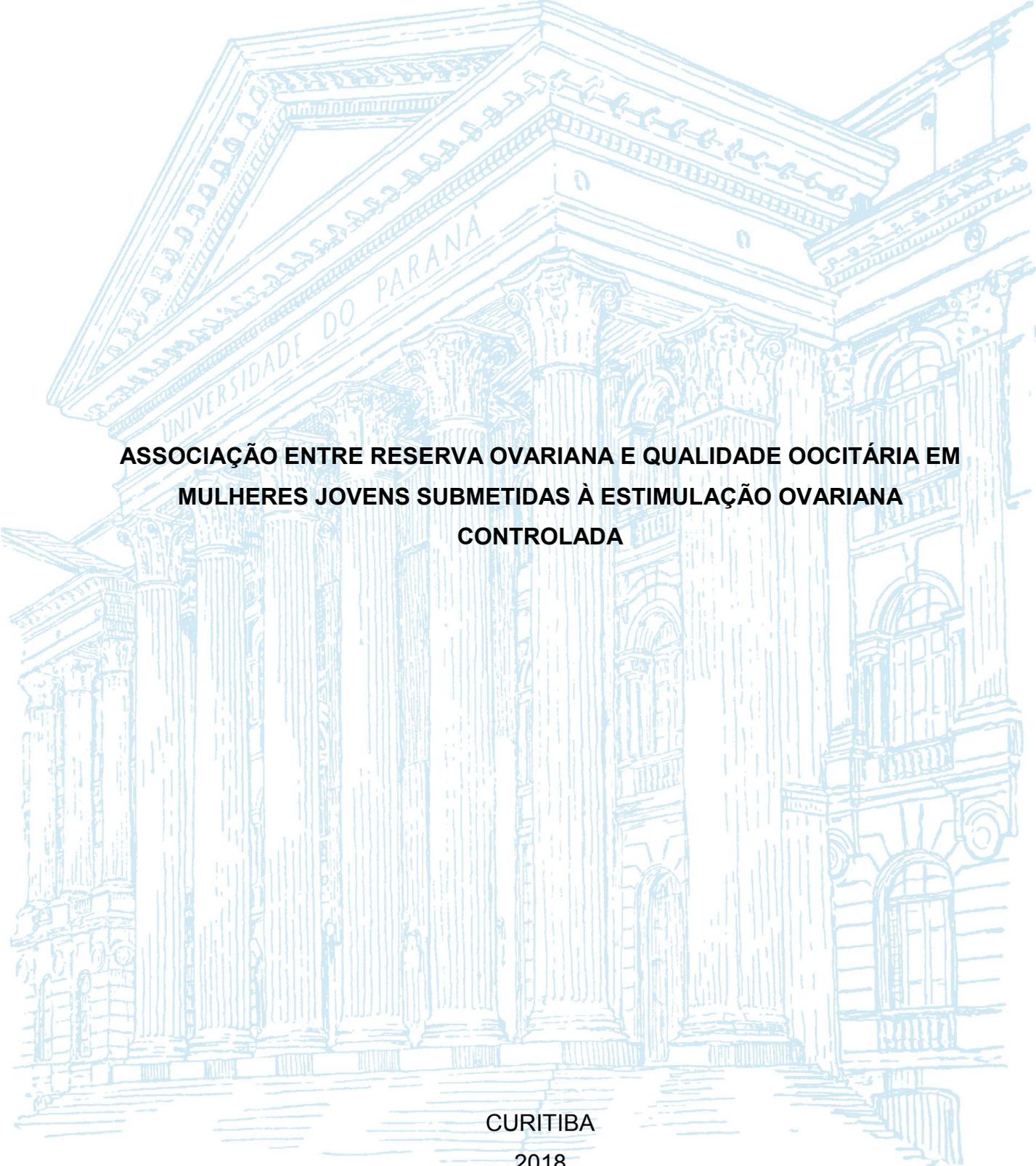


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIANE MARGARETH SCANTAMBURLO NIEHUES



**ASSOCIAÇÃO ENTRE RESERVA OVARIANA E QUALIDADE OOCITÁRIA EM
MULHERES JOVENS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA
CONTROLADA**

CURITIBA

2018

VIVIANE MARGARETH SCANTAMBURLO NIEHUES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE RESERVA OVARIANA E QUALIDADE OOCITÁRIA EM
MULHERES JOVENS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA
CONTROLADA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Kulak Jr.
Co-orientadora: Profª Dra Renate von Linsingen

CURITIBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA JORDÃO
CRB9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELA AUTORA

N666 Niehues, Viviane Margareth Scantamburlo
Associação entre reserva ovariana e qualidade oocitária em
mulheres jovens submetidas à estimulação ovariana controlada / Viviane
Margareth Scantamburlo Niehues. – Curitiba, 2018.
75f. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Kulak Junior
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Renate von Linsingen
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal
do Paraná.

1. Infertilidade. 2. Oócitos. 3. Reprodução. 4. Reserva ovariana.
I. Kulak Junior, Jaime. II. Linsingen, Renate von. III. Programa de Pós-
Graduação em Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WP 570



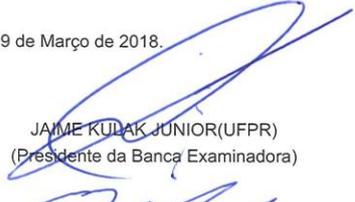
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCOGINECOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCOGINECOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **VIVIANE MARGARETH SCANTAMBURLO NIEHUES**, intitulada: **ASSOCIAÇÃO ENTRE RESERVA OVARIANA E QUALIDADE OOCITÁRIA EM MULHERES JOVENS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA CONTROLADA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 09 de Março de 2018.


JAIME KULAK JUNIOR(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


MARIO CAVAGNA NETO(UNESP)


ANDRE HADYME MIYAGUE(UFPR)

Dedico à minha mãe Izabel, a ela todos os créditos, por todo empenho e dedicação na minha formação bem como apoio e amor incondicional.

Aos meus filhos Murilo e Rafael pelo tempo que deixamos de estar juntos e serem fontes de inspiração para ajudar os casais na busca do tão sonhado filho.

Ao meu esposo Guido pelo carinho e amor a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jaime Kulak Jr, que conduziu meus estudos com muita paciência e cuidado. Agradeço pela confiança ao aceitar meu projeto de pesquisa.

Ao Dr. Lidio Jair Ribas Centa, que me acolheu na Androlab contribuindo diariamente no avanço do conhecimento, na ética e no amor ao próximo. Sua participação foi imprescindível para realização deste estudo.

Às pacientes que participaram do trabalho, que nossa pesquisa contribua em avanço científico na sua luta em busca do filho sonhado.

À Dra. Renate Von Linsingen, que me orientou com delicadeza e maestria na estruturação da dissertação.

À minha equipe de trabalho na Androlab: Adriane, Alexandra, Débora, Franciane, Rayssa, Rosana, Roseli e Regis; sua parceria tornou meu desafio de lidar com o tempo possível mais leve.

À Kahisa Fontana Dal Toso pela análise criteriosa de todos os oócitos, bem como sempre muito prestativa nos exames laboratoriais.

À Solena Kuzma que me orientou no tratamento estatístico dos dados, bem como na dissertação, sempre atenciosa e prestativa.

Ao Dr. Marcelo Aranha que gentilmente me auxiliou na redação do trabalho.

Ao Dr Renato M. Nisihara, Dr Rafael F. Bruns e Dr Alvaro P. Ceschin, que com sua avaliação na minha banca de qualificação, contribuíram em muito para o desenvolvimento desta dissertação.

A Deus, por tudo.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

(Ana Carolina Vilela da Costa)

RESUMO

O prognóstico reprodutivo é classicamente apresentado de acordo com a idade da mulher, sendo descrito que com o avançar do tempo ocorreria piora na quantidade e qualidade dos oócitos. Entretanto, a baixa resposta ao estímulo ovariano, uma medida de reserva ovariana baixa, pode estar presente em até 24% das mulheres com menos de 35 anos e não é consenso que nesta situação a qualidade oocitária estaria preservada. Este trabalho teve o intuito de analisar os métodos de avaliação de reserva ovariana em mulheres inférteis jovens submetidas à estimulação ovariana controlada (EOC), bem como a dose total de gonadotrofinas utilizadas no estímulo ovariano, e a existência de associação com qualidade oocitária. Em estudo retrospectivo, pacientes inférteis com até 35 anos submetidas à EOC foram classificadas quanto a apresentar reserva ovariana normal ou baixa de acordo com hormônio folículo estimulante (FSH) basal (mIU/mL), hormônio anti-mulleriano (AMH) (ng/mL) e contagem de folículos antrais (CFA) (n). Seus oócitos foram classificados de acordo com maturidade e alteração de morfologia (presença ou não de alterações na forma, zona pelúcida, citoplasma e espaço perivitelínico). Foram analisados dados de 49 pacientes resultando num total de 348 oócitos. Neste estudo, 81,6% das pacientes apresentaram FSH basal normal (<10 mIU/mL), apresentando maior no número de oócitos maduros comparado às com FSH elevado: 6 e 2, respectivamente ($p < 0,001$). Em relação ao AMH, 38,8% delas tinham reserva ovariana baixa (<1,2 ng/mL). Este grupo apresentou menor quantidade de oócitos maduros, maior FSH basal e idade ($p < 0,001$). Cada acréscimo de unidade no FSH basal sérico representou um aumento de 42% de chance de apresentar oócito com citoplasma anormal ($p = 0,006$) enquanto que aquelas com AMH baixo, apresentaram um risco 5,3 vezes maior de ter oócito com esta alteração (OR 5,3; IC 1,7-16,7; $p = 0,004$) e três vezes maior de ter anormalidade no espaço perivitelínico (OR 3,0; IC 0,8-4,9; $p = 0,018$). Quando a CFA foi menor que 10 observou-se maior quantidade de oócitos com forma anormal (OR 2,9; IC 1,1-7,6; $p = 0,035$). Não houve diferença significativa entre os grupos na dose total utilizada de FSH/HMG durante o estímulo ovariano assim como aumento de risco de alteração da morfologia oocitária considerando esta variável. Desta forma, neste estudo, mulheres jovens com reserva ovariana baixa apresentaram mais oócitos com morfologia alterada comparado àquelas com reserva normal. A reserva ovariana baixa pelo AMH esteve associada a pior qualidade oocitária em mulheres jovens submetidas à EOC.

Palavras-chave: Infertilidade. Oócitos. Reprodução. Reserva ovariana.

ABSTRACT

The reproductive prognosis is classically presented according to the woman's age, being described that with the advancement of the time would occur worsening in the quantity and quality of the oocytes. However, the low response to ovarian stimulation, a low ovarian reserve measure, may be present in up to 24% of women under 35 years of age and it is not a consensus that in this situation oocyte quality would be preserved. The objective of this study was to analyze methods of ovarian reserve evaluation in young infertile women submitted to controlled ovarian stimulation (COS), as well as the total dose of gonadotrophins used in ovarian stimulation, and the existence of association with oocyte quality. In a retrospective study, infertile patients up to 35 years of age submitted to COS were classified as having normal or low ovarian reserve according to basal follicle stimulating hormone (FSH), anti-mullerian hormone (AMH) (ng/mL) and antral follicle count (AFC) (n). Their oocytes were classified according to maturity and morphology alteration (presence or not of alterations in the form, zona pellucida, cytoplasm and perivitelline space). Data were analyzed from 49 patients resulting in a total of 348 oocytes. In this study, 81.6% of the patients presented normal basal FSH (<10 mIU/mL), presenting a higher number of mature oocytes compared to those with high FSH: 6 and 2, respectively ($p < 0.001$). Regarding AMH, 38.8% had low ovarian reserve (<1.2 ng/mL). This group had lower number of mature oocytes, higher basal FSH and age ($p < 0.001$). Each increase in serum basal FSH represented a 42% increase in the chance of presenting oocyte with abnormal cytoplasm ($p = 0.006$) while those with low AMH had a 5.3-fold increased risk of having oocyte with this alteration (OR 5.3, CI 1.7-16.7, $p = 0.004$), and 3-fold greater alterations in perivitelline space (OR 3.0, CI 0.8-4.9, $p = 0.018$). When the AFC was less than 10, an abnormal number of oocytes was observed (OR 2.9, CI 1-7.6, $p = 0.035$). There was no significant difference between groups in the total FSH/HMG dose during ovarian stimulation as well as increased risk of altered oocyte morphology considering this variable. Thus, in this study, young women with low ovarian reserve had more oocytes with altered morphology compared to those with normal reserve. The low ovarian reserve for AMH was associated with poor oocyte quality in young women submitted to COS.

Keywords: Infertility. Oocytes. Reproduction. Ovarian reserve.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE RESERVA OVARIANA FSH BASAL E AMH.....	26
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES, DOSAGENS HORMONAIS, CFA, DOSE DE FSH/HMG TOTAL UTILIZADA DURANTE O ESTÍMULO OVARIANO E CLASSIFICAÇÃO OOCITÁRIA DE ACORDO COM A MATURIDADE.....	42
TABELA 3 - ETIOLOGIA DA INFERTILIDADE DAS PACIENTES DO ESTUDO (N=49)	42
TABELA 4 - ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM O FSH BASAL.....	44
TABELA 5 - ANÁLISE DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH BASAL E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM O AMH.....	45
TABELA 6 - ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM A CFA.....	46
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOSE E NÚMERO DE OÓCITOS MII DE ACORDO COM O PARÂMETRO DE RESERVA OVARIANA UTILIZADO*	47
TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE E QUALIDADE OOCITÁRIA.....	49
TABELA 9 - NÚMERO DE OÓCITOS NORMAIS DE ACORDO COM A MORFOLOGIA. N= 348	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA DE ANEUPLOIDIA DE ACORDO COM A IDADE MATERNA.....	21
FIGURA 2 - POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS: DA FORMAÇÃO INTRAUTERINA À MENOPAUSA.....	21
FIGURA 3 - SECREÇÃO DE AMH, INIBINA B E ESTRADIOL PELA CÉLULA DA GRANULOSA DURANTE A FOLICULOGÊNESE.....	24
FIGURA 4 - OÓCITO MADURO COM O <i>CUMULUS OOPHORUS</i> (A) E APÓS A SUA REMOÇÃO PELO PROCESSO DE DENUDAÇÃO (B).....	30
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO OÓCITO HUMANO MADURO.....	31
FIGURA 6 - IMAGENS DE OÓCITOS IMATUROS (PI E MI) E MADURO (MII). A SETA REPRESENTA A VESÍCULA GERMINATIVA.....	31
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	40
FIGURA 8 - IMAGENS DE OÓCITOS ANORMAIS: ALTERAÇÃO DE CITOPLASMA CORPOS REFRÁTEIS (A), ESPAÇO PERIVITELÍNICO AUMENTADO (B) E FORMA OVALADA (C).....	50
FIGURA 9 - IMAGENS DE OÓCITOS ANORMAIS: ZONA PELÚCIDA ESPESSA(A), CORPÚSCULO POLAR FRAGMENTADO (B) E ESPAÇO PERIVITELÍNICO COM GRANULAÇÕES (C).....	51
FIGURA 10 - IMAGENS DE OÓCITOS COM ALTERAÇÃO NO CITOPLASMA: VACÚOLOS (A), ALTERAÇÃO NA COLORAÇÃO (B), GRANULAÇÃO CENTRAL ESCURA (C).....	51

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES EM GRUPOS DE ACORDO COM A RESERVA OVARIANA EM NORMAL OU BAIXA [£] DE ACORDO COM FSH BASAL, CFA OU AMH (N=49)	43
GRÁFICO 2 - RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM O FSH BASAL. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (N=49).....	44
GRÁFICO 3 - RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM O AMH. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (N=49).....	45
GRÁFICO 4 - RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM A CFA. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (N=49).....	47

