

Avaliação da Aplicabilidade da Técnica de Maturação *in vitro* de Oócitos Humanos e Posterior Fertilização

Evaluation of the Usefulness of the *in vitro* Maturation Technique of Human Oocyte and Subsequent Fertilization

Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral¹,
Maria das Graças Rocha Santana Camargos¹,
Marco Aurélio Fernandes Vieira¹, Rubens Lene Carvalho Tavares¹,
Claudia Navarro Carvalho Duarte Lemos¹, Aroldo Fernando Camargos²

RESUMO

Objetivos: avaliar a aplicabilidade da técnica de maturação *in vitro* de oócitos humanos e posterior fertilização.

Métodos: estudo prospectivo não randomizado descritivo realizado no período de novembro de 1999 a março de 2001 no qual foram incluídas 15 pacientes com infertilidade tubária e 20 ciclos de fertilização *in vitro*. Todas assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciar o estudo. As pacientes tinham idade entre 18 e 32 anos incompletos, obstrução tubária como causa exclusiva de infertilidade e índice de massa corporal inferior a 25 kg/m². As pacientes receberam 300 UI de hormônio folículo estimulante (FSH) recombinante por via intramuscular no segundo dia do ciclo e doses adicionais de 150 UI no quarto e no sexto dia do ciclo. A coleta ovular foi realizada no sétimo dia do ciclo. Os oócitos foram colocados em meio TCM 199 acrescido de antibióticos, piruvato, FSH, gonadotrofina coriônica humana e soro (Serum Substitute Supplement - Irvine Scientific®). Após 48 h de cultivo, os oócitos que atingiram o estágio de metáfase II foram inseminados e os fertilizados foram transferidos. **Resultados:** foram puncionados 144 folículos com a coleta de 67 oócitos imaturos (46,5%). Quarenta e três oócitos atingiram o estágio de metáfase II (64,2%) e foram inseminados. Destes, 30 fertilizaram e 25 embriões foram transferidos para 10 pacientes. Houve uma gravidez com nascimento de um bebê.

Conclusão: concluiu-se que a técnica de maturar oócitos humanos *in vitro* previamente à fertilização *in vitro* é técnica exequível, capaz de gerar gravidez.

PALAVRAS-CHAVE: Fertilização *in vitro*. Infertilidade.

Introdução

Em 1939, Pincus e Saunders¹, pesquisando oócitos humanos obtidos por aspiração folicular de folículos excisados, observaram o início do proces-

so de maturação em 40% dos oócitos cultivados. Veeck et al.², em 1983, relataram a primeira gravidez e nascimento de bebê gerado por meio da maturação *in vitro* de oócitos humanos. Em seguida, vários outros autores relataram gestações e nascimentos após maturação *in vitro*³⁻⁵, inclusive gravidez trigemelar⁶.

Após 1992 a maioria dos trabalhos com maturação *in vitro* passou a utilizar a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), acreditando-se em melhores resultados com a ICSI ou para diminuir viés na presença de fator masculino⁴. A coleta de oócitos imaturos *in vivo* guiada por ultra-sonografia ou por via laparoscópica ini-

¹Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG

²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG

Correspondência:

Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral
Avenida Pasteur, 89/1202 - Bairro Santa Efigênia
30150-290 - Belo Horizonte - MG
e-mail: gmsamaral@yahoo.com.br

ciou-se em 1994³ e, até 1998, pouco mais de 10 bebês haviam nascido em todo o mundo, frutos de oócitos maturados *in vitro* e posteriormente fertilizados, o que revela baixíssimas taxas de sucesso⁷.

A literatura é controversa sobre a necessidade de estimulação prévia com FSH para otimizar os esquemas de maturação *in vitro*⁸. Há relato de gestações bem sucedidas após ciclos sem utilização prévia de gonadotrofina⁹, enquanto outros artigos demonstram melhores taxas de maturação nuclear¹⁰ ou de maturação citoplasmática¹¹ em oócitos extraídos de ovários estimulados.

