9 – Avaliação da Retomada de Meiose (RM) dos gametas das pacientes submetidas à ooforetomia e à cesárea (35 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%);  $P = 0.313$  e  $P = 0.515$  para RM de 24 e 48 horas, respectivamente - Teste de GEE.

	n (%)	RM 24 h (%)	RM 48 h (%)
Controle	44 (39,3)	20/44 (45,5)	22/44 (50,0)
BCB	68 (60,7)	37/68 (54,4)	38/68 (55,9)
Total	112	57/112 (50,9)	60/112 (53,6)

Tabela 10 – Avaliação da Maturação *in vitro* (MIV) em 24 e 48 horas dos gametas de todas as pacientes analisadas em conjunto (41 pacientes). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%);  $P = 0.127$  e  $P = 0.250$  para MIV de 24 e 48 horas, respectivamente - Teste de GEE.

	n (%)	MIV 24 h (%)	MIV 48 h (%)
Controle	48 (37,2)	15/48 (31,3)	22/48 (45,8)
BCB	81 (62,8)	17/81 (21,0)	30/81 (37,0)
Total	129	32/129 (24,8)	52/129 (40,3)

## **11.2 Taxa de Degeneração**

O efeito tóxico do BCB, representado pela a taxa de degeneração dos gametas, foi comparado entre os três grupos. A taxa de degeneração dos gametas das pacientes submetidas à estimulação hormonal foi superior no grupo BCB negativo quando comparada com o grupo BCB positivo, como representado na Tabela 11. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais grupos. Da mesma forma, a taxa de degeneração dos gametas recuperados de pacientes submetidas à ooforectomia e à cesárea foi similar. Por outro lado, quando os resultados dos gametas das pacientes foram analisados em conjunto, a fim de aumentar a quantidade de gametas por grupo, foi observado que a taxa de degeneração do grupo BCB positivo foi inferior à taxa observada nos demais grupos (Tabela 11).

Novamente, a fim de avaliar se havia diferença entre o grupo controle e o grupo experimental (independente da classificação do gameta após exposição ao BCB – unindo os resultados dos gametas BCB positivo e negativo), foi avaliada a taxa de degeneração dos oócitos desses grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre a taxa de degeneração dos gametas do grupo controle e experimental, independente da fonte de recuperação do oócito, como representado na Tabela 12.

Tabela 11 – Avaliação da taxa de degeneração dos oócitos das pacientes submetidas à ooforetomia, estimulação hormonal (Teste de  $\chi^2$ ), cesárea e todas as pacientes em conjunto (Teste de GEE seguido do teste de Bonferroni). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%). \* diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo BCB negativo; # diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos.

	Estimulação	Ooforectomia	Cesárea	Todas
Controle	1/4 (25,0)	1/6 (16,7)	15/38 (39,5)	17/48 (35,4)
BCB +	0/11 (0,0) *	2/11 (18,2)	4/17 (23,5)	6/39 (15,4) #
BCB -	2/2 (100,0)	0/3 (0,0)	20/37 (54,1)	22/42 (52,4)
<i>P</i>	0,012	> 0,999	0,159	0,002

Tabela 12 – Avaliação da taxa de degeneração dos oócitos das pacientes submetidas à ooforetomia, estimulação hormonal (Teste de  $\chi^2$ ), cesárea ou todas as pacientes em conjunto (Teste de GEE). Resultados expressos em número de oócitos (n) e porcentagem (%).

	Estimulação	Ooforectomia	Cesárea	Todas
Controle	1/4 (25,0)	1/6 (16,7)	15/38 (39,5)	17/48 (35,4)
BCB	2/13 (15,4)	2/14 (14,3)	24/54 (44,4)	28/81 (34,6)
<i>P</i>	> 0,99	0,659	> 0,99	0,916

## 11. DISCUSSÃO

A dificuldade na obtenção de gametas femininos que possam ser destinados à pesquisa prejudica o desenvolvimento e o aprimoramento das técnicas de RA (Catalá, Izquierdo *et al.*, 2012). Para aplicação clínica e de pesquisa, oócitos podem ser coletados de diversas fontes: *post mortem* (muito utilizado na reprodução animal, uma vez que o ovário é material de descarte após o abate), através da aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal (Bols, E.P.A. *et al.*, 2012), ou em procedimentos cirúrgicos, nos quais se incluem a ooforectomia, a cesárea e a tuboplastia (Cha, Koo *et al.*, 1991; Cha e Chian, 1998). Para pesquisa em humanos, a recuperação *post mortem* não apresenta aplicabilidade devido à dificuldade na obtenção de amostra; por esse motivo, essa fonte de gametas não foi incluída em nosso estudo. A recuperação de gametas através de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal torna-se possível apenas nos casos em que a paciente já está realizando tratamento de infertilidade, e esse procedimento já faz parte do seu tratamento, pois a aspiração necessita de sedação e é um procedimento invasivo - e, como observado em nosso estudo, essa fonte de oócitos não permite destinação de muitos gametas à pesquisa, por conseguinte, a recuperação de gametas durante procedimentos cirúrgicos apresenta-se como a melhor opção de fonte de gametas. No entanto, a coleta de oócitos humanos em procedimento cirúrgicos como ooforectomia parece não ser muito eficaz, uma vez que a maioria das pacientes que realiza esse procedimento apresenta idade avançada e/ou saúde ovariana comprometida - como observado em nosso trabalho, no qual ao longo de 18 meses (período em que as pacientes foram recrutadas para participar do estudo) apenas seis pacientes apresentavam idade adequada para serem incluídas e, dessas seis, metade não pôde participar devido à ausência de regiões ovarianas saudáveis.

Dessa forma, resta como melhor opção de fonte de oócitos a coleta durante procedimentos de cesariana que, como observado, resultou na maior fonte de gametas. Durante o período de recrutamento das pacientes, 6 meses, 43 gestantes se enquadravam nos critérios de inclusão e foram convidadas a participar do estudo. Cabe salientar que a fonte de gametas deve estar relacionada com o perfil do serviço prestado pela Instituição que está associada à pesquisa; em nosso estudo, a recuperação de oócitos a partir de procedimentos cirúrgicos que envolviam remoção do ovário não permitiu recuperação de grande quantidade de gametas, como afirmado anteriormente, devido ao baixo número de pacientes disponíveis; no entanto, resultado contrário

foi descrito por Cha e colaboradores em 1991, que conseguiram em período de apenas um ano coletar 23 ovários saudáveis – resultando na obtenção de 270 oócitos imaturos; essa fonte de gametas certamente é a mais indicada à pesquisa, pois o material biológico (ovário) seria corretamente descartado, não havendo alteração no curso do tratamento da paciente. Apesar disso, em nosso estudo, notamos que a coleta durante cesárea possibilitou o maior número amostral, sem o qual inviabilizaria o desenvolvimento do experimento. Dessa forma, a fonte de recuperação dos gametas destinados à pesquisa deve enquadrar-se não apenas com o perfil de serviço prestado pela Instituição envolvida, mas também com o perfil de paciente que procura o serviço e com o sucesso na obtenção dos oócitos.

Para cada perfil fisiológico de paciente doadora de oócitos, devemos considerar alguns interferentes relevantes. A utilização de oócitos imaturos oriundos de pacientes estimuladas é possível, pois, mesmo havendo estimulação hormonal, 10 a 15% destes estão em estágio de PI (Cha e Chian, 1998) devido à assincronia no crescimento e na maturação das coortes foliculares (Edirisinghe, Junk *et al.*, 1997; Kim, Lee *et al.*, 2000). Uma vez que esses gametas, em sua maioria, são descartados pelas clínicas de RA, a sua destinação à pesquisa é viável. No entanto, devemos levar em consideração que os oócitos de pacientes não estimuladas com hormônios apresentam atraso de aproximadamente 15 horas na extrusão do CP, quando comparado com gametas oriundos de pacientes estimuladas (Cha e Chian, 1998). Esse resultado também foi observado em nosso experimento: oócitos do grupo controle de pacientes hormonalmente estimuladas apresentaram taxas elevadas de maturação nuclear logo após 24 horas de MIV e tal valor não apresentou diferença após 48 horas (taxas de MIV de 50% nos dois momentos); por outro lado, oócitos do grupo controle de pacientes não estimuladas, submetidas à ooforectomia e à cesárea, apresentaram taxas de maturação nuclear crescente ao comparar as 24 e as 48 horas de MIV (16,7% para 66,7% e 31,6% para 42,1%, respectivamente), indicando que esses gametas necessitaram de maior tempo de MIV para completar o processo de maturação nuclear. Esse fato já era esperado, uma vez que as gonadotrofinas são imprescindíveis nos processos de crescimento e de maturação do gameta feminino (Cha e Chian, 1998), e que os oócitos das pacientes hormonalmente estimuladas são expostos a altas concentrações desses hormônios.