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASRM	-	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
AMH	-	Hormônio anti-mulleriano
AFC	-	<i>Antral follicle count</i>
CDC	-	<i>Centers for Control Disease and Prevention</i>
CFA	-	Contagem de folículos antrais
COS	-	<i>Controlled ovarian stimulation</i>
CSC	-	<i>Continuous Single Culture</i> (Cultura contínua única)
EOC	-	Estimulação ovariana controlada
FIV	-	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
GnRH	-	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	-	Gonadotrofina coriônica humana
HMG	-	Gonadotrofina menopáusica humana
ICSI	-	Injeção intra-citoplasmática de espermatozoides
LH	-	Hormônio luteinizante
ng/mL	-	Nanograma por mililitro
MHM	-	<i>Multipurpose Handling Medium</i>
MI	-	Oócito imaturo em metáfase I
MII	-	Oócito maduro em metáfase II
mIU/mL	-	Miliunidade internacional por mililitro
OR	-	<i>Odds ratio</i>
PGS	-	Screening genético pré-implantacional
PI	-	Oócito imaturo em prófase I
REDLARA	-	Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida
SisEmbrio	-	Sistema Nacional de Produção de Embriões
SSS	-	<i>Serum Substitute Supplement</i>
TGF- β	-	Fator transformador de crescimento beta
UI	-	Unidade internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	INFERTILIDADE E FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	18
2.2	RESERVA OVARIANA.....	21
2.2.1	Avaliação da reserva ovariana pelo FSH basal.....	22
2.2.2	Avaliação da reserva ovariana pelo AMH.....	24
2.2.3	Avaliação da reserva ovariana pelo CFA	28
2.3	QUALIDADE OOCITÁRIA	29
2.3.1	Dose de gonadotrofinas e qualidade oocitária	33
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	PACIENTES	36
4.2	AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA.....	36
4.2.1	Dosagem sérica de FSH basal.....	37
4.2.2	Dosagem sérica de AMH.....	37
4.2.3	Contagem de Folículos Antrais	37
4.3	PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA	38
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS OÓCITOS	38
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS	40
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DAS PACIENTES ESTUDADAS	40
5.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM O FSH BASAL E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE.....	43
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM O AMH E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE	44
5.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM A CFA E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE	46
5.5	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO E NÚMERO DE OÓCITOS MII.	47
5.6	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DA PACIENTE E QUALIDADE OOCITÁRIA.....	48
5.7	MORFOLOGIA OOCITÁRIA: FREQUÊNCIA DE NORMALIDADE E IMAGENS DE OÓCITOS ALTERADOS.....	50

6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	66
	ANEXO 1 – CARTAS DE APROVAÇÃO DO CEP.....	68

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade conjugal representa importante e prevalente agravo à saúde. Cerca de 7,5 milhões de mulheres nos EUA (cerca de 12,3% da população em idade reprodutiva), apresentam a doença (CDC, 2016). Estima-se que o fator ovulatório esteja presente em cerca de 25% dos casos (ASRM, 2012a).

É amplamente descrita na literatura a queda natural da fertilidade da mulher com o avançar da idade. A fecundidade diminui gradualmente após os 32 anos sendo que a queda é mais brusca após os 37 anos (SPEROFF, 2011). Mesmo com tratamentos de reprodução assistida, os resultados também evidenciam este achado. De acordo com dados da Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (REDLARA), a taxa de nascimento por embrião transferido de acordo com a idade da mulher foi de 35% nas com menos de 35 anos, 28% entre 35-39 anos, 17% quando tinham 40-42 anos, e 10% naquelas com mais de 43 anos (REDLARA, 2012). Em pacientes acima de 44 anos a taxa de sucesso na FIV com oócitos próprios dificilmente ultrapassa 1% dos casos (ASRM, 2014). A taxa global de aborto nestes tratamentos foi de 18% sendo que também aumentou com o avançar da idade. Em 14,4% dos casos ocorreu antes nas pacientes com menos de 35 anos, 18,5% entre 35-40 anos e 41,5% quando tinham mais de 41 anos (REDLARA, 2012).

Reserva ovariana é o termo utilizado para descrever o *pool* de folículos primordiais da mulher em um determinado momento da vida. Ao nascer, uma menina apresenta cerca de 2 milhões de folículos primordiais e, devido ao processo de apoptose, somente cerca de 25% estarão presentes na puberdade. Deste total, apenas 400-500 resultarão em oócitos na ovulação. Quando a massa folicular é pequena, instala-se a menopausa. Estima-se que cerca de 2-3 anos antes que isso ocorra, a capacidade reprodutiva da mulher já esteja muito comprometida (HUSSEIN, 2005; WALLACE; KELSEY, 2010; MACÉA, 2011; GLEICHER; KUSHNIR; BARAD, 2015; AMANVERMEZ; TOSUN, 2016).

Dentre os métodos de avaliação da reserva ovariana estão as dosagens séricas hormônio folículo estimulante (FSH) basal e hormônio anti-mulleriano (AMH), além do ultrassonográfico contagem de folículos antrais (CFA) (ASRM, 2015). Discute-se na literatura médica qual método seria o mais adequado para este fim, principalmente em relação a taxa de gestação natural e predição de idade da menopausa.

Considera-se que a idade seja um importante marcador de reserva ovariana. Desta forma, a mulher com menos de 35 anos, considerada jovem, teoricamente apresentaria maiores chances de engravidar por apresentar oócitos em maior quantidade e melhor qualidade (WALLACE; KELSEY, 2010; ASRM, 2015). Porém, na prática clínica, tem sido observado um crescente aumento de mulheres jovens com baixa reserva ovariana e/ou oócitos de má qualidade. Nesse sentido, questionamos quanto a real taxa de gravidez natural ou taxa de sucesso em terapias de reprodução assistida neste perfil de paciente.

A insuficiência ovariana prematura vem na sequência da baixa reserva ovariana e ocorre em 1% da população geral e entre 5-10% dos casos de amenorréia secundária. Tem como causas: alterações genéticas, doenças auto-imunes, ooforite, perda folicular induzida por medicamentos, radiações, toxinas e cirurgias ovarianas. Entretanto, em 90% dos casos não se estabelece diagnóstico (ESHRE, 2015; GLEICHER; KUSHNIR; BARAD, 2015). Apesar de rara, é importante lembrar o impacto que esta enfermidade representa na vida reprodutiva da mulher onde, possivelmente, a ovulação pode ser a única alternativa para engravidar, mesmo sendo jovem.

Na reprodução assistida, é de suma importância a seleção de gametas pelo embriologista com o objetivo de alcançar melhores resultados clínicos. De acordo com Cota et al. (2012), a qualidade do oócito pode refletir o potencial intrínseco de desenvolvimento do gameta, além da fecundação, mas também no desenvolvimento embrionário. Variações na morfologia oocitária podem ocorrer devido a idade da mulher, alterações genéticas e até mesmo pela hiperestimulação ovariana (SETTI et al., 2011). Porém, pouco se discute sobre a qualidade dos oócitos de mulheres jovens com reserva ovariana baixa. Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de investigar a existência de associação entre a reserva ovariana avaliada através de três métodos (FSH basal, AMH e CFA) e qualidade oocitária nestas mulheres.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFERTILIDADE E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A taxa de gravidez num casal jovem saudável é estimada em 15 a 20% ao mês. Estima-se que cerca de 85% destes engravidem em até 1 ano de relações sexuais não protegidas. Desta forma, considera-se infértil aquele que não consegue conceber naturalmente após este período. Entretanto, conforme recomendação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), sugere-se investigação imediata do casal quando a mulher apresenta mais de 35 anos de idade, alguma doença reconhecidamente impactante da função reprodutiva ou baixa reserva ovariana (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2017a).

Dentre as causas de infertilidade, tem-se distúrbios ovulatórios em 15-25% dos casos, fator tubo-peritoneal em 25-35% e alteração masculina em 40%. Porém, em 10% dos casais não se identifica a causa da dificuldade em conceber denominando-se infertilidade sem causa aparente (ARSM, 2012a; ASRM, 2015).

Entre os tratamentos da infertilidade, tem-se inicialmente, a correção de problemas identificados. Nos casos de anovulação, indução hormonal e coito programado, por exemplo. Na alteração tubária, otimização da dinâmica anatômica. Nos casos de alteração espermática por causas reversíveis, o tratamento do fator masculino (ASRM, 2015).

Nas situações de fator masculino ou tubário graves, assim como de infertilidade sem causa aparente de longa data e baixa reserva ovariana, indica-se a Fertilização *in vitro* (FIV). O primeiro nascimento deste tratamento data de 1978 e, desde então, a técnica tem se aprimorado muito sendo responsável por mais de 5 milhões de nascimentos no mundo. Segundo o registro anual de 2014 da REDLARA, com dados de tratamentos feitos em 159 centros de reprodução assistida em 15 países da América Latina, foram realizados 65.534 ciclos de FIV/ICSI sendo 41,6% brasileiros. Destes tratamentos, nasceram 18.162 bebês (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2017b).

A injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI), inicialmente criada para casos de fator masculino grave, é técnica de FIV amplamente realizada na atualidade nos casos de alta complexidade de terapia de reprodução assistida. Também é indicada quando da utilização de oócitos descongelados e de mulheres

com idade avançada ou reserva ovariana baixa, considerando que pode ocorrer alteração na zona pelúcida, o que pode dificultar a penetração do espermatozoide (DONADIO et al, 2012).

Neste tratamento, a mulher é submetida a protocolo de estimulação ovariana controlada (EOC) visando maior número de oócitos que o naturalmente obtido, considerando que este poderia não ter qualidade suficiente ou não fertilizar e assim comprometer todo o resultado do tratamento. Ela é submetida a avaliação ecográfica e hormonal no início da fase folicular (2º ou 3º dia do ciclo menstrual) e, estando dentro do esperado para a fase, inicia a aplicação diária de hormônios gonadotróficos (FSH e/ou HMG) realizando novas avaliações seriadas. Para impedir o pico endógeno do hormônio luteinizante (LH), que promove a ruptura folicular natural, utiliza-se protocolos com análogos agonistas ou antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Para promover a maturação final dos oócitos, simula-se o pico de LH com uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Após 35-36 horas realiza-se a captação dos oócitos por via vaginal guiado por ultrassonografia num procedimento realizado sob anestesia local ou sedação (DONADIO et al, 2012).

Em geral, o espermatozoide a ser injetado no oócito é obtido no mesmo dia por masturbação ou através de procedimentos cirúrgicos nos casos de azoospermia (aspiração de epidídimo ou biópsia testicular). Quando não se obtém espermatozoides e nos casos de homoafetividade, pode-se utilizar gametas de doador anônimo (REDLARA, 2006; DONADIO et al, 2012).

Para a realização da ICSI utiliza-se um microscópio invertido com micro manipulador. O oócito é fixado na agulha de Holding e com a agulha de injeção imobiliza-se o espermatozoide através da quebra da cauda realizando um rápido atrito entre a mesma e o fundo da placa. Ele é então sugado para dentro da agulha que penetra o oócito, fazendo uma pequena sucção até o rompimento da membrana, e então injetado dentro do citoplasma. Após finalizada a ICSI, os oócitos são incubados numa temperatura de 37°C com 8% de CO₂ (LIMA et al, 2012).

No dia seguinte a coleta dos oócitos, de 16 a 18 horas após a ICSI, é confirmada ou não a fertilização pela identificação dos pró-núcleos (LIMA et al, 2012). Em geral, espera-se que 60 a 80% dos oócitos fertilizem. De acordo com o 10º relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio), em 2016 foram obtidos no Brasil por ciclo de FIV uma média de 9 oócitos por mulher com uma taxa de fertilização de 73% (ANVISA, 2017). Este é um dos motivos de se buscarem mais

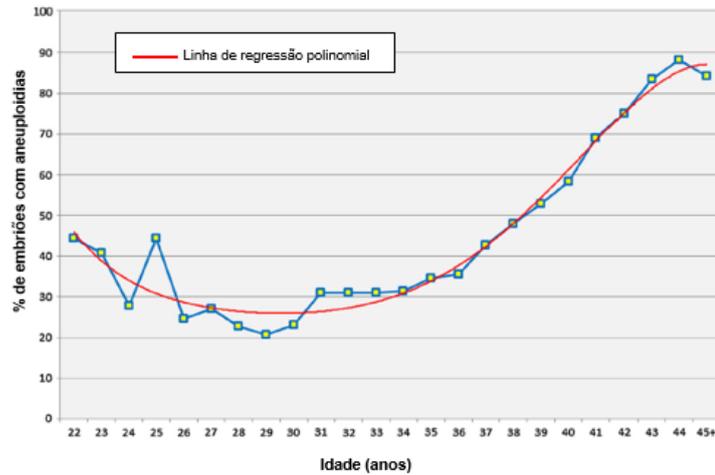
oócitos que o naturalmente obtido, otimizando assim o resultado do tratamento. Além disso, dentre os fertilizados, nem todos geram embriões com desenvolvimento normal e uma pequena proporção chegam à fase de blastocisto, etapa final antes de realmente se fixar no útero da mulher. Demko et al. (2016) sugerem que este fato poderia ser explicado pela presença de alterações cromossômicas no embrião o que impediria o seu desenvolvimento normal. La Marca et al. (2017) mostraram em estudo com 578 casais submetidos à FIV/ICSI uma média de 3 blastocistos por paciente. Após o *screening* genético pré-implantacional (PGS), a média de blastocistos euplóides por paciente foi de apenas 1,1.

A queda natural da fertilidade com o avançar da idade da mulher, assim como o aumento da taxa de aborto por aneuploidia, são consensos na literatura. Isto pode estar relacionado à pior qualidade dos oócitos remanescentes (AMANVERMEZ; TOSUN, 2016; PILS et al., 2016; SCHEFFER et al., 2017). Dentre as anormalidades, citam-se modificações no mecanismo da constituição do fuso mitótico, erros de alinhamento cromossômico, aumento da taxa de degeneração e não disjunção cromossômica (LA MARCA et al., 2017).

Com o advento do PGS, sugere-se que a aneuploidia possa ser importante causa de falha de implantação embrionária em ciclos de FIV/ICSI (DEMKO et al., 2016; LA MARCA et al., 2017).

Em estudo retrospectivo com resultados de 15.169 biópsias embrionárias Franasiak et al. (2014) mostraram que a menor taxa de aneuploidia foi quando a mulher tinha entre 26 e 30 anos de idade (em torno de 23%). Aos 35 anos, a taxa ficou em 34,5%. Aos 40 anos, 58,2% eram anormais. Aos 44 anos, 88% tinham alguma alteração cromossômica (FIGURA 1). Porém, faltam estudos correlacionando níveis de reserva ovariana em mulheres jovens com os resultados do estudo genético no embrião.

FIGURA 1 – PREVALÊNCIA DE ANEUPLOIDIA DE ACORDO COM A IDADE MATERNA.

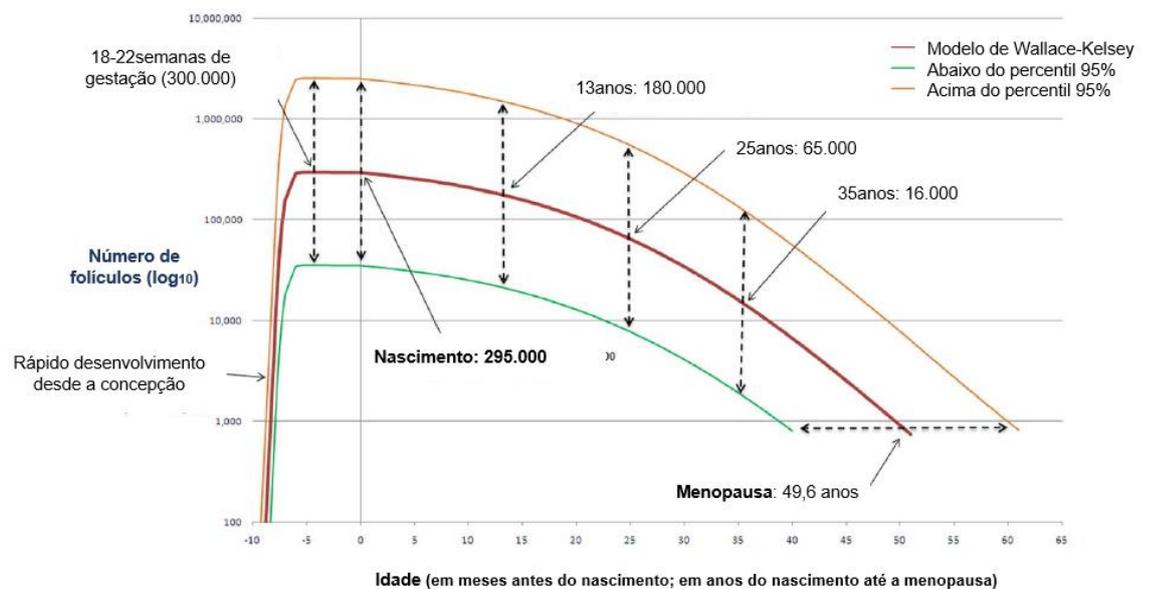


FONTE: Adaptado de FRANASIAK et al. (2014).