Um sistema de cultivo ideal para a maturação *in vitro*⁸ deveria prover os substratos necessários para a maturação oocitária nos momentos exatos, como ocorre no folículo pré-ovulatório *in vivo*⁷. Hoje existem vários meios de cultivo de oócito, sendo difícil comparação de eficácia entre os mesmos. Há pesquisas com substâncias adicionadas ao meio de cultivo, como componentes protéicos, substratos energéticos e nutrientes^{12,13}; adição de hormônios^{12,14}; fatores de crescimento ou substâncias afins e modelos de cultivo⁶; adição de fluido folicular ao meio de cultivo^{6,15}.

Com o objetivo de diminuir efeitos inibitórios em funções das células da granulosa surgiram sistemas sem a adição de soros (meios *serum free*). Meios *serum free* foram associados a uma combinação de insulina e análogo sintético LongR3 IGF para humanos em concentrações baseadas nos níveis de insulina e fator de crescimento insulina-símile - I (IGF-I) medidos em folículos antrais humanos¹¹.

A literatura revela que maior concentração sérica de estradiol e inibina A no terceiro dia do ciclo e no dia da coleta ovular correlaciona-se com melhores taxas de gravidez em pacientes não estimuladas submetidas à maturação *in vitro* de oócitos¹⁶. O nível de FSH encontrado no terceiro dia do ciclo tem correlação negativa com o número de oócitos captados¹⁷, e menor concentração de estradiol no terceiro dia do ciclo está relacionada a taxas de gravidez significativamente superiores, quando comparadas às pacientes com níveis altos^{17,18}.

A literatura revela também maior taxa de recuperação e de maturação de oócitos em pacientes jovens e maior taxa de apoptose em pacientes com mais de 41 anos¹⁹. Pacientes com síndrome do ovário policístico apresentam decréscimo nas taxas de maturação quando comparadas a oócitos de ovários normais. A porcentagem de oócitos de gerados na síndrome do ovário policístico é superior à das mulheres normais^{6,7}. Há menor habilidade para o desenvolvimento e maturação²⁰ e menor taxa de fecundação por ciclo e maior taxa de abortos²¹.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a aplicabilidade da técnica de maturação *in vitro* de oócitos humanos e posterior fertilização.

Pacientes e Métodos

Trata-se de estudo prospectivo, não randomizado, descritivo, em que foram avaliados 20 ciclos em 15 pacientes oriundas do Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e do PAM Sagrada Família em Belo Horizonte. Os ciclos foram realizados de novembro de 1999 a março de 2001. O protocolo do estudo foi aprovado pelo colegiado do curso de pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia.

Os critérios de inclusão foram idade entre 18 e 32 anos incompletos; obstrução tubária como causa exclusiva de infertilidade; indicação para maturação *in vitro* (FIV); impossibilidade de execução de ciclos de FIV convencionais; ciclos menstruais regulares; assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de exclusão foram presença de outra causa de infertilidade que não a obstrução tubária; índice de massa corporal superior a 25 kg/m²; análise seminal do parceiro alterada; níveis séricos de FSH no terceiro dia do ciclo superiores a 15 UI/ml; presença de doença intracavitária (intra-uterina) diagnosticada por histeroscopia diagnóstica ou de doença que contra-indicasse a gestação ou levasse a uma gestação de risco.

A média de idade foi de 27,5 anos ($\pm 2,7$). A média do índice de massa corporal foi de 23,2 kg/m² ($\pm 1,5$). A duração média da infertilidade foi de 5,4 anos ($\pm 3,0$).

As pacientes fizeram uso de 300 UI de FSH recombinante (Gonal-F® Serono) intramuscular, no segundo dia do ciclo (sendo o primeiro dia do ciclo definido como o primeiro dia de sangramento) e doses adicionais de 150 UI no quarto e no sexto dia do ciclo. Realizaram-se duas ultra-sonografias transvaginais com sonda de 5 MHz (Aloka SSD-500), a primeira no segundo dia do ciclo, para que se excluísse a presença de algum cisto ovariano, e a segunda no sexto dia do ciclo, para acompanhamento do desenvolvimento folicular e endometrial. A coleta ovular foi realizada invariavelmente no sétimo dia do ciclo.