A taxa de MIV no grupo de gametas recuperados de pacientes submetidas à estimulação hormonal observada em nosso experimento (50%) foi um pouco inferior à descrita por outros autores (aproximadamente 70%) (Kim, 2000; Bem-Ami, 2010; Trouson 1994; Barnes 1996). Isso se deve ao fato de que os oócitos utilizados em nosso experimento eram gametas que seriam

descartados por apresentarem baixa qualidade, uma vez que não maturaram *in vivo* nem *in vitro* após 24 horas de MIV. Cabe salientar que a qualidade dos oócitos imaturos recuperados das pacientes submetidas à estimulação hormonal é questionada, uma vez que eles falharam no processo de maturação *in vivo*, e, ainda que tenham recebido o aporte hormonal necessário, mesmo assim, não conseguiram completar sua maturação nuclear (Fasano, Vannin *et al.*, 2010). Apesar dessa fonte de gametas apresentar este viés, a utilização de oócitos imaturos recuperados de ciclos estimulados é adequada não apenas para pesquisa, mas também para a utilização em procedimentos de RA, uma vez que há grande quantidade de oócitos recuperados - até 50% dos gametas recuperados em ciclos estimulados são imaturos (Edirisinghe, Junk *et al.*, 1997; Cha e Chian, 1998), e a utilização desses oócitos pode resultar em gestação, mesmo após criopreservação desse gameta (Tucker, Wright *et al.*, 1998), ou após a criopreservação dos embriões oriundos desses oócitos (Edirisinghe, Junk *et al.*, 1997).

A utilização de oócitos imaturos de pacientes submetidas à cesariana é possível, pois está demonstrado que a punção ovariana não está relacionada a complicações pós-operatórias, como infecções, presença de hemorragia ou de dor abdominal; as complicações relacionadas com a recuperação de oócitos durante procedimentos cirúrgicos estão relacionadas aos inconvenientes inerentes aos efeitos dos anestésicos utilizados (Le Du, Kadoch *et al.*, 2005; Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010). De modo similar, em nosso estudo, não foram relatadas complicações pós-operatórias decorrentes do procedimento de punção ovariana. A segurança deste procedimento corrobora a ideia de que a recuperação de oócitos durante cesariana pode ser não apenas uma fonte adequada de gametas a serem doados, uma vez que o principal problema para os programas de doação de oócitos é a limitada fonte de doadoras (Chian, Buckett *et al.*, 2004), mas também uma fonte de gametas a serem utilizados visando a gestações futuras em cesáreas de pacientes que realizaram tratamento de infertilidade e obtiveram gestação (Hwu, Lee *et al.*, 1998; Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010).

Considerando como perfil de doadora de gametas as gestantes, devemos considerar o fato de que o ambiente hormonal ao qual o ovário está submetido é bastante peculiar, e temos pouco conhecimento acerca do ambiente folicular ao qual o oócito está exposto (Hwu, Lee *et al.*, 1998). A taxa de gametas recuperados por gestante encontrada em nosso estudo (3,02) foi similar à descrita por Hwu e colaboradores (1998), de 5,3. Esses valores são inferiores ao descrito em recente relato de caso, no qual 13 gametas foram recuperados de gestante de 38 anos (Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010). No entanto, assim como em nosso estudo e no estudo de Hwu e



colaboradores (1998), o máximo de gametas recuperados durante a cesárea foi de 9 e de 15 oócitos, respectivamente - valores similares aos descritos por Ben-Haroush e colaboradores (2010). Portanto, devemos levar em consideração a média de gametas recuperados por gestante e não apenas casos isolados, uma vez que há grande variação na quantidade de oócitos recuperados por paciente. A relativa pequena quantidade de oócitos recuperados durante a cesárea pode ser explicada por alguns fatores: a alta concentração de progesterona pode suprimir o desenvolvimento folicular (Tabandeh, Golestani *et al.*, 2012), assim como o fato de que sob os altos níveis de hCG os pequenos folículos antrais crescem apenas até 5 mm de diâmetro e, então, entram em atresia (Hwu, Lee *et al.*, 1998). Ainda com relação ao diâmetro folicular, sabe-se que folículos recuperados na fase folicular do ciclo menstrual são maiores que os recuperados na fase lútea (Tabandeh, Golestani *et al.*, 2012), e o ambiente hormonal ao qual se encontra a paciente no final da gestação se assemelha muito mais à fase lútea do que à fase folicular; concluímos, portanto, que, na fase final da gestação, encontramos menor quantidade de folículos ovarianos, que, em sua maioria, apresentam menor diâmetro, fato que dificulta o sucesso da recuperação de oócitos nesse momento. Além dos interferentes hormonais, devemos considerar que durante o procedimento de cesárea podemos aspirar apenas os folículos que estão nas regiões mais corticais do ovário – folículos em regiões mais internas do córtex, por não serem visíveis, não podem ser aspirados (Hwu, Lee *et al.*, 1998). Apesar da relativa baixa quantidade de gametas recuperados em sessões cesáreas, demonstramos que a recuperação de oócitos imaturos com potencial de desenvolvimento durante a cesárea é procedimento viável, corroborando achados que mostram a possibilidade de utilização desses gametas para técnicas de RA (Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010). Adicionalmente, a qualidade dos oócitos parece não ser alterada de acordo com os níveis de progesterona (Rodrigues, Rodriguez *et al.*, 2009), confirmando a segurança da utilização de tais gametas. Infelizmente, é parca a literatura referente à recuperação de gametas durante a cesárea (Hwu, Lee *et al.*, 1998; Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010), devido às implicações éticas, fato que dificulta a comparação de resultados. A maioria dos experimentos que envolvem MIV de oócitos imaturos está relacionada à recuperação de oócitos através de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal em pacientes portadoras da SOP (Trounson, Anderiesz *et al.*, 2001).

Contrastando com o pequeno número de gametas recuperados de gestantes, procedimentos que envolvem a remoção cirúrgica do ovário permitem recuperação de maior quantidade de gametas. O valor médio de recuperação observado em nosso experimento (7,3 oócitos/paciente) está de acordo com o observado na literatura (Durinzi, Wentz *et al.*, 1997). A coleta de gametas

nesses procedimentos apresenta como vantagem a possibilidade de recuperar os gametas pela técnica de escarificação do ovário (Tsuji, Sowa *et al.*, 1985), e não apenas através da aspiração folicular, permitindo recuperação de maior quantidade de gametas. Os oócitos recuperados dessas pacientes apresentam qualidade adequada, uma vez que foi demonstrada possibilidade de desenvolvimento embrionário e, inclusive, de gestação a partir deles (Cha, Koo *et al.*, 1991). Em nosso estudo, demonstramos que, apesar da presença de neoplasia ovariana, as regiões saudáveis do ovário apresentavam gametas adequados, uma vez que as taxas de MIV do grupo controle chegaram a 66,7% - a maior dentre os três perfis de pacientes utilizados no estudo.