2.2 RESERVA OVARIANA

A mulher nasce com determinado número de folículos nos ovários, que diminui gradualmente por atresia e/ou recrutamento para ovulação, conforme modelo de Wallace e Kelsey (FIGURA 2).

FIGURA 2 - POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS: DA FORMAÇÃO INTRAUTERINA À MENOPAUSA



FONTE: Adaptado de WALLACE; KELSEY (2010).

Estima-se que ela apresente cerca de 1-2 milhões de oócitos ao nascimento, sendo que nos anos reprodutivos são consumidos cerca de mil folículos a cada ciclo. Folículos são recrutados durante toda a vida reprodutiva, inclusive durante o período gestacional ou no uso de contraceptivos hormonais. Este gasto varia com a idade, sendo cerca de 1.400 folículos por mês aos 20 anos e caindo para cerca de 30 aos 40 anos. Acredita-se que aos 30 anos ela apresente cerca de 12% da reserva ovariana inicial reduzindo a 3% aos 40 anos (WALLACE; KELSEY, 2010; GLEICHER; KUSHNIR; BARAD, 2015).

Mulheres com a mesma idade podem apresentar variadas respostas à EOC e terem potencial reprodutivo diferentes. A determinação da reserva ovariana é importante na predição do número de oócitos remanescentes e como potencial de sucesso em tratamentos de reprodução assistida. A baixa resposta ao estímulo, uma medida de baixa reserva ovariana, pode atingir entre 9 e 24% das mulheres submetidas a este tipo de terapia. Assim, a baixa reserva ovariana é definida pela presença de ciclos menstruais regulares, alteração nos testes de reserva ovariana e menor resposta ao estímulo hormonal em tratamentos de reprodução assistida (ASRM, 2012b; ESHRE, 2015).

2.2.1 Avaliação da reserva ovariana pelo FSH basal

Os ovários têm funcionamento dinâmico e contínuo e, desta forma, um ciclo ovulatório nunca é igual ao outro. Através de respostas variáveis aos pulsos de FSH e LH nos anos reprodutivos, a função ovariana ocorre de acordo com regulação local em cerca de 28 dias. A fase folicular tem início com elevação de 10 a 30% nos níveis de LH e FSH no final da fase lútea do ciclo anterior. Essa elevação tem o objetivo de recrutar alguns folículos, agora dependentes de gonadotrofinas, para seu desenvolvimento até a fase ovulatória. Por mecanismo de regulação local, a chamada dominância folicular, apenas 1 folículo chegará até a maturação final na ovulação sendo que os demais vão sofrer atresia. No final da foliculogênese ocorre liberação de grande quantidade de FSH e LH associada a uma onda de GnRH por retroalimentação do alto nível de estradiol sérico, o que culmina no processo que leva ao reinício e resolução da meiose oocitária, mucificação e expansão do *cumulus*

oophorus e rotura folicular propriamente dita. Também por retroalimentação, com o pico de estradiol nesta fase, ocorre inibição hipotalâmica-hipofisária da secreção de FSH. Porém, à medida que diminui a reserva folicular, o mecanismo ovulatório deficiente e inadequada elevação nos níveis de estradiol e inibina fazem com que os níveis basais de FSH se elevem (MEDEIROS, 2010).

Tradicionalmente, FSH e estradiol basal têm sido usados como marcadores de reserva ovariana, sendo reflexos do adequado mecanismo de *biofeedback* do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano do ciclo menstrual anterior. Porém, o uso de medicamentos hormonais e/ou presença de cistos de ovário são importantes fatores de confusão na análise e interpretação dos resultados. Assim, uma mulher com reserva ovariana baixa em uso de pílula anticoncepcional hormonal pode apresentar níveis normais de FSH no período menstrual, bem como a presença de cistos funcionais através da liberação de estradiol também resulta em FSH anormalmente baixo neste perfil de mulher. Outro fator confundidor é que o FSH é liberado pela hipófise em pulsos ao longo do dia e desta forma seu nível sérico pode variar significativamente de acordo com o horário da coleta da amostra (SCOTT et al., 1989; TONER et al., 1991; MEDEIROS, 2010).

Altos níveis de FSH basal são preditores de má resposta ovariana ao estímulo hormonal. Em estudo retrospectivo de Scott et al. (1989) com 758 ciclos de FIV se correlacionou o nível de FSH basal, no 3º dia do ciclo menstrual, com resultados do tratamento. A taxa de cancelamento do ciclo de FIV por falta de resposta ao estímulo ovulatório foi superior no grupo de pacientes com FSH maior ou igual a 25 mIU/mL. A taxa de gravidez foi de 17% nas que apresentavam FSH basal <15 mIU/mL, 9,3% quando estava entre 15-24,9 mIU/mL, sendo de 3,6% acima de 25 mIU/mL ($p < 0,01$) (SCOTT et al., 1989).

Corroboram com estes achados o estudo de Toner et al. (1991), que correlacionou o nível do FSH basal com taxas de cancelamento e gravidez em 1478 ciclos de FIV. A taxa de cancelamento foi diferente nos quatro grupos de mulheres analisadas: FSH < 15 mIU/mL: 5%; FSH 15-20 mIU/mL: 10%; FSH 20-25 mIU/mL: 20%; e FSH mIU/mL: 40%. A taxa de gravidez diminuiu gradativamente até o FSH chegar a 20 mIU/mL. Acima desse valor, caiu abruptamente até ser nula (TONER et al., 1991).

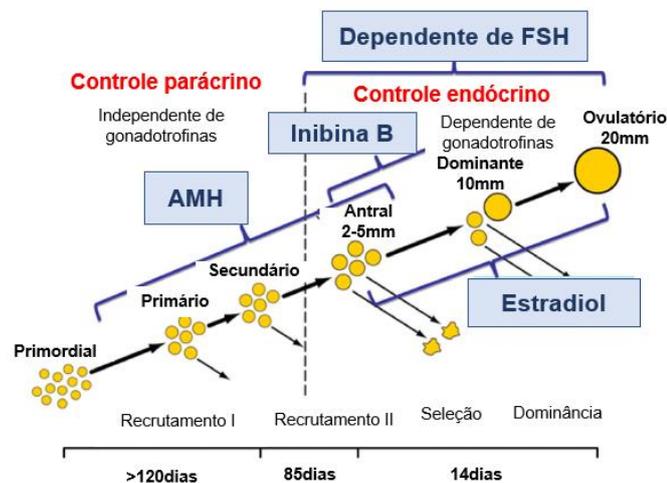
Posteriormente, Toner e Seifer (2013) questionaram a aplicabilidade do uso do FSH basal como determinante de reserva ovariana e aconselhamento reprodutivo,

sugerindo o AMH como melhor marcador. Eles reforçaram o fato de que para uma fiel interpretação, é necessária associação de resultados de FSH e estradiol basal além de que apenas resultados altos têm valor prognóstico por estarem associados a casos de má resposta ovariana ao estímulo. Porém, resultados normais não identificam quadros de alta reserva ovariana e tampouco exclui casos de baixa reserva.

2.2.2 Avaliação da reserva ovariana pelo AMH

As células da granulosa produzem muitos hormônios e fatores de crescimento, dentre eles inibinas, fatores de crescimento semelhantes à insulina, ativinas e fator de crescimento endotelial. A diminuição da secreção de inibina foi o primeiro fator de crescimento a ser observado nas mulheres com redução da reserva ovariana. Entretanto, não houve uma aplicabilidade clínica do uso da inibina para testes de reserva ovariana devido a variabilidade e inconsistência nos métodos de ensaio existentes. Além disso, a secreção de inibina B é dependente de FSH e não está presente precocemente no processo da foliculogênese. A FIGURA 3 ilustra a secreção de AMH, inibina B e estradiol pelas células da granulosa na foliculogênese esquematizando a dependência ou não das gonadotrofinas no processo (TONER; SEIFER, 2013).

FIGURA 3 – SECREÇÃO DE AMH, INIBINA B E ESTRADIOL PELA CÉLULA DA GRANULOSA DURANTE A FOLICULOGÊNESE.



FONTE: Adaptado de TONER; SEIFER (2013).

O AMH, primeiramente descrito em 1940, é uma glicoproteína composta de 560 aminoácidos pertencentes à família do fator transformador de crescimento β (TGF- β). Somente em 1993 foi identificada a sua presença em líquido folicular e mais tarde, em 2002, foi sugerido como marcador de reserva ovariana. É produzido pelas células da granulosa dos folículos pré-antrais pequenos, principalmente naqueles com menos de 5 mm, tornando-se indetectável nos maiores de 10 mm de diâmetro. Existem poucos dados acerca dos níveis de AMH nas meninas pré-pubescentes: acredita-se que esteja indetectável antes do nascimento e em níveis muito baixos até os 14 anos de idade. Estima-se que ocorra aumento até um platô aos 25 anos, voltando a ser indetectáveis na menopausa (SEIFER et al., 2002; BROER et al., 2011; DEWAILLY et al., 2014).

La Marca et al. (2006) estudaram os níveis séricos deste hormônio em 20 mulheres com uma média de idade de 22 anos, durante um ciclo menstrual normal. Observaram que os valores de AMH se mantinham quase constantes durante o ciclo, com pequenas variações, não estatisticamente significantes. Este achado consolidou o que foi encontrado por Fanchin et al. (2005) e Fleming et al. (2015), em revisão sistemática, sugerindo a possibilidade de se obterem amostra do AMH para avaliação da reserva ovariana em qualquer dia do ciclo.

Kissel et al. (2014) analisaram a variabilidade biológica do AMH em ciclos menstruais regulares e anovulatórios de mulheres eumenorreicas. Em estudo de coorte prospectivo com 259 mulheres entre 18 e 44 anos observaram a flutuação dos níveis de AMH intra-ciclo. Concluíram que, apesar de haver diferença de medidas de acordo com o período estudado, não era forte o suficiente para alterar a classificação do nível da reserva ovariana.

Estudo prospectivo com 336 pacientes em ciclo de FIV demonstrou que AMH e idade foram os únicos preditores de nascido vivo em mulheres com mais de 35 anos, enquanto o número de embriões de boa qualidade era o único preditor nas com menos de 35 anos (LEE et al., 2009).

A TABELA 1 resume as principais diferenças entre os testes de reserva ovariana FSH basal e AMH.

TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE RESERVA OVARIANA FSH BASAL E AMH.

	FSH BASAL	AMH
Local de secreção	Adenohipófise	Células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais pequenos
Indicador de reserva ovariana na linha temporal	Tardia	Precoce
Momento da coleta	2° ao 4° dia do ciclo	Qualquer dia do ciclo
Necessidade de outra dosagem concomitante	Estradiol basal	Nenhuma
Variabilidade entre ciclos	Alta	Baixa
Sensibilidade para alta resposta (risco de Síndrome de hiperestimulo ovariano)	Nenhuma	Alta
Sensibilidade para baixa resposta ao estímulo	Moderada	Moderada
Especificidade para alta resposta	Nenhuma	Alta
Especificidade para baixa resposta	Alta	Alta
Metodologia	Automatizada (1h)	ELISA (6h)
Custo	Baixo	Alto

FONTE: Adaptado de TONER; SEIFER (2013).

Revisão sistemática de 20 trabalhos com 2.392 pacientes, concluiu que o AMH foi o melhor marcador da resposta ovariana em ciclos estimulados para tratamento de reprodução assistida, quando comparado à volume ovariano, FSH, estradiol, inbina B e idade. Os valores de corte do AMH em predizer más respondedoras variaram de 0,1 ng/mL a 1,26 ng/mL (LA MARCA et al., 2010).

Toner e Seifer (2013) descreveram que níveis séricos de AMH entre 0,2 e 0,7 ng/mL geralmente resultaram na obtenção de 3 ou menos folículos em ciclos de FIV. Também reforçaram que qualquer valor abaixo de 1,0 ng/mL resultou em número limitado de oócitos em qualquer tratamento de reprodução assistida, indicando abrir uma discussão com a paciente sobre a janela de oportunidade para conceber diminuída.

Estudo randomizado com 348 mulheres submetidas a ciclo de FIV onde se comparou os métodos de análise de reserva ovariana AMH e CFA para definição da

dose de FSH no estímulo ovariano controlado mostrou que o número de oócitos captados e embriões foram maiores no grupo onde o marcador era o AMH. Desta forma, este teste seria o mais importante para definir a dose da medicação utilizada no protocolo (LAN et al., 2013).

Broer et al. (2011), em estudo prospectivo de 11 anos com 257 mulheres normo-ovulatórias entre 21 e 46 anos de idade mostraram importante correlação entre AMH como marcador de reserva ovariana e preditor de idade da menopausa. Posteriormente, o AMH foi descrito em revisão sistemática, como sendo o melhor teste de reserva ovariana disponível para uso em estratégias de tratamento de infertilidade. Foi demonstrando que poderia estar indetectável cerca de 5 anos antes da menopausa, indicando esgotamento dos folículos primordiais (BROER et al., 2014; ESHRE, 2015).

Tarasconi et al. (2017) realizaram análise de dados de prontuários de 1.060 pacientes que engravidaram após FIV. Foram constituídos 3 grupos de mulheres de acordo com a idade: abaixo de 33 anos, entre 34-36 anos e mais de 37 anos. Dentro de cada grupo, elas mulheres foram subdivididas de acordo com o AMH sérico entre baixo (<1,60 ng/mL), médio (1,61-5,58 ng/mL) e alto (5,60-35,00 ng/mL). Eles concluíram que, possivelmente, a relação entre os níveis de AMH e resultados do tratamento são independentes da idade e número de oócitos obtidos. Sugeriram ainda que baixos níveis de AMH podem ser reflexos da deficiência folicular na produção do hormônio e, por conseguinte, a presença de oócitos incompetentes. Também compararam a taxa de aborto nas diferentes faixas de AMH sérico. Observaram significativa maior incidência naquelas com mais de 34 anos e AMH <1,6 ng/ ng/mL. Assim, este estudo levanta a hipótese de que a baixa reserva ovariana poderia estar associada com qualidade oocitária ruim como causadora de aborto.

La Marca et al. (2017) analisaram resultados de FIV/ICSI de 578 pacientes e 1.814 blastocistos submetidos à PGS. Estudaram a correlação entre idade da mulher, AMH e número de oócitos maduros com taxa de aneuploidias. Observaram que, independente da idade, o aumento da reserva ovariana de acordo com o AMH estava associado com aumento da taxa de embriões normais. Havendo maior número de oócitos maduros, aumentou a probabilidade de ter pelo menos um embrião normal, sendo que a taxa de euploidia não alterava com esta variável. Sugeriram que o AMH poderia ser marcador não só quantitativo, mas também qualitativo de reserva ovariana.