Para a coleta ovular foi feita anestesia paracervical com xilocaína a 2% com adrenalina. Utilizamos agulhas de calibre 16, lúmen duplo (Cook), guiadas por ultra-sonografia endovaginal (Aloka SSD-500). Essas agulhas foram lavadas previamente com meio de cultivo heparinizado

para diminuição do espaço morto e aquecimento das mesmas (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* - 9,6 g/L - Sigma), acrescido de 0,003 g de heparina (50000 UI - Sigma - H 3149), 0,075 g de penicilina G (10.000.000 UI - Sigma - P 4687) e 1 mL de gentamicina (10 mg/mL - Sigma - G 1272) a 37°C, pH entre 7,3±0,3 e osmolaridade entre 288 ± 5 mOsm/L. Utilizou-se bomba de sucção com pressão negativa (*Craft Suction Unit - Rocket Medical*), com pressão de aspiração fixa de 80 mmHg. Após a aspiração do líquido folicular, o folículo foi lavado com 0,1 mL do mesmo meio e novamente aspirado.

O líquido folicular foi transferido para placas de Petri (100 mm x 20 mm, *Corning*) para identificação dos complexos cumulus-oócito em lupa (Nikon SMZ-2T) e em microscópio óptico invertido (Zeiss - Telaval 31). Os oócitos foram classificados como imaturos segundo os seguintes critérios de Veeck et al. (1983)². Resumidamente, estes autores classificam as células da granulosa como compactas ou firmemente aderidas; as células do cumulus como ausentes ou presentes ou densas; a corona como compacta ou ausente, e o ooplasma como escurecido ou com presença de vesícula germinal.

Os oócitos imaturos foram transferidos para as placas de Nunc (*Multidish 4 wells - Nunc Brand Products*), um a dois por poço, com 6 mL de meio de maturação específico divididos em 1 mL para cada poço e 2 mL no meio da placa. As placas foram preparadas sempre com um dia de antecedência, acrescentando-se soro (*Serum Substitute Supplement - Irvine Scientific*[®]) ao meio de maturação em concentração final na placa de 4% (0,4 mL de soro + 9,6 mL do meio). As placas foram então transferidas para estufas de CO₂ (*Forma Scientific CO2 Water Jacket Incubator*) à temperatura de 37°C e fluxo de CO₂ a 5% para equilibrar a temperatura e o pH.

O meio de maturação foi constituído de 100 mL de TCM 199 (*Tissue Culture Medium 199 - Sigma - M 4530*), acrescido de 0,1 mL de piruvato de sódio (11 mg/mL - Sigma - S 8636), 0,006 g penicilina G (Sigma), 0,1 mL de gentamicina (Sigma), 0,075 UI/mL de FSH recombinante (*GonaIF*[®] - Serono) e 0,5 UI/mL de hCG (*Profasi*[®] - Serono). O pH do meio oscilava entre 7,3±0,3 (medido por medidor de pH Digimed, modelo DMPH-2) e a osmolaridade oscilava entre 288±5m Osm/L (medido por *Osmeet - Micro Osmometer*).

Os oócitos imaturos permaneceram incubados no meio, nas placas de Nunc, por período de 48 horas, após o que foram graduados como: prófase I (ausência de maturação), metáfase I (MI), metáfase II (MII) ou degenerados. Os oócitos em MII foram então transferidos para placas de Nunc

com 6 mL de meio apenas para cultivo (IVF[™]20 Vitrolife) distribuídos da mesma forma que o meio de maturação: 1 mL por poço e 2 mL no centro da placa. Essas placas também foram preparadas com um dia de antecedência para estabilização prévia (da temperatura e pH) em estufas de CO₂ (*Forma Scientific - Water Jacket Incubator*) com fluxo de CO₂ a 5% e 37°C. Os oócitos (em MII) foram então submetidos à inseminação. Realizou-se beneficiamento do sêmen com a técnica de *swim-up*, na qual, resumidamente, o sêmen é depositado em tubo de 15 mL (*Falcon-Corning*) estéril junto com o dobro do volume de Dulbecco's PBS e homogeneiza-se. Centrifuga-se a 300 g por 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e torna-se a suspender o *pellet* com mais 2 mL de PBS. Centrifuga-se por mais cinco minutos a 300 g. Despreza-se novamente o sobrenadante e torna-se a suspender o *pellet* com 1 mL de IVF[™]20 Vitrolife. Centrifuga-se por mais três minutos e coloca-se em tubo de ensaio estéril em estufa de CO₂ (37°C), com uma angulação de cerca de 45°, em repouso, para que os espermatozoides migrem por cerca de 40 a 45 minutos. Retira-se o sobrenadante e despreza-se o *pellet*. A inseminação é realizada com o sobrenadante diluído.