A taxa de MIV observada no grupo de gametas controle oriundos de pacientes submetidas à cesárea encontrada em nosso estudo (42,1%) foi inferior à relatada em outros estudos utilizando o mesmo modelo de paciente para obtenção de gametas – 76% (Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010) e 67% (Hwu, Lee *et al.*, 1998). No entanto, devemos salientar o fato de que no experimento de Hwu e colaboradores (1998), as células do *cumulus oophorus* foram removidas antes de realizar a MIV, a fim de avaliar o grau de maturidade nuclear do gameta e, nesse momento, os oócitos degenerados, que totalizaram aproximadamente 15% da coorte de oócitos recuperados, foram desprezados. Esse fato certamente influenciou no aumento da taxa de MIV, pois grande parcela dos oócitos inadequados foi descartada, e apenas gametas saudáveis foram destinados a esta tecnologia. Em nosso experimento, optamos por não remover as células do *cumulus oophorus*, uma vez que tais células somáticas, quando presentes durante a MIV, podem aumentar as taxas de maturação citoplasmática, auxiliando o gameta no seu processo divisional (Ben-Ami, Komsky *et al.*, 2010). Devemos observar também que a taxa de MIV descrita por Ben-Haroush e colaboradores (2010), 76%, foi superior à encontrada em nosso estudo; no entanto, trata-se de um relato de caso não havendo consideração da variabilidade da taxa de MIV entre pacientes. Valores como esse, e até mesmo superiores, também foram encontrados em nosso estudo, e, se fossem avaliados isoladamente, poderiam inferir ideia errônea da verdadeira taxa de MIV no grupo de pacientes gestantes. É necessário levar em consideração a variabilidade dos gametas a fim de ter ideia real do desenvolvimento oocitário. Dessa forma, concluímos que a taxa de MIV no grupo de gametas controle oriundos de gestantes é adequada e corrobora a possibilidade de utilização desses gametas em procedimento de RA.

A taxa de gametas classificados como BCB positivo foi similar entre o grupo de oócitos recuperados de pacientes submetidas à estimulação hormonal (84,6%) e ooforectomia (78,5%), e similar à média descrita nas espécies animais (aproximadamente 60%) (Pujol, Lopez-Bejar *et al.*,

2004; Coy, Romar *et al.*, 2005; Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Castaneda, Kaye *et al.*, 2013). No entanto, esse valor apresentou-se reduzido no grupo de pacientes submetidas à cesárea (31,5%). Essa observação pode ser explicada pelo fato de que a taxa de gametas classificados como BCB positivo apresenta grande variação, sendo influenciada pelo diâmetro do folículo do qual o oócito foi recuperado (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010). Sabemos que o diâmetro dos folículos encontrados no final da gestação, máximo de 6 mm (Hwu, Lee *et al.*, 1998; Ben-Haroush, Sapir *et al.*, 2010), é inferior ao diâmetro dos folículos observados em pacientes estimuladas com hormônios e em pacientes submetidas à ooforectomia, devido ao ambiente hormonal ovariano, que suprime o desenvolvimento folicular, como afirmado anteriormente. Da mesma forma, temos o conhecimento de que, em geral, gametas BCB positivo são recuperados de folículos com diâmetros maiores (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005); dessa forma, podemos sugerir que a menor taxa de gametas classificados como BCB positivo encontrado no grupo de gestantes deva-se ao fato de que os oócitos nesse grupo de pacientes são coletados de folículos com diâmetros menores. Nossos resultados corroboram a observação de que a porcentagem de gametas classificados como BCB positivo aumenta conforme aumenta o tamanho folicular (Karami-Shabankareh e Mirshamsi, 2012). Ao observarmos a taxa de gametas classificados como BCB positivo encontrada no grupo de pacientes gestantes (31,5%), podemos observar que é similar à relatada por Karam-Shabankareh e colaboradores (2012) para o grupo de gametas coletados de folículos com até 3 mm (36,9%), que são mais semelhantes aos coletados de pacientes ao final da gestação. A recuperação dos oócitos em folículos com diâmetros menores nas pacientes gestantes pode explicar, pelo menos em parte, as menores taxas de MIV observadas nesse grupo de pacientes, uma vez que é reconhecido o fato de que oócitos oriundos de folículos com mais de 10 mm apresentam maiores taxas de MIV quando comparados com seus homólogos oriundos de folículos com menos de 10 mm (Tsuji, Sowa *et al.*, 1985; Goudet, Bézard *et al.*, 1997; Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005). Apesar disso, como afirmado anteriormente, as taxas de MIV do grupo de gestante observadas em nosso experimento foram satisfatórias.

Apesar de já haver sido demonstrado que a avaliação morfológica do CCO para a seleção de gametas imaturos competentes para o desenvolvimento é bastante subjetiva e apresenta baixa acurácia, esta técnica continua sendo realizada (Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Su, Wang *et al.*, 2012). Como alternativa, a seleção dos oócitos por meio da coloração com o corante BCB tem sido proposta e bastante aceita na literatura. Até o presente momento, não temos conhecimento da aplicação desse corante na espécie humana, sendo este

trabalho o primeiro a testar a aplicabilidade do BCB como método de seleção de oócitos humanos com potencial de desenvolvimento. Assim como observado por outros autores (Ericsson, Boice *et al.*, 1993; Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Rodríguez-González, López-Bejar *et al.*, 2003; Urdaneta, Jiménez-Macedo *et al.*, 2003; Alm, Torner *et al.*, 2005; El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006; Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Wu, Liu *et al.*, 2007; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Egerszegi, Alm *et al.*, 2010; Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011; Silva, Rodriguez *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M. *et al.*, 2012; Su, Wang *et al.*, 2012; Wang, Lin *et al.*, 2012), ao utilizarem diversos modelos animais, a taxa de MIV de gametas humanos classificados como BCB positivo foi superior em comparação com a taxa encontrada no grupo de oócitos classificados como BCB negativo. Esse resultado apenas não foi encontrado quando avaliamos os gametas de pacientes submetidas à estimulação hormonal e à ooforectomia separadamente. No entanto, a ausência de diferença estatisticamente significativa pode ter sido decorrente do reduzido número amostral de gametas oriundos destes tipos de pacientes. Corroborando essa justificativa, observa-se que o teste estatístico mais adequado para realizar a avaliação da taxa de MIV (teste de GEE) não pode ser aplicado devido ao tamanho da amostra. Contudo, ao avaliarmos os gametas de pacientes submetidas à cesárea, ou ao avaliarmos os gametas de todas as pacientes em conjunto (aumentando o número amostral), é notável o aumento nas taxas de MIV de gametas BCB positivo comparado com seus homólogos negativos. Este nosso resultado corrobora os achados encontrados em modelos animais, citados anteriormente neste parágrafo, e indica que oócitos de mulheres classificados como BCB positivo e negativo apresentam diferente potencial de desenvolvimento, sugerindo que a seleção de gametas através do BCB é adequada para diferenciar estes oócitos.

Neste estudo, não há diferença estatisticamente significativa entre a taxa de MIV do grupo BCB positivo e do grupo controle, assim como a maioria dos estudos em que esta comparação foi realizada (Alm, Torner *et al.*, 2005; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Wu, Liu *et al.*, 2007; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Egerszegi, Alm *et al.*, 2010; Alcoba, Da Rosa Braga *et al.*, 2011; Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011; Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Soleimani, M. *et al.*, 2012; Su, Wang *et al.*, 2012; Pereira, Lorenzo *et al.*, 2013). Esse fato torna questionável a aplicação clínica do BCB, uma vez que a exposição ao corante não traz benefício sobre o método utilizado rotineiramente. A aplicação do BCB, idealmente, deveria fornecer amostra de gametas que apresentasse taxas de MIV superiores às observadas no grupo controle. No entanto, a ausência de benefício não invalida

o fato de que o corante conseguiu, de forma eficaz, diferenciar duas populações de oócitos com potenciais de desenvolvimento diferentes. Devemos ter em mente o fato de que a finalidade da aplicação do BCB não é aprimorar a qualidade do gameta (e conseqüentemente aumentar os resultados de desenvolvimento oocitário), mas sim selecionar os gametas mais aptos ao desenvolvimento e, dessa forma, indicar dois grupos de gametas com características diferentes; para essa finalidade, demonstramos que o BCB mostrou-se eficaz na espécie humana. Outro fato que deve ser levado em consideração, ao observarmos os Anexos 15.1, 15.2 e 15.3, são os benefícios da utilização do BCB, principalmente, em avaliações de longo prazo, como número de células que formam o blastocisto e taxa de nascidos vivos (Anexo 15.3). Nessas avaliações, os gametas BCB positivo apresentaram resultados superiores quando comparados não apenas ao grupo BCB negativo, mas também ao grupo controle, quando este estava presente no estudo (Alm, Torner *et al.*, 2005; Bhojwani, Alm *et al.*, 2007; Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Heleil, Kuzmina *et al.*, 2010; Catalá, M. G., Izquierdo, D. *et al.*, 2011; Su, Wang *et al.*, 2012). Dessa forma, podemos sugerir que o BCB pode trazer benefícios (melhorando os resultados das técnicas de RA), quando aplicado como método de seleção de gametas competentes, porém esses benefícios não são observados em curto período de tempo (ao avaliarmos parâmetros como taxas de MIV e de FIV). São necessárias avaliações embrionárias mais tardias para que as vantagens na utilização do BCB sejam demonstradas.