2.2.3 Avaliação da reserva ovariana pelo CFA

A avaliação ultrassonográfica de volume ovariano e número de folículos antrais se tornou ferramenta importante para mensuração da reserva ovariana já no final da década de 90. Nesta época, já observaram que os folículos antrais, em particular os pequenos (<5 mm), são a expressão anatômica da variável bioquímica do AMH. Assim, surgiram vários trabalhos na literatura utilizando a CFA, menores de 10 mm de diâmetro, para prever a resposta ovariana nos tratamentos de reprodução assistida. Uma metanálise abrangendo 27 estudos comparou o volume ovariano com a contagem dos folículos antrais na predição da reserva ovariana, mostrando que a CFA pode ser considerada como primeira escolha para estimá-la antes de uma fertilização *in vitro* em pacientes más respondedoras ao estímulo ovariano controlado (HENDRIKS et al., 2007).

Jayaprakasan et al. (2010) sugeriram, em estudo prospectivo com 135 mulheres em programação de tratamento de reprodução assistida, que valor de CFA < 10 teria alta sensibilidade e especificidade para prever má resposta ao estímulo (93 e 88%, respectivamente), sendo este o ponto de corte ideal.

Mutlu, Erdem e Erdem (2013) correlacionaram níveis de AMH, FSH basal e CFA de 192 pacientes submetidas a FIV/ ICSI com número de oócitos obtidos e taxas de nascido vivo. Descreveram que o melhor parâmetro isolado como preditor de má resposta ovariana ao estímulo era CFA. O ponto de corte para resposta ovariana considerada normal foi de CFA 5,5 (sensibilidade de 89% e especificidade de 87%) e AMH > 0,94 ng/ml (sensibilidade de 71% e especificidade de 85%). Quando a paciente apresentava dados abaixo destes valores a probabilidade de sucesso gestacional foi de 5,6%, aproximadamente 5,4 vezes abaixo do encontrado no grupo com pelo menos um dos dados dentro da normalidade, independentemente da idade. Nestas situações, as pacientes apresentavam menos de 40 anos.

Entretanto, para se considerar o CFA como ferramenta de avaliação de reserva ovariana, é importante salientar que sofre influência da experiência do observador e da qualidade da imagem obtida. Sugere-se ainda, que a reprodutibilidade inter e intra-observador seja analisada com cautela ao se considerar esta uma medida quantitativa de reserva ovariana (JAYAPRAKASAN et al., 2007). Além disso, pode apresentar grande variabilidade inter-ciclo e em mulheres com sobrepeso e obesidade, bem como

redução no seu valor quando ela estiver em uso de anticoncepcional (FLEMING et al., 2015).

Todos os marcadores de reserva ovariana têm suas limitações e devem ser analisados com cuidado. Certamente têm seu valor prognóstico em tratamentos de reprodução assistida. O Índice Preditor de Resposta Ovariana (ORPI), por exemplo, é um teste que engloba níveis de AMH, CFA e idade da paciente. Descrito inicialmente em 2012 por OLIVEIRA et al, pode ser usado como ferramenta muito útil na definição de dose de gonadotrofinas no estímulo ovariano.

Entretanto, apresentar teste de reserva ovariana anormal não deveria afastar ou indicar um determinado tratamento, nem tampouco excluir a possibilidade de gravidez. Mas pode ser um guia em busca na melhor opção terapêutica da infertilidade (ASRM, 2015).

2.3 QUALIDADE OOCITÁRIA

A qualidade dos oócitos é muito importante nos tratamentos de FIV/ ICSI visto que está relacionada diretamente à normalidade do desenvolvimento embrionário e ao potencial de implantação. Defeitos nessas células podem levar a consequências como ausência de fertilização, bloqueio na clivagem, falha de implantação ou aborto espontâneo (SERHAL et al., 1997; EBNER et al., 2003).

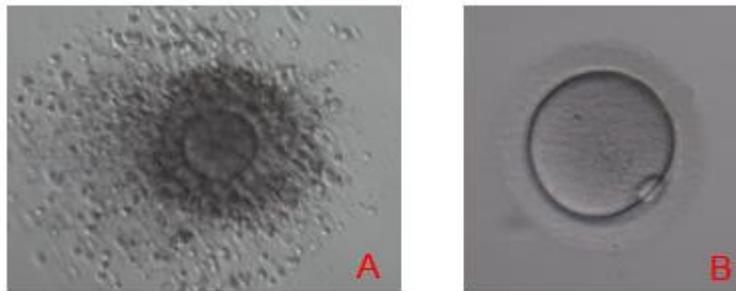
Diferentes marcadores de maturação nuclear e citoplasmática têm sido avaliados na tentativa de se prever a qualidade oocitária. Como principal marcador de maturação nuclear, tem-se análise da morfologia do fuso meiótico e ocorrência da extrusão do segundo corpúsculo polar. Para análise da maturidade citoplasmática destacam-se a redistribuição e remodelamento de organelas. Esta avaliação pode ser invasiva ou não, sendo o estudo da morfologia oocitária técnica inócua e prática com grande aplicabilidade. Entretanto, esta noção de que a qualidade oocitária pode ser deduzida pela morfologia é controversa (SERHAL et al., 1997; EBNER; MOSER; TEWS, 2006; BRAGA et al., 2013).

Dal Canto et al. (2017) avaliaram a associação entre dismorfismo citoplasmático oocitário e alterações cromossômicas do gameta. Foram classificados 170 oócitos maduros quanto a apresentação de granulação citoplasmática, agregados de retículo endoplasmático ou citoplasma normal. Após fixação, foram analisadas as características do *spindle* e o arranjo cromossômico. Esta é uma técnica de avaliação

de qualidade oocitária invasiva que inutiliza o oócito após sua fixação. Como resultado, observaram que os oócitos com as alterações citoplasmáticas citadas apresentavam significativa maior proporção de anormalidade de citoesqueleto e número de cromossomos. A importância deste estudo está na confirmação de que a avaliação morfológica dos oócitos, técnica simples e inócua, apresenta fidelidade com parâmetros de qualidade oocitária.

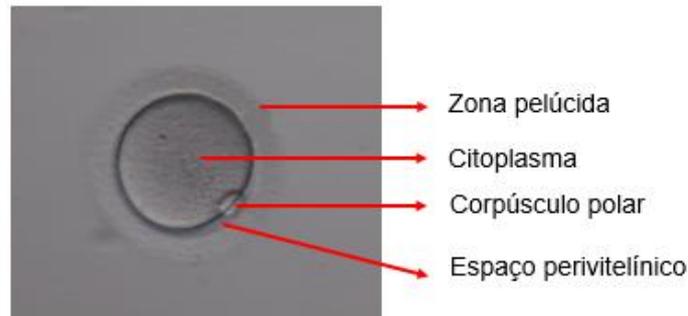
Para avaliação do oócito é necessária denudação com retirada do *cumulus oophorus* e das células da corona radiata. Após isso, consegue-se definir a maturidade oocitária com a identificação do primeiro corpúsculo polar e a morfologia oocitária analisando as características da zona pelúcida, do espaço perivitelínico e do citoplasma (DONADIO et al., 2012; ESHRE, 2017). A FIGURA 4 mostra um oócito antes e depois do processo de denudação.

FIGURA 4 - OÓCITO MADURO COM O *CUMULUS OOPHORUS* (A) E APÓS A SUA REMOÇÃO PELO PROCESSO DE DENUDAÇÃO (B).



Um oócito considerado com boa morfologia tem forma arredondada, único corpúsculo polar intacto, zona pelúcida clara e de espessura adequada, espaço perivitelínico pequeno, citoplasma homogêneo, transparente e sem granulações ou inclusões (ESHRE, 2017), conforme demonstrado na FIGURA 5.

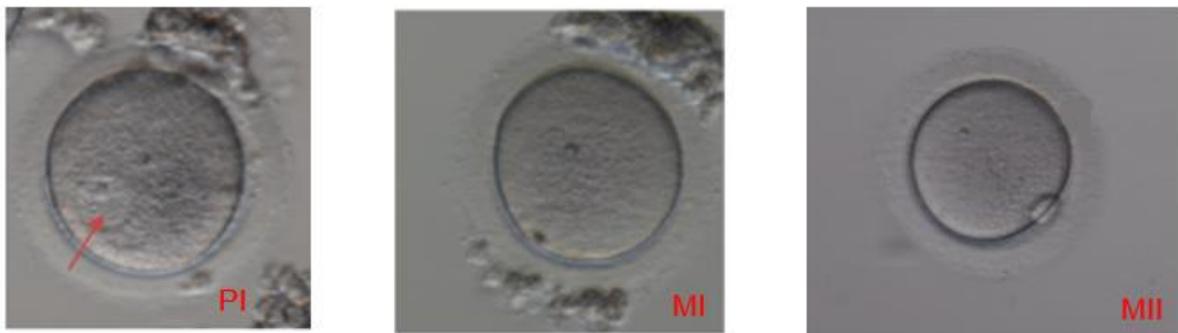
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO OÓCITO HUMANO MADURO



No estágio que precede a maturação, o oócito tem um núcleo relativamente grande, chamado de vesícula germinativa, que possui um arranjo cromossômico diploide (46 cromossomos). Nesta fase é chamado de oócito imaturo ou PI. Sob estimulação hormonal pelo LH *in vivo*, a meiose é reiniciada e a estrutura do núcleo é alterada. Ainda é considerado imaturo, mas denominado MI. A membrana nuclear desaparece, os cromossomos migram para a periferia e ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar, que contém metade dos cromossomos (23). O ciclo meiótico é bloqueado e o oócito permanece em metáfase II. Nesta fase, o oócito é classificado como maduro ou simplesmente MII. Este processo é denominado maturação nuclear do oócito (ALBUQUERQUE et al., 2012).

A FIGURA 6 mostra imagens de oócitos nos estágios de maturidade nuclear PI, MI e MII.

FIGURA 6 - IMAGENS DE OÓCITOS IMATUROS (PI E MI) E MADURO (MII). A SETA REPRESENTA A VESÍCULA GERMINATIVA.



A formação do primeiro corpúsculo polar é fator prognóstico e revela que o gameta teve maturação nuclear completa, isto é, mostra um conjunto haploide de cromossomos (DONADIO et al., 2012).

O número de oócitos com anormalidades aumenta em mulheres acima de 40 anos, o que pode estar relacionado com mais alterações cromossômicas e contribuir com a formação de embriões aneuploides (LASIENÉ et al., 2009).

As alterações da morfologia oocitária podem ser classificadas em 2 tipos básicos: citoplasmáticas e extracitoplasmáticas. A presença de inclusões citoplasmáticas pode significar imaturidade citoplasmática, que influenciaria na fertilização e desenvolvimento embrionário. Na literatura ainda não existe uma padronização em se definir e conceituar as granulações citoplasmáticas sendo nomeadas em granulações, granulações centrais, granulações homogêneas ou granulações heterogêneas, o que torna difícil uma avaliação dos dados. Em relação às inclusões citoplasmáticas (vacúolos, corpos refráteis e agregados do retículo endoplasmático) os dados também são pouco claros. Foi descrito que presença de inclusões citoplasmáticas, citoplasma escuro, com fragmentos ou vacúolos interfere negativamente na taxa de fertilização, gerando também embriões de pior qualidade e conseqüentemente menor taxa de gravidez (XIA, 1997; LOUTRADIS et al., 1999).

Serhal et al. (1997), estudaram a correlação entre alteração citoplasmática oocitária e resultados de ciclos de ICSI em 106 pacientes com um total de 982 oócitos analisados. Encontraram um total de 85% em estágio de metáfase II. Destes, 64% tinham citoplasma normal, 19% granulação excessiva e 17% inclusões citoplasmáticas, vacúolos ou corpos refráteis. Não houve diferença estatística na taxa de fertilização entre os oócitos com citoplasma normal e alterado. Porém, a clivagem embrionária e taxa de gravidez foi diferente entre os grupos. Enquanto 24% das pacientes com oócitos normais engravidaram, apenas 3% das com oócitos apresentando alguma alteração citoplasmática teve resultado positivo.

Mikkelsen e Lindenberg (2001), em estudo retrospectivo onde se comparou a qualidade oocitária de mulheres com e sem síndrome de ovários policísticos, num total de 264 oócitos analisados, mostraram que a presença de anormalidades citoplasmáticas estava associada com menores taxa de clivagem embionária e número de embriões de boa qualidade. Relataram ainda que alterações do espaço perivitelínico poderiam estar relacionadas a excitose prematura dos grânulos corticais, sugerindo citoplasma pós-maduro no momento da ICSI.

Balaban e Urman (2006), sugeriram que as alterações extracitoplasmáticas poderiam ser consideradas apenas como variações resultantes da heterogeneidade dos oócitos. Já as alterações citoplasmáticas como granulações e vacúolos deveriam ser consideradas como critérios de viabilidade do oócito.

Posteriormente, Balaban et al. (2008), em estudo com 5.292 embriões, correlacionaram a taxa de sobrevivência embrionária ao congelamento de acordo com a qualidade oocitária. Analisaram as anormalidades extracitoplasmáticas de forma agrupada e observaram que a presença dessas não interferia no desenvolvimento embrionário. Demonstraram que a sobrevivência do embrião após o congelamento/descongelamento e seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto não era afetada se fosse originado de oócito com uma única alteração extracitoplasmática. Porém, embriões derivados de oócitos com vacúolos no citoplasma ou granulação central não tinham potencial de desenvolvimento a blastocistos de boa qualidade. Sugeriram que estas anormalidades citoplasmáticas poderiam ser reflexo de alterações genéticas, epigenéticas ou defeitos de metabolismo do oócito.

Setti et al. (2011), descreveram em metanálise compreendendo 14 estudos num total de 3.688 ciclos de ICSI que a probabilidade de fertilização é significativamente reduzida pela presença de corpúsculo polar grande, espaço perivitelínico aumentado, corpos refráteis ou vacúolos. Outras alterações na morfologia oocitária não demonstraram diferenças nos resultados de ICSI.

2.3.1 Dose de gonadotrofinas e qualidade oocitária

O impacto do protocolo de estimulação ovariana em resultados de FIV e ICSI é discutido na literatura (SETTI et al., 2011). Em revisão com uma série de casos de tratamentos de reprodução assistida com mais de 650.000 pacientes, Baker et al. (2015), concluíram que a dose de gonadotrofina utilizada apresentou correlação negativa com taxa de nascido vivo, independente da causa da infertilidade em mulheres com até 35 anos. Entretanto, esta relação não ficou evidente acima desta idade ou nos casos de baixa resposta (1-5 oócitos captados). Com isso, foi sugerido que doses diárias acima de 300 UI de gonadotrofinas, ou um total de 3000 UI ao longo

do estímulo ovariano, não seriam recomendadas para mulheres jovens ou com reserva ovariana normal. Porém ressaltaram que, neste estudo, não foram analisados dados de AMH ou CFA das pacientes, por se tratar de uma série de casos ocorridos entre 2004 e 2012, onde FSH basal era o determinante da dose de medicação utilizada no estímulo ovariano.

Bosch et al. (2016), em artigo de revisão, mostraram o efeito adverso dose-dependente do FSH neste tipo de tratamento em animais relacionado a oócitos e embriões de baixa qualidade. Porém, em humanos, concluíram que as pesquisas são limitadas e pouco conclusivas. Quando comparados ciclos naturais com estimulados, não houve diferença entre clivagem embrionária e taxa de aneuploidia oocitária ou embrionária. Quanto às diferentes doses utilizadas no estímulo ovariano, descreveram estudos com resultados semelhantes. Do ponto de vista quantitativo, sugeriram que, caso haja piora no resultado reprodutivo com altas doses de FSH utilizadas, seja devido ao recrutamento de oócitos de má qualidade e não consequência da medicação em si.

3 OBJETIVOS

- ❖ Verificar a existência de associação entre reserva ovariana pelos métodos de avaliação FSH basal, AMH e CFA com qualidade oocitária de acordo com maturidade e morfologia em mulheres com até 35 anos submetidas à EOC.