O sêmen foi avaliado de acordo com diretrizes padronizadas pelo Manual de Laboratório da Organização Mundial de Saúde de 1994²². Resumidamente, um espermograma normal apresenta volume de 2,0 mL ou mais, pH entre 7,2 a 8,0, concentração espermática ≥20 x 10⁶/mL, motilidade ≥50% com progressão tipo 2 e 3 ou >25% com progressão tipo 3 nos primeiros 60 minutos, morfologia com ≥30% de formas normais, vitalidade com ≥75% de espermatozoides vivos e contagem de leucócitos <1.000.000/mL.

Cerca de 18 horas após a inseminação, pesquisou-se por microscopia óptica a presença dos pró-núcleos, indicando fertilização. No segundo dia após a inseminação, observou-se o desenvolvimento embrionário. Esses, se clivados, eram classificados e então transferidos para o interior da cavidade uterina. A classificação dos embriões foi realizada de acordo com os critérios de Van Steirteghem et al.²³, quanto ao nível de fragmentação: tipo A (sem fragmentos), tipo B (1 a 20% de fragmentos), tipo C (20 a 50% de fragmentação) e tipo D (>50% de fragmentação).

A transferência de embrião foi realizada com cateter *tom cat* (Cook) estéril, sendo introduzido até uma distância 1 cm menor que a medida da cavidade uterina, medida previamente por ultrasonografia endovaginal. Os embriões foram transferidos juntamente com 25 µl de meio de cultivo da placa IVF-[™]20 (Vitrolife).

Desde o dia da coleta ovular, as pacientes iniciaram a preparação do endométrio com 17β

estradiol (Estrufen®-Medley), 2 mg de oito em oito horas por via oral. Após 48 horas da coleta, foi acrescentada ao estradiol a progesterona micronizada (Utrogestan® - Enila), 200 mg, também de oito em oito horas, em forma de comprimidos administrados por via vaginal. Essa medicação foi mantida até 12 dias após a transferência embrionária, quando a paciente realizava o exame de gravidez (β hCG). Em caso de gravidez a progesterona foi mantida até a 12ª semana de gestação. Foi definida como gravidez clínica a presença de atividade cardíaca embrionária intra-uterina após cinco semanas de transferência embrionária por meio de ultra-sonografia endovaginal.

Foi realizada análise descritiva das variáveis utilizando-se o programa Epi-Info versão 6.04. Admitiu-se como diferença estatisticamente significativa quando presente um valor $p < 0,05$.

Resultados

Foram realizados 20 ciclos com 19 coletas ovulares (Tabela 1). Um ciclo foi cancelado devido à inacessibilidade do ovário. Foram puncionados 144 folículos com média de 7,6 folículos por paciente (variando de três a 27). Foram coletados 67 oócitos (taxa de captação de 46,5% por folículo puncionado), com média de 3,5 oócitos por coleta (variando de zero a oito).

Tabela 1 - Captação, maturação, fertilização, desenvolvimento embrionário e taxas de gravidez obtidas de oócitos humanos maturados *in vitro*.

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

¹IC - Intervalo de confiança

²MI - Oócito em metáfase I

³MII - Oócito em metáfase II

Após 48 horas de cultivo, nove oócitos degeneraram (13,4%), 12 permaneceram em prófase I (17,9%), três atingiram o estágio de MI (4,5%) e 43 atingiram o estágio de MII (64,2%). Dos 43 oócitos inseminados, 30 foram fertilizados (69,8%). Hou-

ve clivagem em 25 embriões (83,3%) e foram transferidos ao longo de 10 ciclos. Houve uma gravidez com nascimento de bebê saudável (5,3% de gravidez por coleta ovular e 10% por transferência). A taxa de implantação foi de 4% (1/25) (Tabela 1).

Dos 25 embriões transferidos, quatro (16%) foram do tipo A, nove (36%) tipo B e 12 (48%) do tipo C, segundo os critérios de Van Steirteghem et al.²³ descritos anteriormente.