Apesar do exposto, não podemos ignorar o fato de que a taxa de formação de blastocisto foi relatada como similar entre o grupo controle e o grupo BCB positivo por inúmeros pesquisadores (Sugulle, Katakawa *et al.*, 2006; Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006; Opiela, Katska-Ksiazkiewicz *et al.*, 2008; Ishizaki, Watanabe *et al.*, 2009; Mota, Batista *et al.*, 2010; Opiela, Lipiński *et al.*, 2010; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011); por conseguinte, a real aplicabilidade deste corante nas espécies animais ainda é questionada. No entanto, devemos salientar que há apenas um trabalho em bovinos utilizando o desfecho clínico mais importante, a taxa de nascidos vivos, que demonstrou que gametas BCB positivo apresentam os melhores resultados quando comparados com os demais grupos, incluindo o grupo controle (Su, Wang *et al.*, 2012). Interessantemente, nesse trabalho observamos que as taxas de MIV e de FIV foram similares entre os grupos de gametas BCB positivo e controle, corroborando nossa hipótese de que a aplicação do BCB pode otimizar os desfechos mais tardios das técnicas de RA e não apenas aqueles iniciais relacionadas à qualidade oocitária e embrionária. Na espécie humana, permanece a dúvida sobre o real benefício da utilização do BCB com o intuito de aprimorar os resultados das técnicas de RA,

pois não foi possível observar o desenvolvimento embrionário, uma vez que a fertilização dos gametas coletados, por motivos éticos, não foi realizada. Apesar disso, nosso trabalho demonstrou, como afirmado anteriormente, que, para o propósito de diferenciar duas coortes de oócitos com competências distintas, o BCB é método adequado e exequível para a espécie humana. Adicionalmente, demonstramos que a aplicação do BCB não afetou a viabilidade nem o desenvolvimento dos oócitos, uma vez que as taxas de MIV, de retomada de meiose e de degeneração foram similares, em todas as avaliações, entre o grupo experimental (exposto ao corante: BCB positivo somado ao BCB negativo) e o controle. Estes resultados demonstram a segurança da aplicação do BCB na espécie humana e devem estimular estudos que almejem avaliar o desenvolvimento de embriões humanos oriundos de oócitos corados com o BCB.

A taxa de retomada de meiose dos gametas classificados como BCB positivo (71,4%) foi superior às taxas observadas tanto no grupo BCB negativo (45%) quanto no grupo controle (50%), ao avaliarmos os gametas de todas as pacientes. Este resultado indica qualidade superior dos gametas classificados como BCB positivo em relação aos demais, e pode ser explicado pelo fato de que gametas BCB positivo encontram-se em estágios mais finais da PI, comparado com oócitos BCB negativo (Torner, Ghanem *et al.*, 2008; Egerszegi, Alm *et al.*, 2010), fato que facilitaria a retomada de meiose nesse grupo de gametas. Outro fator que indica a qualidade superior dos gametas BCB positivo, quando comparados com seus homólogos do grupo controle e do grupo BCB negativo é a menor taxa de degeneração neste grupo.

A taxa de degeneração é um indicador importante da qualidade do oócito, visto ser referida como a principal causa de falha de fertilização (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010). Uma vez que gametas BCB positivo apresentaram as menores taxas de degeneração, podemos presumir que a fertilização desses gametas não será prejudicada, corroborando nossos resultados relacionados à segurança de aplicação do BCB na espécie humana. Confirmando estes resultados, que indicam qualidade superior dos gametas pertencentes ao grupo BCB positivo, podemos observar que outros indicadores de qualidade oocitária, como diâmetro do gameta e taxa de penetração de espermatozoides, foram referidos como superiores nos oócitos BCB positivo, em comparação não apenas com seus homólogos do grupo BCB negativo (Rodriguez-Gonzalez, Lopez-Bejar *et al.*, 2002; Pujol, Lopez-Bejar *et al.*, 2004; Manjunatha, Gupta *et al.*, 2007; Karami-Shabankareh e Mirshamsi, 2012), mas também com os gametas do grupo controle (Ericsson, Boice *et al.*, 1993; Roca, Martinez *et al.*, 1998; El Shourbagy, Spikings *et al.*, 2006; Mohammadi-Sangcheshmeh, Held *et al.*, 2011). Opondo-se à adequada qualidade dos gametas BCB positivo, mais da metade (52,4%) dos

oócitos pertencentes ao grupo BCB negativo encontrava-se em estágio de atresia - esse valor situa-se entre os descritos na literatura, variando de 30% (Egerszegi, Alm *et al.*, 2010) até 80% (Mlodawska, Pawlowska *et al.*, 2005). Essa observação, somada ao fato de que gametas BCB negativo não conseguiram formar blastocisto (Wongsrikeao, Otoi *et al.*, 2006) nem nascidos vivos (Su, Wang *et al.*, 2012), remete-nos ao pensamento de que gametas BCB negativo apresentam pior qualidade. Visto que este grupo de oócitos representa parcela dos gametas recuperados, sugerimos a avaliação de outras condições de cultivo desses gametas que possa restaurar a sua qualidade e, dessa forma, permitir que tais oócitos não sejam descartados, mas sim, que sejam destinados às técnicas de RA e que possam trazer resultados positivos. Diante do exposto, podemos confirmar que gametas BCB positivo e negativo formam grupos de oócitos que apresentam qualidades diferentes, representando a diversidade dos oócitos recuperados.

## 12. CONCLUSÕES

Este trabalho foi o primeiro a descrever a aplicação do corante Azul Cresil Brilhante na espécie humana. Considerando os resultados observados em nosso estudo, podemos concluir que a utilização do BCB permite selecionar oócitos humanos com maior potencial de desenvolvimento (avaliado através das taxas de MIV e de retomada de meiose), e permite a diferenciação de dois grupos de gametas com potências de desenvolvimento diferentes: oócitos corados com o BCB apresentam melhores resultados quando comparados com seus homólogos que permanecem incolores após exposição ao corante. No entanto, a seleção de oócitos utilizando a aplicação do BCB não demonstrou benefício sobre o método de seleção convencional: o principal desfecho avaliado (taxa de MIV) foi igual nos grupos BCB positivo e controle.

A taxa de degeneração foi similar nos grupos experimental e controle; adicionalmente, não houve interferência da aplicação do BCB sobre o desenvolvimento *in vitro* dos gametas: os resultados referentes à taxa de MIV e à taxa de retomada de meiose foram similares entre os grupos experimental e controle. Além disso, a taxa de degeneração do grupo BCB positivo foi inferior à observada nos demais grupos, indicando a qualidade adequada dos gametas pertencentes a esse grupo. São necessários estudos posteriores que avaliem outros desfechos clínicos, como formação de blastocisto, para auxiliar na conclusão do real benefício de aplicação do BCB na espécie humana. Estimulando e permitindo com maior segurança estudos futuros, demonstramos que a aplicação do BCB não traz prejuízos ou danos, aparentes, ao oócito.

A partir do trabalho realizado, podemos concluir que, para as técnicas de RA em humanos, a aplicação do BCB mostrou-se exequível e pouco laboriosa, uma vez que não trabalhamos com muitos gametas ao mesmo tempo.