- ❖ Verificar a existência de associação entre dose de FSH/HMG usada na EOC em mulheres com até 35 anos e qualidade oocitária, de acordo com maturidade e morfologia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Foi realizado um estudo retrospectivo com análise de dados de prontuários de pacientes inférteis submetidas a EOC para fertilização *in vitro* com oócitos próprios pela técnica de ICSI na Androlab – Clínica e Laboratório de Reprodução Humana e Andrologia (Curitiba/PR - Brasil), entre maio de 2012 e junho de 2016, e elaborado no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Foram incluídas no trabalho pacientes entre 18 e 35 anos e como critérios clínicos de exclusão os seguintes fatores confundidores da análise de reserva ovariana: uso de anticoncepcional hormonal ou terapia de reposição hormonal nos últimos 30 dias da avaliação da reserva ovariana, histórico de radioterapia pélvica ou quimioterapia, ooforectomia e/ou ooforoplastia, endocrinopatias (síndrome de ovários policísticos, hiperprolactinemia, hipopituitarismo), doenças auto-imunes, doenças genéticas identificadas pela clínica sendo confirmados por cariótipo da paciente. Casos que apresentavam dados incompletos no prontuário como falta de resultados de exames foram excluídas da análise.

As pacientes foram classificadas com reserva ovariana normal quando FSH basal < 10 mIU/mL, AMH $\geq 1,2$ ng/mL ou CFA ≥ 10 . Aquelas com valores acima para FSH basal e abaixo dos descritos para AMH e CFA eram consideradas com reserva ovariana baixa.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sob o número CAAE 51021715.9.0000.0096 (ANEXO 1) e as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE1).

4.2 AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA

A avaliação da reserva ovariana foi realizada através da dosagem de FSH basal, AMH e CFA.

4.2.1 Dosagem sérica de FSH basal

A amostra de sangue utilizada para a dosagem sérica de FSH basal foi coletada por acesso venoso no 2º ou 3º dias do ciclo menstrual, centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos para separação do soro e a dosagem processada no mesmo dia. A análise foi feita por quimioluminescência automatizada pelo mesmo laboratório com o equipamento Immulite 2000, Siemens®, sendo os resultados apresentados em mIU/mL e o limite máximo de detecção 170 mIU/mL.

4.2.2 Dosagem sérica de AMH

A amostra de sangue para a dosagem sérica de AMH foi realizada em qualquer fase do ciclo menstrual da paciente, sendo coletada por acesso venoso, centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos e o soro armazenado congelado a -20°C até a realização da análise. A medida foi feita por enzimaímunensaio AMH Gen II ELISA Beckman Coulter® no mesmo laboratório sendo os resultados apresentados em ng/mL. O limite de detecção foi de 0,01 ng/mL com coeficiente de variação inter e intra-ensaio de 5,4% e 5,6% respectivamente.

4.2.3 Contagem de Folículos Antrais

Foram coletadas anotações de prontuário de contagem de folículos antrais onde que todas as medidas foram feitas pelo mesmo observador (V.M.S.N.), sendo utilizado o aparelho de ultrassonografia Toshiba, Nemio Istyle®, Japan, com o transdutor endovaginal de 7,5 MHz.

Como protocolo descrito pelo serviço, foram considerados folículos antrais aqueles visibilizados e medidos com tamanho entre 2-8 mm por ultrassonografia transvaginal no 2º ou 3º dia da menstruação, sendo a CFA a somatória dos folículos encontrados nos dois ovários.

4.3 PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA

As pacientes incluídas no estudo foram submetidas a protocolo de indução de ovulação com gonadotrofinas (FSH – Folitrofina beta, Puregon®, Organon, Ravensburg, Alemanha; Alfafolitropina, Gonal®, Merck Serono, Bari, Itália; Urofolitrofina Humana, Fostimon®, UCB, Lamone, Suíça; e/ou HMG – Menotropina, Menopur®, Ferring, Kiel, Alemanha) em dose individualizada conforme protocolo da instituição de acordo com idade, reserva ovariana e quantidade de oócitos pretendida, variando de 150 a 300 UI/dia. A dose de FSH diário de 150 UI era usada pelas mulheres sem desejo de congelamento de oócitos e/ou embriões excedentes ou quando tinham risco de síndrome de hiperestímulo ovariano. As pacientes com reserva ovariana normal para a idade usavam a dose de FSH diário de 225 UI. Quando tinham histórico de má resposta a estímulo anterior e/ou diagnóstico de baixa reserva ovariana (FSH basal ≥ 10 mIU/mL, AMH $< 1,2$ ng/mL e/ou CFA < 10), utilizava a dose de FSH diário de 300 UI. A partir do 6º dia de estímulo ovariano, o FSH era substituído pelo uso de HMG na mesma dose. No levantamento dos dados foi considerado dose de FSH/ HMG utilizada no tratamento a somatória destes medicamentos durante todo o período do estímulo em unidades internacionais (UI).

Foi feito controle ultrassonográfico seriado e o bloqueio ovariano com antagonista do GnRH, acetato de ganirelix 0,25mg/dia (Orgalutran®, Organon), iniciado quando visualizados mais de dois folículos ≥ 14 mm. A captação oocitária foi realizada via vaginal guiada por ultrassonografia com a paciente sob sedação após 35-36 horas do uso de hCG urinário 5.000 UI (Choriomon®, UCB, Lamone, Suíça) ou recombinante (Ovidrel®, Merck Serono, Bari, Itália), tendo este sido aplicado quando observado três ou mais folículos maiores que 18 mm.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS OÓCITOS

Para análise dos oócitos, seguia-se no serviço o protocolo onde o líquido folicular era colhido em tubos de ensaio e depositado sobre uma placa 100x100mm (Falcon®) para, assim, o complexo oócito-corona-cúmulus ser identificado sob visão

do microscópio estereoscópico (modelo SMZ800, NIKON®) no aumento de 1x, com uma platina de aquecimento a 37°C. Os oócitos encontrados eram separados, com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril de vidro (Origio®), do conteúdo folicular e acondicionados em uma placa de 4 poços (Nunc®) contendo 2 mL de meio para manipulação de gametas MHM (*Multipurpose Handling Medium*, IrvineScientific®) na parte externa onde os oócitos foram lavados primeiramente e 0,5 mL de MHM suplementado 15% com SSS (*Serum Substitute Supplement*, IrvineScientific®) na parte interna coberto com 0,5 mL de óleo mineral (*Light Mineral Oil*, IrvineScientific®) onde os oócitos eram deixados até o final da aspiração folicular (REDLARA, 2006).

Ao fim da captação, os oócitos encontrados passavam pelo processo de desnudação química. Este procedimento era realizado com a solução de enzima hialuronidase a 80% (IrvineScientific®) que teve por finalidade auxiliar na separação das células da granulosa do oócito. Em uma placa plana grande eram feitas 2 gotas de 25mL de hialuronidase no centro e de 4 a 8 gotas de cerca de 500µL de MHM 15%. A quantidade de gotas dependeu da quantidade de oócitos: 4 gotas para até 10 oócitos e 1 gota a mais para cada 5 oócitos. Com a pipeta estéril, os oócitos foram passados nas 2 gotas de solução de hialuronidase por 15 segundos em cada, sugando e expelindo-os com delicadeza, e imediatamente após, foram lavados em meio MHM suplementado 15% para total retirada da enzima. Os oócitos foram incubados a 37°C com 8% de CO₂ por 1 hora em placa contendo 1mL de meio de cultura CSC (*Continuous Single Culture*, IrvineScientific®) 15% suplementado com SSS coberto com 1mL de óleo mineral. A segunda etapa da desnudação, agora mecânica, era realizada com um capilar de 135 µm de diâmetro acoplado a pipetadora *Stripper* (Origio®), finalizando a limpeza do oócito, sugando e expelindo cada um com a pipeta, cuidadosamente, para não os danificar e separando-os totalmente das células do cumulus (REDLARA, 2006).

Os oócitos eram então incubados por mais 3 horas em meio de cultura CSC suplementado com 15% de SSS coberto com 1mL de óleo mineral até a ICSI. Imediatamente antes do momento da ICSI rotineiramente foram realizadas imagens fotográficas dos oócitos com a utilização do microscópio invertido (Nikon Eclipse TI-S®), sob aumento de 200x para analisar o citoplasma e verificar a maturação oocitária nuclear (REDLARA, 2006).

Foram analisadas imagens arquivadas de todos os oócitos por uma mesma embriologista (K.F.D.T.) e a classificação da qualidade oocitária foi feita de acordo com a maturidade e morfologia. Os oócitos PI e MI foram considerados imaturos e os MII maduros. Quanto à morfologia, identificou-se presença ou não de alterações na forma, zona pelúcida, citoplasma e espaço perivitelínico. Alterações no corpúsculo polar foram identificadas como sendo do espaço perivitelínico.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

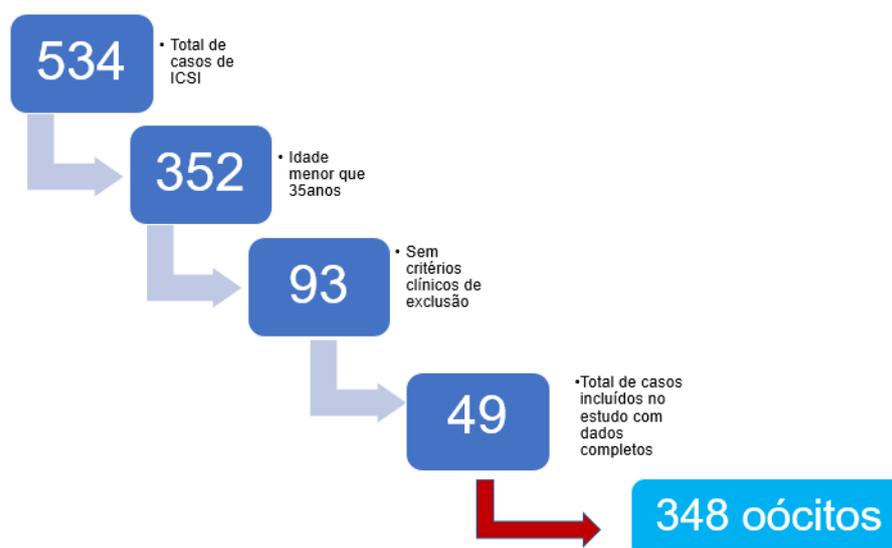
Os resultados das variáveis quantitativas foram descritos por média, mediana e desvio padrão da média. Variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais. Para a comparação entre grupos definidos pelo AMH ($<1,2$ ou $\geq 1,2$ ng/mL), CFA (<10 ou ≥ 10) ou FSH basal (<10 ou ≥ 10 mIU/mL) foi usado o teste t de Student para amostras independentes (idade e dose de FSH/HMG) ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (número de oócitos maduros e FSH basal). Para analisar a correlação entre a dose de FSH/ HMG utilizado e o número de oócitos maduros foram estimados coeficientes de correlação de Spearman. Para avaliação da associação entre variáveis relativas a paciente e variáveis relativas a oócito, considerando-se a estrutura hierárquica dos dados (oócitos dentro de pacientes), foram ajustados modelos univariados de regressão logística multinível, definindo-se oócito como nível 1 e paciente como nível 2. A significância das variáveis foi avaliada pelo teste de Wald e a medida de associação apresentada foi a *odds ratio* (OR) com respectivos intervalos de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata v.14 (Stata Corporation, College Station, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DAS PACIENTES ESTUDADAS

Dos 534 casos de ICSI com oócitos próprios realizadas no período estabelecido, foram incluídas no estudo 49 pacientes totalizando 348 oócitos analisados. Foram excluídas 182 pacientes por terem mais de 35 anos, 259 por critérios clínicos e 44 por dados incompletos no prontuário (FIGURA 7).

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO.



A TABELA 2 representa os dados epidemiológicos avaliados na amostra como características biométricas das pacientes, dosagens hormonais, CFA, dose de FSH/HMG total utilizada durante o estímulo ovariano e classificação oocitária de acordo com a maturidade.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES, DOSAGENS HORMONAIS, CFA, DOSE DE FSH/HMG TOTAL UTILIZADA DURANTE O ESTÍMULO OVARIANO E CLASSIFICAÇÃO OOCITÁRIA DE ACORDO COM A MATURIDADE.

	Média*	Mediana
Idade (anos)	31,1 ± 3,3	31
IMC (Kg/m ²)	23,2 ± 2,5	22,9
Tempo de infertilidade (anos)	2,9 ± 2,3	2
CFA (n)	11,7 ± 6,7	10
FSH basal (mIU/mL)	7,4 ± 2,7	6,5
AMH (ng/mL)	1,9 ± 1,6	1,4
Dose de FSH/HMG (UI)	2245 ± 614	2145
Maturidade oocitária [‡]		
MII	5,5 ± 3,4	5
MI	1,5 ± 1,8	1
PI	0,8 ± 1,3	0

*Os valores representam a média ± desvio padrão da média

[‡]Número de oócitos por paciente

n=49

Em relação à etiologia da infertilidade das pacientes do estudo, a TABELA 3 mostra a distribuição percentual sendo identificado a maioria com fator masculino isoladamente ou não.

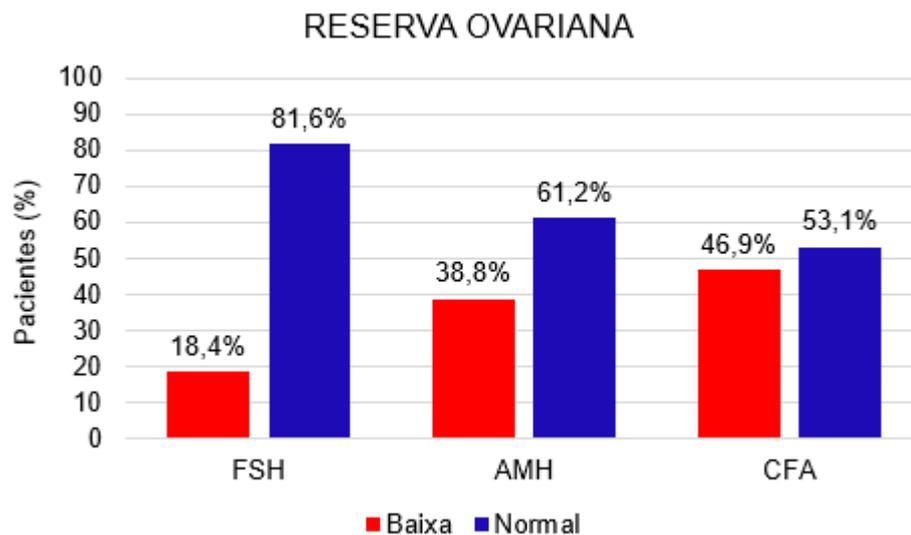
TABELA 3 - ETIOLOGIA DA INFERTILIDADE DAS PACIENTES DO ESTUDO (N=49).

Etiologia da infertilidade	N	%
Masculino	17	34,7
Masculino + Ovulatório	4	8,1
Masculino + Endometriose	1	2,1
Masculino + Tubário + Ovulatório	3	6,1
Homoafetividade	5	10,2
Ovulatório	7	14,3
Endometriose	4	8,2
Tubário	2	4,1
Endometriose + Ovulatório	2	4,0
Ovulatório + Tubário	1	2,1
Sem causa aparente	3	6,1
Total	49	100,0

Quando a reserva ovariana baixa foi definida de acordo com FSH basal ≥ 10 mIU/mL foram identificadas nove pacientes neste grupo, correspondendo a 18,4% do total. Quando a classificação foi por apresentar AMH $<1,2$ ng/mL, foram 19 pacientes (38,8%). Ao considerar CFA como marcador de baixa reserva ovariana, 23 pacientes (46,9%) pertenciam a este grupo.

Pode-se observar a diferente distribuição em grupos de acordo com a reserva ovariana em normal ou baixa de acordo com FSH basal, AMH ou CFA no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS PACIENTES EM GRUPOS DE ACORDO COM A RESERVA OVARIANA EM NORMAL OU BAIXA* DE ACORDO COM FSH BASAL, CFA OU AMH.