Foi realizada uma simples comparação entre as diferentes épocas de realização do estudo, as quais foram setembro de 1999, março e abril de 2000 e março de 2001. Compararam-se as taxas de maturação e fertilização pelo teste do χ^2 . Encontrou-se valor $p=0,0155$ para os resultados de maturação e valor $p=0,7528$ para a fertilização para as diferentes épocas (Tabela 2).

Discussão

As 15 pacientes formaram grupo homogêneo quanto à idade, condições socioeconômicas, índice de massa corporal e causa de infertilidade. O valor médio de 3,5 oócitos por coleta foi inferior ao de alguns autores que utilizaram técnica similar (7,5 por Wynn et al.⁸ e 5,6 por Chian et al.⁵), mas superior ao de Thornton et al.⁹ (0,7) e muito similares aos de Mikkelsen et al.¹⁶, com e sem estímulo mínimo com FSH prévio (4,0 com FSH e 3,7 sem FSH).

A necessidade do uso de FSH em pequenas doses para se obterem melhores resultados com maturação *in vitro* de oócitos é controversa. Existem artigos com resultados superiores quando se usa a estimulação ovariana prévia com FSH⁸, mas há trabalhos sem uso do estímulo ovariano demonstrando taxas similares às encontradas com o estímulo ovariano mínimo^{16,24}.

A taxa de maturação de 64,2% (43 dos 67 oócitos coletados) foi superior ou similar às encontradas por Cha et al.⁶ (55,8 e 35,9%, respectivamente com adição de fluido folicular e soro de cordão) e por Trounson et al.³ (54,8%). Contudo, estudo mais recente mostrou taxa de maturação superior (85%)¹⁶. Essa superioridade talvez se deva à casuística mais expressiva e, provavelmente, maior familiaridade com a técnica.

O presente trabalho foi realizado com FIV e a taxa de fertilização encontrada (69,8%) foi similar aos dados relatados por Cha et al.⁶ (81 e 31,5%, respectivamente, dos oócitos maturados com a adição de fluido folicular e soro de cordão aos meios de maturação), Trounson et al.³ (22,9% no primeiro experimento e 40,75% no segundo experimento) e Smith et al.²⁴ (média de 75%).

Tabela 2 - Caracterização dos ciclos por época em que foram realizados.

Épocas	Folículos ¹	Captação oocitária ²	Maturação	Fertilização	Embriões T ³
11/1999	10,5	Média de 3,75 (34,8%)	33,3%	60%	3
03 e 04/2000	8,8	Média de 3,8 (48,9%)	76,9%	75%	12
03/2001	5,8	Média de 5,8 (54,4%)	69,2%	66,7%	10

¹Folículos por paciente²Captação oocitária por paciente³Embriões transferidos

A taxa de gravidez por transferência de embrião (10%) foi similar à relatada por Trounson et al.³ (7,6%), mas foi inferior à descrita por Thornton et al.⁹ (28%), Mikkelsen et al.¹⁶ (17,4%), Cha et al.²¹ (27,1%) e Mikkelsen et al.¹⁷ (18%).

Apesar de não ser objetivo deste trabalho, notou-se uma tendência de melhores resultados à medida que a familiaridade com a técnica cresce: houve diferentes taxas de maturação entre as três épocas de realização do trabalho ($p=0,0155$). No que diz respeito às taxas de fertilização, os resultados não diferiram entre as épocas ($p=0,7528$).

Não há consenso sobre quais seriam os melhores meios de cultivo e substâncias a ele adicionadas. A situação atual da maturação *in vitro* ainda mostra taxas de gravidez aquém das obtidas pelas técnicas convencionais FIV ou ICSI. Não foi encontrada na literatura apresentada a descrição sobre a qualidade dos embriões transferidos e, por isso, não se pôde comparar os embriões deste com os de outros trabalhos. Até a presente data, o bebê nascido em 4 de janeiro de 2001, por meio de tal técnica, se encontra saudável e apresentando desenvolvimento normal para a idade.

Pode-se concluir a partir do presente estudo que a técnica de maturar oócitos humanos *in vitro* previamente à FIV é técnica totalmente exequível, capaz de gerar gravidez. A obtenção de melhores resultados em todos os passos da maturação *in vitro* de oócitos seguida de FIV, ao longo do tempo de realização da pesquisa, traduz a aquisição de melhor domínio da técnica em todos os seus passos. Devido ao tamanho amostral limitado, não se pode inferir qualquer coisa além da aplicabilidade do método com o objetivo proposto neste estudo.