A média de gametas recuperados durante os procedimentos cirúrgicos (ooforectomia e cesárea) sugere que o perfil hormonal presente nas gestantes diminui a quantidade de folículos passíveis de serem puncionados e, conseqüentemente, a quantidade de oócitos recuperados.

A recuperação de gametas durante as cesáreas, assim como a sua posterior utilização para técnicas de RA, é possível e viável, fortemente estimulando o seu uso como fonte de oócitos a serem destinados não apenas à pesquisa, mas também à aplicação clínica, uma vez que a cesárea apresenta-se como momento de fácil realização de punção ovariana. Além disso, a ausência de



efeitos adversos advindos da punção realizada durante a cesárea permite, com maior segurança, estimular esse procedimento como fonte de obtenção de gametas.

No que diz respeito à variação do protocolo de aplicação do BCB, ao observarmos que a taxa de gametas classificados como BCB positivo foi adequada e que não foram observados prejuízos sobre o desenvolvimento dos oócitos expostos ao corante, concluímos que o protocolo de aplicação do BCB utilizado em nosso experimento (exposição dos gametas por 60 minutos a 26  $\mu$ M de BCB diluído em DPBS) apresenta segurança e eficácia na seleção dos gametas humanos, sendo considerado adequado para tal espécie.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Animal Reproduction Science*, p. 49-65, OCT 2008 2008. ISSN 0378-4320.

AGDI, M. et al. Effects of ovarian puncture for in vitro maturation on subsequent in vitro fertilization cycle in women with polycystic ovaries. *Fertil Steril*, v. 94, n. 1, p. 381-3, Jun 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20004390> >.

ALCOBA, D. D. et al. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote*, p. 1-8, Jul 2011. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791168> >.

ALM, H. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*, p. 2194-2205, MAY 2005 2005. ISSN 0093-691X.

ALVAREZ, G. et al. Modulation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway Influences Porcine Oocyte In Vitro Maturation. *Reprod Domest Anim*, Nov 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23189959> >.

BEN-AMI, I. et al. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Hum Reprod*, Oct 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961941> >.

BEN-HAROUSH, A.; SAPIR, O.; FISCH, B. Aspiration of immature oocytes during cesarean section for fertility preservation and future surrogacy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 203, n. 1, p. e12-4, Jul 2010. ISSN 1097-6868. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20609698> >.

BHOJWANI, S. et al. Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, p. 341-345, JAN 15 2007 2007. ISSN 0093-691X.

BOLS, P. E. J. et al. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*. 9: 420-425 p. 2012.

CASTANEDA, C. A. et al. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 3, p. 417-22, Feb 2013. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199746> >.

CATALÁ, M. G. et al. Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertil Steril*, v. 97, n. 4, p. 1004-8, Apr 2012. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265000> >.

CATALÁ, M. T. et al. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, v. 142, n. 4, p. 517-27, Oct 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757473> >.

CHA, K.-Y. et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility and Sterility*. 55: 109-113 p. 1991.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*, v. 4, n. 2, p. 103-20, 1998 Mar-Apr 1998. ISSN 1355-4786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683349> >.

CHIAN, R. C.; BUCKETT, W. M.; TAN, S. L. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, v. 8, n. 2, p. 148-66, Feb 2004. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14989791> >.

CHIAN, R. C.; LIM, J. H.; TAN, S. L. State of the art in in-vitro oocyte maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v. 16, n. 3, p. 211-9, Jun 2004. ISSN 1040-872X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15129050> >.

COY, P. et al. Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with Roscovitine. *Reproduction*, v. 129, n. 6, p. 747-55, Jun 2005. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923390> >.

DEKEL, N. Molecular control of meiosis. *Trends Endocrinol Metab*, v. 6, n. 5, p. 165-9, Jul 1995. ISSN 1043-2760. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18406698](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18406698) >.

DURINZI, K. L. et al. Follicle stimulating hormone effects on immature human oocytes: in vitro maturation and hormone production. *J Assist Reprod Genet*, v. 14, n. 4, p. 199-204, Apr 1997. ISSN 1058-0468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130067> >.

DZIK, A. et al. *Tratado de Reprodução Assistida*. D.H.M., P.: Editora: Segmento Farma Editores Ltda., São Paulo 2010.

EDIRISINGHE, W. et al. Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, p. 1056-1058, MAY 1997 1997. ISSN 0268-1161.

- EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, v. 2, n. 7419, p. 926-9, Nov 1965. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4165802> >.
- EGERSZEGI, I. et al. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod Fertil Dev*, v. 22, n. 5, p. 830-8, 2010. ISSN 1031-3613. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20450835](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20450835) >.
- EL SHOURBAGY, S. H. et al. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction*, v. 131, n. 2, p. 233-45, Feb 2006. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452717> >.
- EPSTEIN, C. J.; WEGIENKA, E. A.; SMITH, C. W. Biochemical development of preimplantation mouse embryos: in vivo activities of fructose 1,6-diphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. *Biochem Genet*, v. 3, n. 3, p. 271-81, Jun 1969. ISSN 0006-2928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5409407> >.
- ERICSSON, S. A. et al. ASSESSMENT OF PORCINE OOCYTES USING BRILLIANT CBESYL BLUE BOICE e M.L. *Theriogenology*. 39: 214 p. 1993.
- FASANO, G. et al. Cryopreservation of human failed maturation oocytes shows that vitrification gives superior outcomes to slow cooling. *Cryobiology*, Aug 2010. ISSN 1090-2392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20727873> >.
- GANDOLFI, F. Intra-ovarian regulation of oocyte developmental competence in cattle. *Zygote*, v. 4, n. 4, p. 323-6, Nov 1996. ISSN 0967-1994. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9153774](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153774) >.
- GHANEM, N. et al. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC Dev Biol*, v. 7, p. 90, 2007. ISSN 1471-213X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662127> >.
- GOOVAERTS, I. et al. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*, Aug 2010. ISSN 1879-3231. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20708251](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20708251) >.
- GOUDET, G. et al. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod*, v. 57, n. 2, p. 232-45, Aug 1997. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241036> >.
- GUIMARÃES, L. S.; HIRAKATA, V. N. Uso do modelo de equações de estimativas generalizadas na análise de dados longitudinais. . 32: 503-511 p. 2013.

HADI, H. et al. Selection of immature bovine oocytes using Brilliant Cresyl Blue enhances nuclear maturity after vitrification. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9: 2710-2713 p. 2010.

HELEIL, B. et al. Effect of Prolactin on developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue staining. *Journal of Reproduction and Infertility*. 1: 01-07 p. 2010.

HUANG, J. Y. et al. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by in vitro maturation and vitrification: A novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. *Am J Surg*, v. 200, n. 1, p. 177-83, Jul 2010. ISSN 1879-1883. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637351> >.

HWU, Y. M. et al. Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following in-vitro maturation and fertilization using a co-culture system. *Hum Reprod*, v. 13, n. 7, p. 1916-21, Jul 1998. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740449> >.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, p. 23-32, JAN 1 1997 1997. ISSN 0093-691X.

ISHIZAKI, C. et al. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology*, p. 72-80, JUL 1 2009 2009. ISSN 0093-691X.

JANOWSKI, D. et al. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*, v. 78, n. 3, p. 656-69.e1-5, Aug 2012. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578626> >.

JAROUDI, K. et al. Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes. *Human Reproduction*, p. 857-859, APR 1997 1997. ISSN 0268-1161.

JIANG, J. et al. Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence. *J Ovarian Res*, v. 3, p. 6, 2010. ISSN 1757-2215. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20205929](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20205929) >.

KARAMI-SHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the Brilliant Cresyl Blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. *Small Ruminant Research*. 105: 244-249 p. 2012.

KEMPISTY, B. et al. Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin  $\beta$ 2 (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, v. 75, n. 8, p. 1525-35, May 2011. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295838> >.

KIM, B. K. et al. In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril*, v. 74, n. 6, p. 1153-8, Dec 2000. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119743> >.

KOESTER, M. et al. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. *Reproduction*, v. 141, n. 6, p. 779-87, Jun 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415090> >.

LE DU, A. et al. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Human Reproduction*, p. 420-424, FEB 2005 2005. ISSN 0268-1161.