*Valores de normalidade para FSH basal <10 mIU/mL, AMH $\geq 1,2$ ng/mL e CFA ≥ 10 . N=49.

5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM O FSH BASAL E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE

Com o aumento de pouco mais de dois anos na idade da paciente (média de 30,6 para 33 anos), foi evidenciado diferença significativa entre ter FSH basal normal ou não com $p=0,047$ (TABELA 4 e GRÁFICO 2). Além disso, aquelas que tinham FSH basal normal apresentaram uma média maior no número de oócitos maduros comparado às com FSH elevado, sendo 6,2 e 2,4 respectivamente ($p < 0,001$). Não foi

observado diferença estatística entre a dose de FSH/HMG utilizada no estímulo entre os dois grupos de pacientes (GRÁFICO 2).

TABELA 4 - ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM O FSH BASAL.

	FSH [‡]	N	Média [€]	Mediana	Valor de p*
Oócitos MII	≥ 10	9	2,4±1,3	2,0	<0,001
	< 10	40	6,2±3,3	6,0	
Dose de FSH/HMG	≥ 10	9	2022±564	2250	0,231
	< 10	40	2296±621	2123	
Idade	≥ 10	9	33,0±2,5	34,0	0,047
	< 10	40	30,6±3,3	31,0	

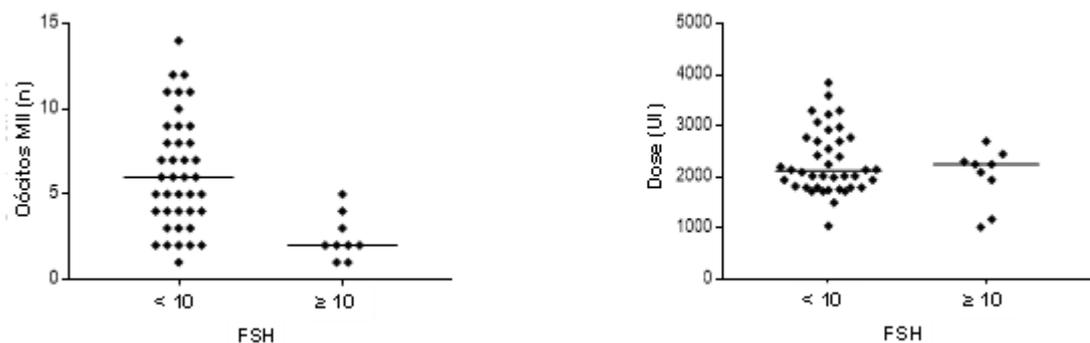
*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney para número de oócitos MII e FSH; teste t de Student para idade e dose de FSH/HMG.

€ os números representam a média ± desvio padrão da média do número de oócitos MII, dose de FSH/HMG utilizada em UI e idade em anos.

‡ Valor em mIU/mL.

n=49

GRÁFICO 2 - RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM O FSH BASAL. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (n=49).



5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM O AMH E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE

Quando a reserva ovariana das pacientes foi classificada em normal e baixa de acordo com o AMH, foi observado diferença estatística no número de oócitos MII

obtidos sendo maior no grupo com reserva ovariana normal ($p < 0,001$). A média do FSH basal destas pacientes foi menor, assim como a idade, com $p < 0,001$ (TABELA 5 e GRÁFICO 3). Não houve diferença estatística entre a média de dose de FSH/ HMG utilizada pelas pacientes no estímulo ovariano entre os dois grupos (GRÁFICO 4).

TABELA 5 - ANÁLISE DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH BASAL E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM O AMH.

	AMH [‡]	N	Média [€]	Mediana	Valor de p [*]
Oócitos MII	< 1,2	19	3,3±1,9	3,0	<0,001
	≥ 1,2	30	7,0±3,3	6,5	
Dose de FSH/HMG	< 1,2	19	2421±677	2300	0,112
	≥ 1,2	30	2134±554	2025	
FSH	< 1,2	19	8,8±2,4	8,9	<0,001
	≥ 1,2	30	6,5±2,6	5,8	
Idade	< 1,2	19	33,3±1,9	34,0	<0,001
	≥ 1,2	30	29,6±3,2	31,0	

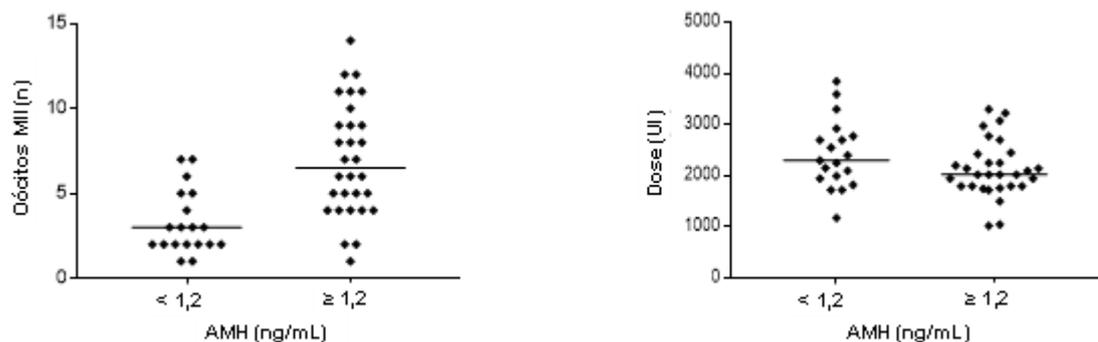
*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney para número de oócitos MII e FSH; teste t de Student para idade e dose de FSH/HMG.

€ os números representam a média ± desvio padrão da média do número de oócitos MII, dose de FSH/HMG utilizada em UI, FSH basal sérico em mIU/mL e idade em anos.

‡ Valor em ng/mL.

n= 49

GRÁFICO 3. RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM O AMH. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (n=49).



5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DE ACORDO COM A CFA E OUTRAS VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE

Quando o nível de reserva ovariana foi definido de acordo com a CFA, observou-se maior quantidade de oócitos MII obtidos e menor média de FSH basal no grupo com reserva ovariana normal (TABELA 6 e GRÁFICO 4). Não houve diferença estatística na média de dose de FSH/ HMG utilizada pelas pacientes entre os dois grupos (GRÁFICO 4).

TABELA 6 - ANÁLISE DESCRITIVA DO NÚMERO DE OÓCITOS MII, DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO, DOSAGENS SÉRICAS DE FSH E IDADE DA PACIENTE DE ACORDO COM A CFA.

	CFA [¥]	N	Média [€]	Mediana	Valor de p*
Oócitos MII	< 10	23	3,4±2,3	2	
	≥ 10	26	7,4±3,0	7	<0,001
Dose de FSH/HMG	< 10	23	2192±597	2100	
	≥ 10	26	2293±638	2145	0,571
FSH	< 10	23	8,5±3,3	8,2	
	≥ 10	26	6,4±1,6	6,0	0,021
Idade	< 10	23	32,5±2,6	33	
	≥ 10	26	29,8±3,3	31	0,002

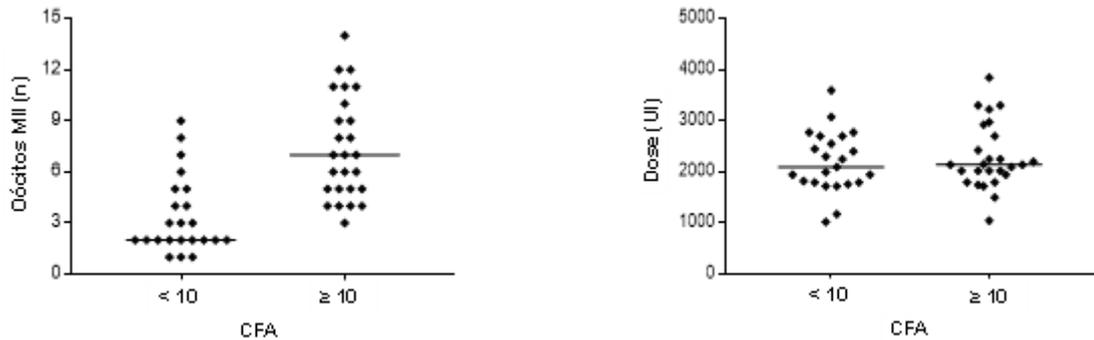
*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney para número de oócitos MII e FSH; teste t de Student para idade e dose de FSH/HMG.

€ os números representam a média ± desvio padrão da média do número de oócitos MII, dose de FSH/HMG utilizada em UI, FSH basal sérico em mIU/mL e idade em anos.

¥ CFA = contagem de folículos antrais, n.

n=49

GRÁFICO 4. RESULTADOS DE NÚMERO DE OÓCITOS MII E DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO DE ACORDO COM A CFA. A LINHA CORRESPONDE AO VALOR DA MEDIANA (n=49).



5.5 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE DOSE DE FSH/HMG UTILIZADA NO ESTÍMULO OVARIANO E NÚMERO DE OÓCITOS MII.

Na TABELA 7 são apresentados os valores estimados dos coeficientes de correlação de Spearman entre dose de FSH/HMG utilizada no estímulo ovariano e número de oócitos MII obtidos considerando-se todas as pacientes e restringindo-se a pacientes com AMH < 1,2 ng/mL, com AMH ≥ 1,2 ng/mL, CFA < 10, CFA ≥ 10, FSH < 10 mIU/mL e FSH ≥ 10 mIU/mL. Não houve diferença entre a dose total de FSH/HMG utilizada no tratamento subdividindo as pacientes de acordo com os parâmetros de reserva ovariana.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE DOSE E NÚMERO DE OÓCITOS MII DE ACORDO COM O PARÂMETRO DE RESERVA OVARIANA UTILIZADO*.

	N	Coeficiente de correlação de Spearman	Valor de p
Todas as pacientes	49	0,07	0,611
FSH < 10	40	0,02	0,885
FSH ≥ 10	09	0,41	0,275
AMH < 1,2	19	0,38	0,104
AMH ≥ 1,2	30	0,18	0,337
CFA < 10	23	0,08	0,725
CFA ≥ 10	26	0,08	0,696

*Valores de AMH em ng/mL, FSH em mIU/mL e CFA em número. N=49

5.6 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A RESERVA OVARIANA DA PACIENTE E QUALIDADE OOCITÁRIA

De acordo com a TABELA 8, o valor baixo de AMH apresentou associação significativa com a probabilidade de ter oócito imaturo (OR 3,3; IC 1,2-8,8; $p= 0,017$). Quando a reserva ovariana da paciente foi classificada pelo FSH basal, a OR estimada foi de 4,4 (IC 1,2-15,5; $p= 0,023$) indicando que a chance de uma paciente com FSH ≥ 10 mIU/mL ter oócito imaturo é igual 4,4 vezes a chance de uma paciente com FSH < 10 mIU/mL. A elevação de cada unidade a mais de FSH basal houve um acréscimo de 23% de chance de ela ter oócito imaturo (OR 1,23; IC 1,0-1,5; $p= 0,040$).

Quando a paciente apresentou reserva ovariana baixa de acordo com a CFA foi observado aumento no risco de ter oócitos de forma anormal (OR 2,9; IC 1,1-7,6; $p= 0,035$).

Considerando a reserva baixa pelo AMH, o risco de apresentar oócitos com alteração no espaço perivitelínico foi significativamente maior (OR 3,0; IC 1,2-7,6; $p= 0,018$). Resultado semelhante foi encontrado em relação a presença de alteração citoplasmática oocitária, sendo 5,3 vezes maior neste grupo comparado ao com reserva ovariana normal (OR 5,3; IC 1,7-16,7; $p= 0,004$).

Não foi observado relação significativa entre a presença de alteração na zona pelúcida e as variáveis de reserva ovariana estudadas.

A variação na idade da paciente não apresentou associação significativa com os parâmetros de qualidade oocitária utilizados.

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS RELATIVAS À PACIENTE E QUALIDADE OOCITÁRIA.

	Variável	OR	IC 95%	Valor de p*
Oócito imaturo	Idade	1,1	0,9 – 1,3	0,151
	FSH	1,2	1,1 – 1,5	0,040
	AMH <1,2	3,3	1,2 – 8,8	0,017
	CFA <10	1,2	0,4 – 3,5	0,704
	FSH ≥10	4,4	1,2–15,5	0,023
	Dose FSH/HMG **	0,8	0,5 – 1,2	0,329
	Forma anormal	Idade	1,1	0,9 –1,3
FSH		1,1	0,9 –1,4	0,281
AMH <1,2		2,3	0,8 –6,8	0,127
CFA <10		2,9	1,1 –7,6	0,035
FSH ≥10		1,5	0,3 –6,6	0,625
Dose FSH/HMG **		0,9	0,6 –1,4	0,770
Zona pelúcida anormal		Idade	1,1	0,7 –1,6
	FSH	1,4	0,8 –2,4	0,282
	AMH <1,2	2,4	0,2–33,6	0,517
	CFA <10	1,3	0,1–16,7	0,830
	FSH ≥10	2,0	0,1–69,2	0,703
	Dose FSH/HMG **	2,1	0,7 –6,3	0,193
	Espaço perivitelinico anormal	Idade	1,1	1,0 –1,3
FSH		1,1	0,9 –1,3	0,340
AMH <1,2		3,0	1,2 –7,6	0,018
CFA <10		1,9	0,8 –4,9	0,160
FSH ≥10		1,1	0,3 –4,3	0,831
Dose FSH/HMG **		1,0	0,7 –1,4	0,978
Citoplasma anormal		Idade	1,1	0,9 –1,4
	FSH	1,4	1,1 –1,8	0,006
	AMH <1,2	5,3	1,7–16,7	0,004
	CFA <10	2,1	0,6 –7,1	0,224
	FSH ≥10	3,3	0,6–16,7	0,150
	Dose FSH/HMG **	1,5	0,9 –2,4	0,110

*Modelo de Regressão Logística Multinível, $p < 0,05$. FSH: hormônio folículo estimulante; AMH: hormônio anti-mulleriano; CFA: contagem de folículos antrais; HMG: gonadotrofina menopáusica humana.

**A cada 500 UI.

***Os dados apresentados estão em mIU/mL para FSH basal, ng/mL para AMH, em anos para idade, em número para CFA e em UI para dose de FSH/HMG utilizada.

n=49

5.7 MORFOLOGIA OOCITÁRIA: FREQUÊNCIA DE NORMALIDADE E IMAGENS DE OÓCITOS ALTERADOS

Foi identificado pelo menos um tipo de alteração da morfologia em 86,2% dos oócitos. Na TABELA 9 pode ser verificado a quantidade de oócitos normais, bem como o percentual, de acordo com os critérios morfológicos analisados individualmente.

TABELA 9 – NÚMERO DE OÓCITOS NORMAIS DE ACORDO COM A MORFOLOGIA. N= 348

	Oócitos normais (%)	IC 95%
Forma	326 (93,7)	91,1-96,2%
Zona pelúcida	98 (28,2)	23,4-32,9%
Espaço perivitelinico	156 (44,8)	39,6-50,1%
Citoplasma	252 (72,4)	67,7-77,1%

As FIGURAS 8, 9 e 10 mostram algumas das imagens obtidas dos oócitos das pacientes estudadas, sendo que a seta representa uma alteração.

FIGURA 8 - IMAGENS DE OÓCITOS ANORMAIS: ALTERAÇÃO DE CITOPLASMA CORPOS REFRÁTEIS (A), ESPAÇO PERIVITELÍNICO AUMENTADO (B) E FORMA OVALADA (C).