ABSTRACT

Purpose: to evaluate the usefulness of the *in vitro* maturation technique of human oocyte and subsequent fertilization.

Methods: this is a prospective nonrandomized, descriptive study, carried out during the period of November 1999 to March 2001, with 20 cycles of *in vitro* fertilization of 15 patients with tubal infertility. All signed the written informed

consent before the beginning of the study. The selected patients were at least 18 and at most 32 years of age, with only tubal infertility, and body mass index less than 25 kg/m². The patients received 300 UI of recombinant follicle stimulating hormone (FSH) by intramuscular injection at the second day of the cycle and additional doses of 150 IU at the fourth and sixth days of cycle. The oocyte retrieval was performed at the seventh day of the cycle. Those oocytes classified as immature were cultured in tissue culture medium 199 (TCM-199) with antibiotics, pyruvate, FSH, human chorionic gonadotropin (hCG) and serum (serum substitute supplement - Irvine Scientific®). After 48 h of culture, the oocytes that achieved metaphase II stage were inseminated, and the fertilized ones were transferred.

Results: one hundred and forty-four follicles were aspirated. There were 67 (46.5%) immature retrieved oocytes and 43 (64.2%) reached the metaphase II stage and were inseminated. Thirty fertilized oocytes and 25 embryos were transferred to 10 patients. There was one pregnancy with a baby born.

Conclusion: we conclude that to mature human oocytes *in vitro* before *in vitro* fertilization is a procedure able to achieve pregnancy.

KEYWORDS: *In vitro* fertilization. Infertility.

Referências

1. Pincus G, Saunders B. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro* IV. The maturation of human ovarian ova. *Anat Rec* 1939; 75:537-45.
2. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39:594-602.
3. Trounson A, Wood C, Kausche A. *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62:353-62.
4. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65:1047-50.

5. Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1999; 72:639-42.
6. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55:109-13.
7. Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update* 1998; 4:223-36.
8. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 1998; 13:3132-8.
9. Thornton MH, Francis MM, Paulson RJ. Immature oocyte retrieval: lessons from unstimulated IVF cycles. *Fertil Steril* 1998; 70:647-50.
10. Gomez E, de los Santos MJ, Ruiz A, Tarin JJ, Remohi J, Pellicer A. Effects of epidermal growth factor in the final stages of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in humans. *Hum Reprod* 1993; 8:691-4.
11. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15:1140-8.
12. Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 3):52-62.
13. Zheng P, Wang H, Bavister BD, Ji W. Maturation of rhesus monkey oocytes in chemically defined cultured media and their functional assessment by IVF and embryo development. *Hum Reprod* 2001; 16:300-5.
14. Cortvrindt RG, Hu Y, Liu J, Smitz JE. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fertil Steril* 1998; 70:1114-25.
15. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12:2766-72.
16. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 2000; 15:11-7.
17. Mikkelsen AL, Andersson AM, Skakkebaek NE, Lindenberg S. Basal concentrations of oestradiol may predict the outcome of in-vitro maturation in regularly menstruating women. *Hum Reprod* 2001; 16:862-7.
18. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 oestradiol serum concentration as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 64:991-4.
19. Wu J, Zhang L, Wang X. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertil Steril* 2000; 74:1137-41.
20. Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1995; 10:1962-7.
21. Cha KY, Han SY, Chung HM, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73:978-83.
22. Organização Mundial da Saúde. Manual de laboratório para o exame do sêmen humano e interação esperma-muco cervical. 1ª ed. São Paulo: Santos; 1994. p.111.
23. Van Steirteghem A, Nagy P, Joris H, et al. The development of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11 Suppl 1:59-72.
24. Smith SD, Mikkelsen AL, Lindenberg S. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. *Fertil Steril* 2000; 73:541-4.

Recebido em: 25/3/2003

Aceito com modificações em: 12/8/2003

RBGO

É uma publicação da FEBRASGO que aceita artigos provenientes de ginecologistas, de outras áreas e de outras especialidades.

PORTANTO, PUBLIQUE !!!

Mande já seu artigo para **RBGO**