LIU, J. et al. Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertility and Sterility*, p. 566-568, MAR 1997 1997. ISSN 0015-0282.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C. J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Dev Biol*, v. 45, n. 2, p. 211-20, Aug 1975. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1242707> >.

MANJUNATHA, B. et al. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, p. 1299-1304, DEC 2007 2007. ISSN 0093-691X.

MIRSHAMSI, S. M. et al. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. *Anim Reprod Sci*, v. 136, n. 4, p. 245-51, Jan 2013. ISSN 1873-2232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228698> >.

MLODAWSKA, W.; PAWLOWSKA, A.; KOCHAN, J. Meiotic competence of mare oocytes selected using the Brilliant Cresyl Blue test. *Havemeyer Foundation Monograph Series*: 21 - 24 p. 2005.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al. G6PDH-activity in equine oocytes correlates with morphology, expression of candidate genes for viability, and preimplantative in vitro development. *Theriogenology*, v. 76, n. 7, p. 1215-26, Oct 2011. ISSN 1879-3231. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820165> >.

MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. et al.. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time. *J Assist Reprod Genet*, v. 29, n. 2, p. 153-8, Feb 2012. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21870182> >.

MOTA, G. et al. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Zygote*, v. 18, n. 3, p. 209-16, Aug 2010. ISSN 1469-8730. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19939331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19939331) >.

OPIELA, J. et al. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, v. 69, n. 5, p. 546-55, Mar 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18242680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18242680) >.

OPIELA, J. et al.. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim Reprod Sci*, v. 118, n. 2-4, p. 188-93, Apr 2010. ISSN 1873-2232. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19671488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19671488) >.

PAWLAK, P. et al. Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peri-pubertal gilts. *Theriogenology*, p. 832-840, MAR 15 2011 2011. ISSN 0093-691X.

PAWLAK, P. et al.. The quality of porcine oocytes is affected by sexual maturity of the donor gilt. *Reprod Biol*, v. 11, n. 1, p. 1-18, Mar 2011. ISSN 1642-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455277> >.

PEREIRA, G. R. et al. Selection of developmentally competent immature equine oocytes with brilliant cresyl blue stain prior to in vitro maturation with equine growth hormone. *Zygote*, p. 1-5, Feb 2013. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369728> >.

PUJOL, M.; LOPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, p. 735-744, FEB 2004 2004. ISSN 0093-691X.

REVEL, A. et al. At what age can human oocytes be obtained? *Fertil Steril*, v. 92, n. 2, p. 458-63, Aug 2009. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952208> >.

ROCA, J. et al. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev*, v. 10, n. 6, p. 479-85, 1998. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588378> >.

RODRIGUES, B. et al. Preliminary Study in Immature Canine Oocytes Stained with Brilliant Cresyl Blue and Obtained From Bitches with Low and High Progesterone Serum Profiles. *Reproduction in Domestic Animals*, p. 255-258, JUL 2009 2009. ISSN 0936-6768.

RODRIGUEZ VILLAMIL, P. et al. 75 addition of hyaluronan to a vitrification solution for immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. *Reprod Fertil Dev*, v. 25, n. 1, p. 185, Dec 2012. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23244909> >.

- RODRIGUEZ-GONZALEZ, E. et al. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*, p. 1397-1409, MAR 15 2002 2002. ISSN 0093-691X.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. et al. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod Nutr Dev*, v. 43, n. 2, p. 179-87, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 0926-5287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12956317> >.
- SATHANANTHAN, A.; SELVARAJ, K.; TROUNSON, A. Fine structure of human oogonia in the foetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, p. 3-8, MAR 30 2000 2000. ISSN 0303-7207.
- SILVA, D. S. et al. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, p. 1-6, Jul 2011. ISSN 1469-8730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791164> >.
- SOHEL, M. M. et al. 207 CIRCULATORY microRNA SIGNATURES IN FOLLICULAR FLUID IN RELATION TO THE GROWTH STATUS OF BOVINE OOCYTES. *Reprod Fertil Dev*, v. 25, n. 1, p. 251-2, Dec 2012. ISSN 1031-3613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245041> >.
- SONG, Y. et al. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. *Cryobiology*, p. S60-S65, JUL 2010 2010. ISSN 0011-2240.
- SPIKINGS, E. C.; ALDERSON, J.; ST JOHN, J. C. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod*, v. 76, n. 2, p. 327-35, Feb 2007. ISSN 1529-7268. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17035641> >.
- SPIRA, A.; MULTIGNER, L. Environmental factors and male infertility - The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. *Human Reproduction*, p. 2041-2042, AUG 1998 1998. ISSN 0268-1161.
- SU, J. et al. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e36181, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558373> >.
- SUGULLE, A.; DOCHI, O.; KAYAMA, H. Developmental competence of bovine oocytes selected by Brilliant Cresyl Blue staining: effect on the presence of *Corpus Luteum* on embryo development. *Journal of Mammalian Ovarian Research*. 25: 50-55 p. 2008.
- SUGULLE, A. et al. Selection of bovine oocytes by Brilliant Cresyl Blue before in vitro maturation improves blastocyst development. *Reproduction, Fertility and Development*. 19: 273 p. 2006.
- TABANDEH, M. R. et al. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Anim Reprod Sci*, v. 131, n. 1-2, p. 30-40, Mar 2012. ISSN 1873-2232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391295> >.



TANG-PEDERSEN, M. et al. Combination of IVF and IVM in naturally cycling women. *Reprod Biomed Online*, v. 24, n. 1, p. 47-53, Jan 2012. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116074> >.

TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev*, v. 61, n. 3, p. 414-24, Mar 2002. ISSN 1040-452X. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11835587](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11835587) >.

TIFFIN, G. J. et al. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil*, v. 93, n. 1, p. 125-32, Sep 1991. ISSN 0022-4251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1920281> >.

TORNER, H. et al. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction*, p. 197-212, FEB 2008 2008. ISSN 1470-1626.

TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, v. 121, n. 1, p. 51-75, Jan 2001. ISSN 1470-1626. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226029> >.

TSUJI, K.; SOWA, M.; NAKANO, R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod*, v. 32, n. 2, p. 413-7, Mar 1985. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3986271> >.

TSUTSUMI, O. et al. DETERMINATION OF ENZYME-ACTIVITIES OF ENERGY-METABOLISM IN THE MATURING RAT OOCYTE. *Molecular Reproduction and Development*, p. 333-337, NOV 1992 1992. ISSN 1040-452X.

TUCKER, M. et al. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 3, p. 578-579, SEP 1998 1998. ISSN 0015-0282.

URDANETA, A. et al. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test. *Zygote*, v. 11, n. 4, p. 347-54, Nov 2003. ISSN 0967-1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085735> >.

WANG, L. et al. Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 161372, 2012. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675245> >.

WILLIAMS, T. J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, v. 25, n. 5, p. 733-9, May 1986. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726164> >.

WONGSRIKEAO, P. et al. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology*, v. 66, n. 2, p. 366-72, Jul 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16414109](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16414109)>.

WU, Y. et al. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res*, v. 17, n. 8, p. 722-31, Aug 2007. ISSN 1748-7838. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17680026](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17680026)>.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. *Fertil Steril*, v. 92, n. 1, p. 396.e1-6, Jul 2009. ISSN 1556-5653. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19362300](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19362300)>.

[http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id\\_area=832](http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=832); acessado em 24.01.2013 às 18h32.

## 14. ANEXOS

**15.1** Resultados encontrados na literatura quando gametas foram selecionados com BCB. Resultados superiores do grupo BCB positivo em relação aos grupos Controle (BCB + > Controle) e BCB negativo (BCB + > BCB -); resultados similares entre os grupo BCB positivo e o grupo controle (BCB + = Controle).