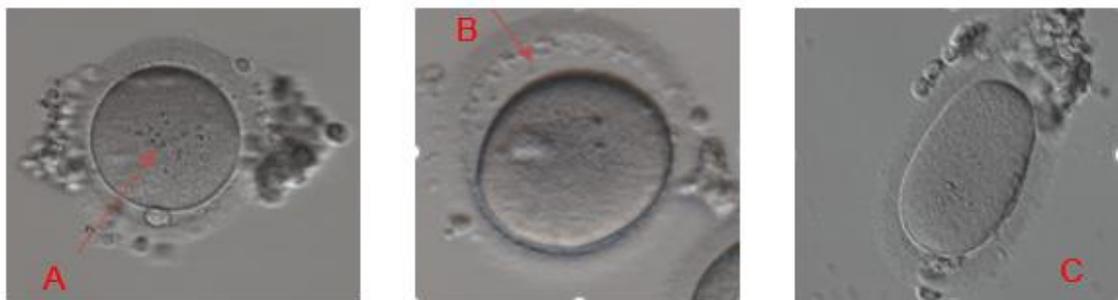


FIGURA 9 - IMAGENS DE OÓCITOS ANORMAIS: ZONA PELÚCIDA ESPESSA(A), CORPÚSCULO POLAR FRAGMENTADO (B) E ESPAÇO PERIVITELÍNICO COM GRANULAÇÕES (C).

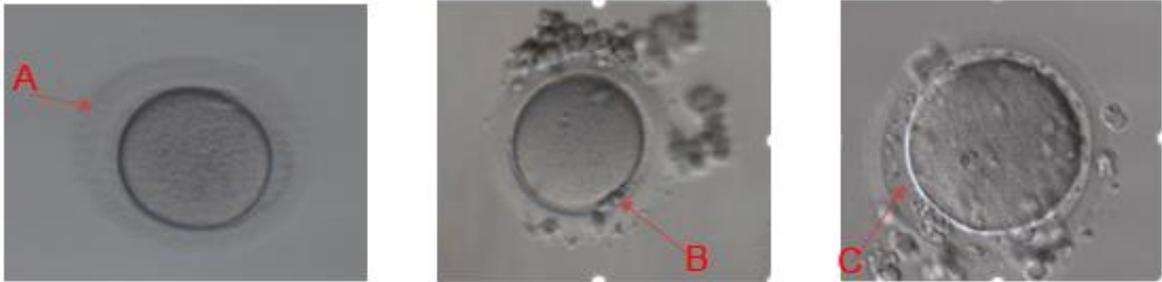
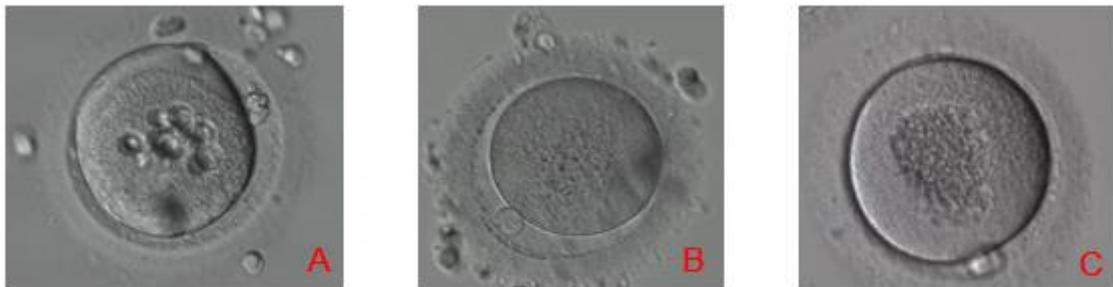


FIGURA 10 - IMAGENS DE OÓCITOS COM ALTERAÇÃO NO CITOPLASMA: VACÚOLOS (A), ALTERAÇÃO NA COLORAÇÃO (B), GRANULAÇÃO CENTRAL ESCURA (C).



6 DISCUSSÃO

Em geral, espera-se que uma mulher jovem apresente oócitos de boa qualidade. Tradicionalmente, quando se oferece uma determinada taxa de sucesso em tratamentos de reprodução assistida estas são as consideradas de melhores resultados (REDLARA, 2012). Porém, este estudo sugere que mulheres com até 35 anos submetidas à EOC possam apresentar qualidade oocitária ruim, através da presença de alteração de morfologia e maturidade, quando apresenta alteração nos parâmetros de reserva ovariana. Assim, é muito importante este tema como pesquisa para auxiliar no melhor prognóstico reprodutivo tanto em tratamentos de reprodução assistida como na programação de gestação natural pelas mulheres.

De acordo com os dados da FIGURA 7, infere-se que 65,9% das pacientes que realizaram ICSI naquele serviço médico no período estudado apresentavam menos de 35 anos. Muitas destas foram excluídas do estudo por critérios clínicos (73,6%), o que é justificado considerando que para análise de reserva ovariana são necessários critérios rigorosos excluindo fatores confundidores como histórico de ooforoplastia/ ooforectomia, doenças endócrinas e síndrome dos ovários policísticos. Noutros casos, infelizmente algumas pacientes não apresentavam no prontuário resultados de exames como o AMH dentre outros importantes para avaliação da reserva ovariana, sendo então excluídas do estudo. Acreditamos que um grande limitador para a realização deste exame foi o econômico, visto que não tinha cobertura pelos convênios de saúde suplementar e não era realizado pela rede pública no Brasil. Porém, acreditamos que com a redução no custo praticado pelos laboratórios a sua realização será mais frequente facilitando novos estudos como este.

Quando as pacientes foram classificadas em apresentar reserva ovariana normal ou baixa de acordo com os testes considerados, foram evidenciados resultados heterogêneos. Apenas nove pacientes (18,4%) foram classificadas com reserva ovariana baixa em relação ao FSH basal (GRÁFICO 1). Esta proporção foi muito diferente quando o parâmetro utilizado foi o AMH (n=19; 38,8%) ou CFA (n=23; 46,9%). Estes achados são diferentes da expectativa de se encontrar até 24% das mulheres com potencial para baixa resposta ao estímulo (ESHRE, 2015). Porém, ressalta-se que no presente estudo as pacientes com alta reserva ovariana, como as com síndrome dos ovários policísticos tão comum em mulheres jovens, foram excluídas da análise neste estudo.

Vários estudos têm demonstrado que FSH basal é marcador tardio de reserva ovariana, o que também pode explicar esta diferença nos resultados encontrados (NIPPITA; BABER, 2007; ESHRE, 2015; AMANVERMEZ; TOSUN, 2016). Foi observado maior quantidade de oócitos imaturos e anormais em mulheres com reserva ovariana baixa de acordo com o AMH mesmo com níveis de FSH normal, demonstrando que este isoladamente pode não ser um bom indicador de qualidade oocitária.

Em artigo do comitê da Associação Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, 2015), foi demonstrado que o FSH basal tem alta especificidade para prever baixa resposta ao estímulo ovariano com obtenção de 2 a 3 folículos para valores maiores que 10 mIU/mL, além de alta sensibilidade para probabilidade de conceber. Nesse sentido, quando elevado sugere que a paciente tem mau prognóstico reprodutivo, mas sem importância clínica quando em níveis normais. Ainda de acordo com o comitê, somente AMH e CFA seriam bons marcadores de reserva ovariana para prever resposta ovariana ao estímulo hormonal bem como gravidez. O ponto de corte para considerar baixa reserva ovariana seria de 10 mIU/mL para FSH, 0,7ng/mL para AMH e 10 para CFA. Porém, segundo os autores, não há consenso na literatura que exista correlação entre estes valores e qualidade oocitária. No presente estudo, utilizando mesmo ponto de corte para FSH basal e CFA, mas mais rigorosos para AMH, evidenciamos que houve diferença na morfologia dos oócitos de acordo com a reserva ovariana em mulheres jovens.

Em artigo de revisão sobre reserva ovariana, Amanvermez e Tosun (2016) descreveram que a combinação de FSH e estradiol basal pode ser usada para *screening* de redução de reserva ovariana, mas que o nível de estradiol isoladamente não deveria ser utilizado como parâmetro de prognóstico reprodutivo. Também indica que AMH e CFA são testes preditores importantes para identificação precoce da diminuição da reserva ovariana antes que chegue a níveis críticos. No nosso estudo, a média de FSH basal para valores de reserva ovariana baixa de acordo com AMH foi de $8,8 \pm 2,4$ mIU/mL ($p < 0,001$), conforme TABELA 5. Este dado chama a atenção, considerando que a piora do resultado reprodutivo é descrita na literatura com FSH basal >10 mIU/mL (SCOTT et al., 1989; TONER et al., 1991; KATZ-JAFFE et al., 2013). Assim, de acordo com os nossos dados, o ponto de corte de FSH basal para definição de baixa reserva ovariana que impacte em alteração oocitária poderia ser menor.

Estima-se que 60 a 80% dos oócitos obtidos após hiperestimulação ovariana em ciclos de FIV/ICSI possam apresentar alguma alteração morfológica e que seria proporcional ao número de oócitos obtidos e à dose hormonal utilizada, talvez também pelo recrutamento de oócitos que seriam naturalmente excluídos (EBNER et al., 2003; COTA et al., 2012). No nosso estudo, 86,6% dos oócitos apresentavam pelo menos uma alteração morfológica dentre as pesquisadas, sendo que 6,3% tinham alteração de forma, 27,6% de citoplasma, 55,2% de espaço perivitelínico e 71,8% de zona pelúcida. Esta proporção elevada de oócitos anormais pode ser decorrente da maior quantidade de mulheres com reserva ovariana baixa no presente estudo comparado à população geral, dado que precisa ser interpretado com cautela.

Foi obtido maior quantidade de oócitos maduros nas pacientes com reserva ovariana normal considerando os três testes utilizados. Este é um achado importante lembrando que o oócito imaturo apresenta conteúdo cromossômico diploide e, portanto, não está apto a ser fertilizado normalmente (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Não houve diferença entre os grupos na dose total utilizada de FSH/HMG durante o estímulo ovariano assim como aumento de risco de alteração da morfologia oocitária considerando esta variável. Desta forma, pode-se pressupor que a quantidade de medicação usada nas pacientes deste estudo não teria impacto significativo na qualidade oocitária, o que poderia confundir a análise.

Broer et al. (2013) descreveram em metanálise de 28 estudos que o maior preditor de gravidez foi a idade. Concluiu ainda que AMH e CFA não contribuíam com qualquer informação em prever gravidez em ciclos de FIV. Porém, não houve discussão em relação a mulheres jovens com baixa reserva ovariana. No nosso estudo, foi observado diferença significativa na qualidade oocitária destas mulheres, mesmo sendo jovens (TABELA 8). Para variações na idade, não houve maior proporção de alteração nos marcadores de qualidade oocitária, mas quando as pacientes foram classificadas pelos testes de reserva ovariana evidenciou-se diferenças importantes. Pacientes com baixa reserva pelo AMH diferiram significativamente daquelas com reserva normal ($AMH \geq 1,2$ ng/mL) quanto à probabilidade de ter oócito imaturo (OR 3,3; IC 1,2-8,8; $p = 0,017$). A cada unidade a mais de FSH basal houve um acréscimo de 23% na chance de a paciente apresentar oócito imaturo (OR 1,23; IC 1,0-1,3; $p = 0,040$), risco aumentado que também ficou evidenciado quando a paciente tinha reserva ovariana baixa por este marcador (OR 4,4; IC 1,2-15,5; $p = 0,023$).

Associação semelhante foi observada em relação à probabilidade de a paciente apresentar oócitos com citoplasma anormal. A cada acréscimo de unidade no FSH basal sérico representou aumento de 42% de chance de apresentar este tipo de alteração oocitária ($p= 0,006$). No mesmo sentido, considerando reserva ovariana baixa de acordo com o AMH, as pacientes apresentaram um risco 5,3 vezes maior de ter oócito com citoplasma anormal (OR 5,3; IC 1,7-16,7; $p= 0,004$). Estes achados mostram que o AMH é que um forte marcador de qualidade oocitária, visto que alterações de citoplasma são consideradas as principais impactantes no desfecho embrionário e potencial implantacional (BALABAN; URMAN, 2006; BRAGA et al., 2013). Além disso, que alterações pequenas no valor de FSH basal impactam na qualidade do citoplasma oocitário mesmo nas pacientes consideradas como tendo reserva ovariana normal por este marcador. Desta forma, pensando no potencial reprodutivo da mulher, seria arriscado aguardar que ela apresente um resultado anormal de FSH basal para incluí-la em grupos de mau prognóstico.

Corroborar com esta análise o estudo prospectivo com 327 pacientes submetidas à FIV e biópsia de blastocistos de Katz-Jaffe et al. (2013). Nele, foi avaliada a taxa de aneuploidia encontrada nos grupos definidos de acordo com a reserva ovariana. Quando a paciente apresentava FSH basal maior que 10mUI/ mL e/ou AMH $\leq 1,0$ ng/mL era considerada de baixa reserva ovariana. Como resultado, o grupo com alteração nos testes de reserva ovariana teve uma proporção maior de embriões aneuplóides (66% comparado com 51,7% no grupo de reserva normal; $p<0,05$). Os piores resultados foram encontrados no grupo com alteração nos dois testes, FSH e AMH, chegando a 77,2% de alteração cromossômica embrionária. Quando tinha apenas alteração no AMH a taxa de aneuploidia foi de 58,8%.

Pacientes com reserva ovariana normal pelo CFA apresentaram maior quantidade de oócitos maduros no nosso estudo ($p<0,001$). Porém, o nível de CFA não esteve associado às principais alterações da morfologia oocitária. Apesar da baixa reserva por este marcador ter indicado risco de 2,9 vezes maior de ter oócitos de forma alterada (IC 1,1-7,6; $p= 0,035$), quando a reserva ovariana das pacientes foi classificada pelo FSH ou AMH, não foi observado relação com este tipo de alteração oocitária. A maioria dos estudos não encontra uma associação entre as alterações na forma dos oócitos e os resultados da fertilização in vitro, sugerindo que este possa não ser um achado importante (BALABAN et al., 2008; SETTI et al., 2011; COTA et al., 2012).

Xia (1997), demonstrou que oócitos com espaço perivitelínico normal apresentavam uma taxa de fertilização maior (60,3% quando normal e 37,5% quando aumentado) e desenvolvimento embrionário melhor. As pacientes do nosso estudo com reserva ovariana baixa de acordo com o AMH, apresentaram maior associação com ocorrência de alterações no espaço perivitelínico (OR 3,0; IC 1,2 –7,6; $p= 0,018$). Desta forma, este achado poderia impactar em pior resultado reprodutivo neste grupo de pacientes.

Brodin et al. (2013) divulgaram a correlação positiva entre AMH e taxa de nascimento após tratamento de reprodução assistida (FIV/ICSI) em estudo prospectivo com 892 pacientes com média de idade de 36 anos. Assim, valores acima de 0,84 ng/mL foram encontrados com maior frequência nas mulheres que engravidaram. Descreveram que não houve gravidez em mulher com AMH $<0,2$ ng/mL independentemente da idade. Porém, não foi discutido o valor de AMH de acordo com a idade da mulher.

Pils et al. (2016), investigaram a hipótese de associação da baixa reserva ovariana como causa de aborto recorrente. Nas pacientes sem causa identificada da perda gestacional foi observado média mais baixa de AMH (1,2 ng/mL) comparado àquelas com causa identificada (2,0 ng/mL). A média de idade das pacientes nos dois grupos foi a mesma, 33 anos. Isto reforça a possibilidade de associação de baixa reserva ovariana com má qualidade oocitária mesmo em mulheres jovens. Tarasconi et al. (2017), tiveram conclusões semelhantes, sugerindo que a baixa reserva ovariana de acordo com o AMH possa estar associada a maior taxa de aborto dentro de uma mesma faixa etária em pacientes submetidas a FIV.

Considerando que a qualidade espermática é também ponto importante na taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário e que 61 % das pacientes deste estudo apresentavam fator masculino de infertilidade isoladamente ou não, optamos por não avaliar a taxa de fertilização dos oócitos e resultados gestacionais. Para isso, são necessárias pesquisas com casais sem causa masculina de infertilidade associada.