Parâmetro avaliado	BCB + = Controle	BCB + > Controle	BCB + > BCB -
Taxa de MIV	Alm H, 2005 Wu, 2007 Manjunatha B, 2007 Ishizaki C, 2009 Egerszegi I, 2010 Catalá M, 2011 Alcoba D, 2011 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2012 Su, 2012 Pereira, 2013	Ericsson S, 1993 Rodríguez-González E, 2002 Rodríguez-González E, 2003 Wongsrikeao, 2006 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 Silva D, 2011	Ericsson S, 1993 Rodríguez-González E, 2002 e 2003 Urdaneta A, 2003 Alm H, 2005 Wongsrikeao, 2006 Wu, 2007 Manjunatha, 2007 Ishizaki C, 2009 Egerszegi I, 2010 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 e 2012 Silva D, 2011 Alcoba D, 2011 Su, 2012 Wang L, 2012
Diâmetro do gameta		El Shourbagy, 2006 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011	Roca J, 1998 Rodríguez-González E, 2002 Pujol M, 2004 El Shourbagy, 2006 Manjunatha B, 2007 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 Karami-Shabankareh, 2012
Taxa de penetração de espermatozoide		Ericsson S, 1993 Roca J, 1998	Ericsson S, 1993 Roca J, 1998
Taxa de FIV	Wongsrikeao, 2006 Manjunatha B, 2007 Ishizaki C, 2009 Egerszegi I, 2010 Su, 2012 Catalá M, 2012	Ericsson S, 1993 Rodríguez-González E, 2003 Pujol M, 2004 El Shourbagy, 2006 Catalá M, 2011	Ericsson S, 1993 Rodríguez-González E, 2003 Urdaneta A, 2003 Pujol M, 2004 Wongsrikeao, 2006 El Shourbagy, 2006 Spikings E, 2006 Manjunatha B, 2007 Catalá M, 2011 Su, 2012

**15.2** – Resultados relacionados à avaliação dos embriões oriundos de gametas selecionados com BCB. Resultados superiores do grupo BCB positivo em relação aos grupos Controle (BCB + > Controle) e BCB negativo (BCB + > BCB -); resultados similares entre os grupo BCB positivo e o grupo controle (BCB + = Controle).

Parâmetro avaliado	BCB + = Controle	BCB + > Controle	BCB + > BCB -
Clivagem embrionária	Alm H, 2005 Manjunatha B, 2007 Bhojwani S, 2007 Sugulle A, 2008 Torner, 2008 Mota G, 2009 Ishizaki C, 2009 Opiela J, 2010 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 e 2012 Silva D, 2011 Su J, 2012	Wongsrikeao, 2006 Sugulle A, 2006 Opiela J, 2008 Mirshamsi S, 2013	Sugulle A, 2006 Wongsrikeao, 2006 Manjunatha B, 2007 Bhojwani S, 2007 Sugulle A, 2008 Opiela J, 2008 e 2010 Mota G, 2009 Heleil B, 2010 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 e 2012 Catalá M, 2012 Janowski D, 2012 Wang L, 2012 Su J, 2012 Mirshamsi S, 2013
			Pujol M, 2004 Alm H, 2005 Sugulle A, 2006 Wongsrikeao, 2006 Manjunatha B, 2007 Bhojwani S, 2007 Opiela J, 2008 e 2010 Torner H, 2008 Sugulle A, 2008 Mota G, 2009 Heleil B, 2010 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011 e 2012 Silva D, 2011 Su J, 2012 Janowski D, 2012 Karami-Shabankareh, 2012 Wang L, 2012 Mirshamsi S, 2013
Formação de blastocisto	Sugulle A, 2006 Wongsrikeao, 2006 Opiela J, 2008 Mota G, 2009 Ishizaki C, 2009 Opiela J, 2010 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2011	Pujol M, 2004 Alm H, 2005 Manjunatha B, 2007 Bhojwani S, 2007 Mohammadi-Sangcheshmeh A, 2012 Silva D, 2011 Su, 2012 Sugulle A, 2008 Karami-Shabankareh, 2012 Silva D, 2011 Mirshamsi S, 2013	

**15.3** - Resultados relacionados aos blastocistos e aos nascidos vivos oriundos de gametas que foram selecionados através da aplicação do BCB. Resultados superiores do grupo BCB positivo em relação aos grupos Controle (BCB + > Controle) e BCB negativo (BCB + > BCB -); resultados similares entre os grupo BCB positivo e o grupo controle (BCB + = Controle).

Parâmetro avaliado	BCB + = Controle	BCB + > Controle	BCB + > BCB -
Número de células no blastocisto	Alm H, 2005	Bhojwani S, 2007 Su J, 2012	Alm H, 2005 Bhojwani S, 2007 Torner H, 2008 Heleil B, 2010 Catalá M, 2011 Su J, 2012
Taxa de nascidos vivos		Su, 2012	Su, 2012

#### 15.4 – Variação do protocolo de aplicação do corante BCB.

Estudo	Modelo animal	Diluyente	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Tempo de exposição (minutos)
<b>Ericsson SA, 1993</b>	Suíno	PBS	13	90
<b>Roca J, 1998</b>	Suíno	DPBSm	13	90
<b>Rodríguez-González E, 2002</b>	Caprino	DPBSm	13, 26, 39 ou 52 <sup>A</sup>	90
<b>Rodríguez-González E, 2003</b>	Caprino	DPBSm	26	90
<b>Urdaneta A, 2003</b>	Caprino	PBSm	26	90
<b>Pujol M, 2004</b>	Bovino	PBSm	26	90
<b>Alm H, 2005</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Mlodawska, 2005</b>	Equino	PBSm	26	90
<b>Coy P, 2005</b>	Suíno	PBS	13	90
<b>Wongsrikeao P, 2006</b>	Suíno	PBSm	26	90
<b>El Shourbagy, 2006</b>	Suíno	DPBSm	13	90
<b>Spikings E, 2007</b>	Suíno	DPBSm	13	90
<b>Manjunatha B, 2007</b>	Bubalino	DPBSm	13, 26 ou 39 <sup>A</sup>	90
<b>Bhojwani S, 2007</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Ghanem N, 2007</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Torner H, 2008</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Opiela J, 2008</b>	Bovino	DPBS	26	60

<b>Sugulle A, 2008</b>	Bovino	DPBS	26	90
<b>Ishizaki C, 2009</b>	Suíno	DPBS	13	90
<b>Mota G, 2009</b>	Bovino	DPBSm	26	60
<b>Egerszegi I, 2010</b>	Suíno	DPBSm	13	90
<b>Heleil B, 2010</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Opiela J, 2010</b>	Bovino	DPBS	26	60
<b>Hadi H, 2010</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Mohammadi-S A, 2011</b>	Equino	PBSm	26	90
<b>Mohammadi-S A, 2011</b>	Ovino	PBSm	26	90
<b>Kempisty B, 2011</b>	Suíno	DPBSm	13	90
<b>Silva D, 2011</b>	Bovino	PBSm	26	90
<b>Alcoba D, 2011</b>	Roedor	M16	13, 20 e 26	30, 60 e 90 <sup>B</sup>
<b>Catalá M, 2011</b>	Ovino	PBSm	13, 26, 39 e 52 <sup>C</sup>	60
<b>Pawlak P, 2011 (A)</b>	Suíno	PBSm	13	90
<b>Pawlak P, 2011 (B)</b>	Suíno	PBSm	13	90
<b>Koester M, 2011</b>	Bovino	DPBSm	26	30
<b>Wang L, 2012</b>	Ovino	DPBSm	26 e 52 <sup>A</sup>	90
<b>Su J, 2012</b>	Bovino	PBSm	26	90
<b>Janowski D, 2012</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Tabandeh M, 2012</b>	Bovino	PBSm	26	90
<b>Catalá M, 2012</b>	Ovino	PBSm	26	60
<b>Alvarez G, 2012<sup>D</sup></b>	Suíno	Meio de MIV	4,8	180 (3h)

<b>Karami-Shabankareh, 2012</b>	Ovino	DPBSm	13, 26 e39	90
<b>Castaneda C, 2013</b>	Bovino	ECU (meio)	26	90
<b>Mirshamsi S, 2013</b>	Bovino	DPBSm	26	90
<b>Pereira G, 2013</b>	Equino	DPBS	26	90

<sup>A</sup> concentração de 26  $\mu$ M apresentou melhores resultados;

<sup>B</sup> exposição por 60 minutos apresentou melhores resultados

<sup>C</sup> exposição de 13  $\mu$ M apresentou melhores resultados

<sup>D</sup> exposição dos gametas ao BCB após período de MIV



## 15.5 – Termo de Consentimento Livre e esclarecido para pacientes submetidas à ooforectomia.

**Projeto:** Utilização do corante Azul Cresil Brilhante (BCB) como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação *in vitro*

**Pesquisador responsável:** Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – UFRGS – Fone: (51) 33083559

**Demais pesquisadores:** Helena von Eye Corleta e Diego Duarte Alcoba

**Telefones para contato com pesquisadores:** (51) 33597640 (Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA); (51) 96653981 (Diego Alcoba); (51) 33597625 (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular); (51) 33083559 (Laboratório de Biologia Molecular Ebdócrina e Tumoral).

Prezada paciente,

Antes de concordar em participar deste estudo de pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação que se segue sobre os procedimentos propostos. Se depois de ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido existir alguma coisa que você não compreenda sobre o estudo ou sobre os procedimentos, por favor, pergunte ao responsável que está aplicando este termo.

Você está sendo convidada para participar do estudo que estamos realizando sobre maturação *in vitro* de oócitos (amadurecimento do óvulo fora do corpo). O objetivo do nosso estudo é desenvolver uma técnica de seleção dos óvulos mais adequados para realizar a maturação *in vitro* de oócitos, pois não se conhece atualmente nenhuma técnica muito eficiente para selecionar os óvulos que são adequados para este amadurecimento.

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a Sra. realizar a remoção do seu ovário (ooforectomia), porção do órgão será enviado para exame histopatológico. No entanto, boa parte da amostra acaba não sendo utilizada. Por isso estamos solicitando permissão para utilizar parte do material que será desprezado após a avaliação para a utilização em nossa pesquisa.

A sua participação no estudo é isenta de despesas (não trará custos a você) e a senhora não receberá nenhum pagamento (não será remunerada) pela sua participação.

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

1/3

Os resultados deste estudo não trarão benefícios nem prejuízos diretos, para a senhora; assim como não há aumento do risco de sua cirurgia devido a sua participação no estudo (os riscos da cirurgia são independentes deste estudo), pois não será realizada nenhuma técnica a mais durante o período da cirurgia (não haverá nenhuma intervenção adicional). Se houver algum dano diretamente decorrente de sua participação no estudo, você terá direito à indenização conforme previsto em lei.

Você é livre para decidir para participar ou não do estudo, assim como, retirar-se dele em qualquer momento sem prejuízo ou alteração na rotina de seu tratamento ou relacionamento com seu médico.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, após a maturação do gameta este será descartado de forma correta. Tanto o material biológico coletado como os dados obtidos na pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade descrita anteriormente – melhorar a técnica de maturação *in vitro*.

Caso a Sra. fique com alguma dúvida em relação ao projeto poderá entrar em contato com os pesquisadores ou com o Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através dos telefones informados no topo da página 1, para esclarecer suas dúvidas.

Eu, \_\_\_\_\_, li e entendi o propósito do estudo, bem como os potenciais benefícios e riscos da participação no estudo e concordo em participar. Afirmando que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão e tive a oportunidade de fazer perguntas e minhas perguntas foram respondidas. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento e que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Dou por meio deste documento meu consentimento informado para ser uma participante desse estudo.

**Paciente:**

\_\_\_\_\_

Nome (em letra de forma)

\_\_\_\_\_

Assinatura

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

2/3

**Pesquisador:**

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente todos os detalhes relevantes deste estudo ao sujeito mencionado acima.

\_\_\_\_\_

Nome (em letra de forma)

\_\_\_\_\_

Assinatura

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

3/3

## 15.6 – Termo de Consentimento Livre e esclarecido para pacientes submetidas à cesárea.

**Projeto:** Utilização do corante Azul Cresil Brilhante (BCB) como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação *in vitro*

**Pesquisador responsável:** Ilma Simoni Brum da Silva (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – UFRGS – Fone: (51) 33083559

**Demais pesquisadores:** Helena von Eye Corleta e Diego Duarte Alcoba

**Telefones para contato com pesquisadores:** (51) 33597640 (Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA); (51) 96653981 (Diego Alcoba); (51) 33597625 (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular); (51) 33083559 (Laboratório de Biologia Molecular Ebdócrina e Tumoral).

Prezada paciente,

Antes de concordar em participar deste estudo de pesquisa é importante que você leia e entenda a explicação que se segue sobre os procedimentos propostos. Se depois de ler este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido existir alguma coisa que você não compreenda sobre o estudo ou sobre os procedimentos, por favor, pergunte ao responsável que está aplicando este termo.

Você está sendo convidada para participar do estudo que estamos realizando sobre maturação *in vitro* de oócitos (amadurecimento do óvulo fora do corpo). O objetivo do nosso estudo é desenvolver uma técnica de seleção dos óvulos mais adequados para realizar a maturação *in vitro* de oócitos, pois não se conhece atualmente nenhuma técnica muito eficiente para selecionar os óvulos que são adequados para este amadurecimento.

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a senhora realizar o procedimento de cesárea, haverá a abertura do seu abdômen e seu ovário ficará acessível para realizarmos uma punção nele (com auxílio de pequena agulha, aspiraremos os óvulos que estão na região mais externa do ovário), este procedimento será realizado pelo médico responsável pela cirurgia. A punção ovariana não altera significativamente o tempo cirúrgico nem o andamento do seu procedimento, assim como não vai alterar de forma significativa a quantidade de óvulos que a senhora tem em seu ovário. Como a punção será feita após o nascimento do seu bebê e o fechamento do útero, a sua participação no estudo não irá trazer interferências no parto ou sobre o recém-nascido.

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

1/3

Cabe salientar que esta técnica é realizada rotineiramente nas clínicas de Reprodução Assistida e não está relacionada com nenhuma complicação importante (não há risco potencial). Da mesma forma, esta técnica vem sendo empregada em estudos envolvendo pacientes que não estão fazendo tratamento para infertilidade, como a senhora, e não foram relatadas complicações decorrentes desta punção. Não há relatos de prejuízo na reserva ovariana após esta punção (não vai alterar de forma significativa a quantidade de óvulos que a senhora tem em seu ovário) assim como não há interferências na lactação (período de amamentação) ou no puerpério (fase pós-parto).

O risco relacionado com sua participação no estudo é a possibilidade de ocorrer pequenos sangramentos na superfície do seu ovário quando for realizada a punção ovariana, necessitando compressão do local ou cauterização (ambos tratam esta situação de forma eficaz); se a senhora aceitar participar do nosso estudo e durante o procedimento de punção ovariana ocorrer sangramento, a punção será imediatamente interrompida e será realizada a compressão do local ou a cauterização pela equipe médica que estará acompanhando a senhora.

A sua participação no estudo é isenta de despesas (não trará custos a você) e a senhora não receberá nenhum pagamento (não será remunerada) pela sua participação.

Sua saúde é nossa preocupação principal! Na improvável circunstância de você sofrer um dano à saúde como resultado de sua participação no estudo, seu médico lhe dará atendimento médico usual, costumeiro ou hospitalar, assim como o pesquisador e a Instituição assumem a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos recorrentes da sua participação no estudo. Caso isso ocorra, você não será financeiramente responsável pelas despesas médicas para o tratamento de danos que ocorram como resultado da sua participação no estudo. Se houver algum dano diretamente decorrente de sua participação no estudo, você terá direito à indenização conforme previsto em lei.

Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos, para a senhora. No entanto, a informação obtida no decorrer dessa pesquisa poderá contribuir para melhor entendimento e aperfeiçoamento da técnica de maturação *in vitro* de óvulos.

Você é livre para decidir para participar ou não do estudo, assim como, retirar-se dele em qualquer momento sem prejuízo ou alteração na rotina de seu tratamento ou relacionamento com seu médico.

Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Da mesma forma, a amostra de seu material não será utilizada para nenhuma outra finalidade, após a maturação do gameta este será descartado de forma correta.

Rubrica (Paciente / Pesquisador): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

2/3