Outra limitação da nossa pesquisa foi a impossibilidade de uma análise crítica de reprodutibilidade intra-observador para o CFA, visto se tratar de estudo retrospectivo e coleta apenas de dados de prontuários sem disponibilidade de imagens ecográficas dinâmicas, este pode ser um viés de detecção. Para tanto, sugerimos serem necessários estudos prospectivos para avaliação da associação do

CFA como ferramenta de avaliação da reserva ovariana em mulheres jovens com qualidade oocitária.

Apesar das limitações descritas acima, este estudo sugere que a idade da mulher isoladamente pode não ser um reflexo de qualidade oocitária boa ou ruim quando submetidas à EOC. Desta forma, a simples correlação entre idade da mulher e taxa de sucesso em tratamentos de reprodução assistida pode não ser fiel quando se trata de pacientes com reserva ovariana baixa com até 35 anos. Nesse sentido, levantamos a discussão da importância da investigação da reserva ovariana com a paciente mesmo jovem, pensando num melhor planejamento reprodutivo e buscando esclarecer àquelas com risco de insuficiência ovariana prematura, por exemplo, quanto ao seu melhor momento biológico para engravidar. Assim, não só o efeito deletério da idade, mas a presença de baixa reserva ovariana seria aspecto importante na educação e maior conscientização do planejamento reprodutivo da mulher.

7 CONCLUSÕES

- ❖ Houve associação entre reserva ovariana e qualidade oocitária, de acordo com maturidade e morfologia, em mulheres com até 35 anos submetidas à EOC:
 - Apresentaram mais oócitos imaturos quando tinham FSH basal ≥ 10 mIU/mL ou AMH $< 1,2$ ng/mL;
 - A elevação de cada unidade no nível sérico de FSH basal esteve relacionada a maior risco de ter oócito com citoplasma anormal.
 - AMH $< 1,2$ ng/mL esteve associado a maior risco de alteração de citoplasma e espaço perivitelínico; e
 - Mulheres com CFA < 10 apresentaram maior risco de ter oócitos com forma anormal.

- ❖ Não houve associação entre dose de FSH/HMG usada na EOC em mulheres com até 35 anos e qualidade oocitária, de acordo com maturidade e morfologia.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. C. R. M.; ALBUQUERQUE, L. E. T.; AZEVEDO, A. C. Avaliação morfológica da qualidade dos oócitos. In: DZIK, A.; DONADIO N. F.; ESTEVES, S. C.; NAGY, Z. P. **Atlas de Reprodução Humana**: Volume II. São Paulo: Segmento Farma, 2012. p. 115-122.

AMANVERMEZ, R.; TOSUN, M. An update on ovarian aging and ovarian reserve tests. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 9, n. 4, p. 411-415, 2016.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **10. Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio)**. Disponível em <http://www.portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 03 Nov. 2017.

ASRM. SOCIEDADE AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA. **Infertilidad**: un Resumen. 2012a. Disponível em: <http://www.reproductivefacts.org>. Acesso em: 15 Out. 2017.

ASRM. SOCIEDADE AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA. Practice committee. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 2, p. 302-307, 2012b.

ASRM. SOCIEDADE AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA. Practice committee. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 103, e9-e17, 2015.

ASRM. SOCIEDADE AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA. Committee Opinion. Female age-related fertility decline. **Fertility and Sterility**, v. 101, n.3, p. 633-644, 2014.

BAKER, V. L.; BROWN, M. B.; LUKE, B.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 5, p. 1145-1152, 2015.

BALABAN, B.; ATA, B.; ISIKIAR, A.; YAKIN, K.; URMAN, B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. **Human Reproduction**, v. 23, p. 1778-1785, 2008.

BALABAN, B.; URMAN, B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p. 608-15, 2006.

BOSCH, E.; LABARTA, E.; KOLIBIANAKIS, E.; ROSEN, M.; MELDRUM, D. Regimen of ovarian stimulation affects oocyte and therefore embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 105, n.3, p. 560-570, 2016.

BRAGA, D. P. A. F.; SETTI, A. S.; FIGUEIRA, R. C.; MACHADO, R. B; IACONELLI, A.; BORGES, E. Influence of oocyte dysmorphisms on blastocyst formation and quality. **Fertility and Sterility**, v.100, p. 748-754, 2013.

BRODIN, T.; HADZIOSMANOVIC, N.; BERGLUND, L.; OLOVSSON, M.; HOLTE, J. Antimüllerian hormone levels are strongly associated with live-birth rates after assisted reproduction. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1107-1114, 2013.

BROER, S. L.; EIJKEMANS, M. J. C.; SCHEFFER, G. J.; VAN ROOIJ, I. A. J.; DE VET, A.; THEMMEN, A. P. N. et al. Anti-mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 8, p. 2532-2539, 2011.

BROER, S. L.; BROEKMANS, F. J. M.; LAVEN, J. S. E.; FAUSER, B. C. J. M. Anti-mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 5, p. 688-701, 2014.

BROER, S. L.; VAN DISSELDORP, J.; BROEZE, K. A.; DOLLEMAN, M.; OPMEER, B. C.; BOSSUYT, P. et al. Added value of ovarian reserve testing on patient characteristics in the prediction of ovarian response and ongoing pregnancy: an individual patient data approach. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 1, p. 26-36, 2013.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1“Frequently Asked Questions about infertility”. American Society for Reproductive Medicine (ASRM). National Survey of Family Growth, Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2006-2010. Disponível em: <http://www.reproductivefacts.org/detail.aspx?id=2322>. Acesso em 09 Out. 2016.

COTA, A. M. M.; PETERSEN, C. G.; OLIVEIRA, J. B. A.; MAURI, A. L.; MASSARO, F. C.; CAVAGNA, M. et al. Correlação entre os distúrbios oocitários e os resultados da fertilização in vitro. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 16, n. 2, p. 108-112, 2012.

DAL CANTO, M.; GUGLIEMO, M. M. R.; RENZINI, M. M.; FADINI, R.; MOUTIER, M. M.; MEROLA, M. et al. Dysmorphic patterns are associated with cytoskeletal alterations in human oocytes. **Human Reproduction**, v. 32, n. 4, p.750-757, 2017.

DEMKO, A. P.; SIMON, A. L.; McCOY, R. C.; PETROV, D. A.; RABINOWITZ, M. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism-based preimplantation genetic screening. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 5, p. 1307-1313, 2016.

DEWAILLY, D.; ANDERSEN, C. Y.; BALEN, A.; BROEKMANS, E.; DILAYER, N.; FANCHIN, R. et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. **Human Reproduction Update**, v. 20, n.3, p. 370-385, 2014.

DONADIO, N. F.; DZIK, A.; CAVAGNA, M.; DONADIO, N. Fertilização *in vitro*. In: DZIK, A.; DONADIO, N. F.; ESTEVES, S. C.; NAGY, Z. P. **Atlas de Reprodução Humana: volume II**. São Paulo: Segmento Farma, 2012. p.123-130.

EBNER, T.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M.; TEWS, G. Selection Based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 3, p. 251-262, 2003.

EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p. 507-512, 2006.

ESHRE. EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY. **Atlas of Human Embryology**. 2016. Disponível em: <http://eshre.webenpruebas.net> Acesso em: 20 Set. 2017.

ESHRE. EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY. Management of women with premature ovarian insufficiency – Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. 2015. Disponível em: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Management-of-premature-ovarian-insufficiency.aspx> Acesso em: 14 Out. 2017.

FANCHIN, R.; TAIEB, J.; LOZANO, D. H. M.; DUCOT, B.; FRYDMAN, R.; BOUYER, J. High reproducibility of serum anti-müllerian hormone measurements suggest a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. **Human Reproduction**, v. 20, p. 923-927, 2005.

FLEMING, R.; SEIFER, D. B.; FRATTARELLI, J.; RUMAN, J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, p. 486-496, 2015.

FRANASIAK, J. M.; FORMAN, E. J.; HONG, K. H.; WERNER, M. D.; UPHAM, K. M.; TREFF, N. R.; SCOTT JR, R. T. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 3, p. 656-663, 2014.

GLEICHER, N., KUSHNIR, V. A.; BARAD, D.H. Prospectively assessing risk for premature ovarian senescence in young females: a new paradigm. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 34, 2015.

HENDRIKS, D.J.; HWEE, J.; MOL, B.W.; TE VELDE, E.R.; BROEKMANS, F.J. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 4, p. 764-775, 2007.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v. 11, p.162-177, 2005.

JAYAPRAKASAN, K.; WALKER, K. F.; CLEWES, J. S. JOHNSON, I. R.; RAINE-FENNING, N. J. The interobserver reliability of off-line antral follicle counts made from stored threedimensional ultrasound data: A comparative study of different measurement techniques. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 29, n. 3, p. 335–341, 2007.

JAYAPRAHASAN, K.; CAMPEBELL, B.; HOPKISSON, J.; JOHNSON, I.; RAINE-FENNING, N. A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation. **Fertility and Sterility**. v. 93, n.3, p. 855-863, 2010.

KATZ-JAFFE, M. G.; SURREY, E. S.; MINJAREZ, D. A.; GUSTOFSON, R. L.; STEVENS, J. M.; SCHOOLCRAFT, W. B. Association of abnormal ovarian reserve parameters with a higher incidence of aneuploid blastocysts. **Obstetrics and Gynecology**, v. 121, n. 1, p. 71-77, 2013.

KISSEL, K. A.; DANAHER, M. R.; SCHISTERMAN, E. F., WACTAWSKI-WENDE, K. A.; SCHLIEP, N. J.; PERKINS, N. J. et al. Biological variability in serum anti-Müllerian Hormone throughout the menstrual cycle in ovulatory and sporadic anovulatory cycles in eumenorrheic women. **Human Reproduction**, v. 29, n. 8, p. 1764-1772, 2014.

LAN, V. T. N.; LINH, N. K.; TUONG, H. M.; WONG, P. C.; HOWLES, C. M. Anti-müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 390-399, 2013.

LA MARCA, A.; MINASI, M.G.; SIGHINOLFI, G.; GRECO, P.; ARGENTO, C.; GRISENDI, V. et al. Female age, serum antimüllerian hormone level, and number of oocytes affect the rate and number of euploid blastocysts in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**. 108(5):777-783. 2017.

LA MARCA, A.; SIGHINOLFI, G.; RADI, D.; ARGENTO, C.; BARALDI, E.; ARTESINIO, A. C. et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 2, p. 113-130, 2010.

LA MARCA, A.; STABILE, G.; GARDUCCI, A. A.; VOLPE, A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. **Human Reproduction**, v. 21, n. 12, p. 3103-3107, 2006.

LASIENÉ, K.; VITKUS, A.; VALANEIUTÉ, A.; LASYS, V. Review: Morphological criteria of oocyte quality. **Medicina (Kaunas)**, v. 45, n. 7, p. 509-515, 2009.

LEE, T. H.; LIU, C. H.; HUANG, C. C.; HSIEH, K. C.; LIN, P. M.; LEE, M. S. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 100, 2009.

LIMA, J. V.; GOMES, L. F. F.; BATISTA, L. A. A.; BORGES, M. A.; BATISTA, N. T.; AMARAL, W. N. et al. Técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide e resultados. In: DZIK, A.; DONADIO, N.F.; ESTEVES, S. C.; NAGY, Z. P. **Atlas de Reprodução Humana: volume II**. São Paulo: Segmento Farma, 2012. p.131-136.

LOUTRADIS, D.; DRAKAKIS, P.; KALLIANIDIS, K.; MILINGOS, S.; DENDRINOS, S.; MICHALAS, S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 240-244, 1999.

MACÉA, J. R. Função ovariana. In: BUSSO, N. E.; PELLICER, A. **Indução da Ovulação**. 2. Ed. São Paulo: Silvestre Escrita Especial, 2011. p.27-47.

MEDEIROS, S. F. Fisiologia da Reprodução. In: DZIK, A.; PEREIRA, D. H. M.; CAVAGNA, M.; AMARAL, W. N. do. **Tratado de Reprodução Assistida**. São Paulo: Segmento Farma, 2010. p. 11-23.

MIKKELSEN, A. L.; LINDENBERG, S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. **Human Reproduction**, v. 16, n. 8, p. 1714-1718, 2001.

MUTLU, M.F.; ERDEM, M.; ERDEM, A. Antral follicle count determines poor ovarian response better than anti-mullerian hormone but age is the only predictor for live birth in in vitro fertilization cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 657-665, 2013.

NIPPITA, T. A.; BABER, R. J. Premature ovarian failure: a review. **Climateric**. v. 10, n.1, p 11-22, 2007.

OLIVEIRA, J. B.; BARUFFI, R. L. R.; PETERSEN, C. G.; MAURI, A. L.; NASCIMENTO, A. M.; VAGNINI, L. et al. A new ovarian response prediction index (ORPI): implications for individualized controlled ovarian stimulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10:94, 2012.

PILS, S., PROMBERGER, R., SPRINGER, S., JOURA, E., OTT, J. Decreased Ovarian Reserve Predicts Inexplicability of Recurrent Miscarriage? A Retrospective Analysis. **Plos One**, v. 11, n. 9, e0161606, 2016.

REDLARA. REDE LATINO-AMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. Manual de procedimentos - laboratório de reprodução asistida – Fecundación Asistida: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). São Paulo, 2006. Disponível em: http://redlara.com/images/arq/livreto_port_01_2007.pdf Acesso em 23 jan. 2018.

REDLARA. REDE LATINO-AMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. Registros anuais 2012. Disponível em: http://www.redlara.com/aa_portugues/registro_anual.asp?categoria=Registros. Acesso em 09 out. 2016.

SCOTT, R. T.; TONER, J. P.; MUASHER, S. J.; OEHNINGER, S.; ROBINSON, S.; ROSENWAKS, Z. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v. 51, p. 651-654, 1989.

SEIFER, D. B.; MACLAUGHLIN, D. T.; CHRISTIAN, B. P.; SHELDEN, R. M. Early follicular serum müllerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 468-471, 2002.

SERHAL, P. F.; RANIERI, D. M.; KINIS, A.; MARCHANT, S.; DAVIES, M.; KHADUM, I. M. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 12, n. 6, p. 1267-1270, 1997.

SETTI, A. S.; FIGUEIRA, R. C. S.; BRAGA, D. P. A. F.; COLTURATO, S. S.; IACONELLI JR, A; BORGES JR, E. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 159, n. 2, p. 364-370, 2011.

SHEFFER, J. B.; SCHEFFER, B. B.; DE CARVALHO, R. F.; RODRIGUES, J.; GRYNBERG, M.; MENDEZ LOZANO, D. H. Age as a predictor of embryo quality regardless of the quantitative ovarian response. **International Journal of Fertility & Sterility**, v.11, n. 1, p. 40-46, 2017.

SPEROFF, L. Regulation of the menstrual cycle. In: FRITZ, M.A.; SPEROFF, L. **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. 8th ed. Philadelphia: WOLTERS KLUWER; 2011. p. 199-242.

TARASCONI, B.; TADROS, T.; AYOUBI, J-M.; BELLOC, S.; ZIEGLER, D.; FANCHIN, R. Serum antimüllerian hormone levels are independently related to miscarriage rates after in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**. v. 108, n. 3, p. 518-524, 2017.

TONER, J.P.; PHILPUT; C.B.; JONES, G.S.; MUASHER, S.J. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 4, p.784-791, 1991.

TONER, J.P.; SEIFER, D.B. Why we may abandon basal follicle-stimulating hormone testing: a sea change in determining ovarian reserve using antimüllerian hormone. **Fertility and Sterility**, v. 99, n.7, p. 1825-1830, 2013.

WALLACE, W. H. B.; KELSEY, T. W. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. **Plos One**, v. 5, n. 1, e8772, 2010.

XIA, P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1750-1755, 1997.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G. D.; DYER, S.; RACOWSKY, C.; DE MOUZON, J. SOKOL, R. et al. The International Glossary on infertility and fertility care. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. 393-406, 2017a.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; SCHWARZE, J. E.; CROSBY, J. A.; MUSRI, C.; URBINA, M. T. Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2014. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 164-175, 2017b.

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Viviane Margareth Scantamburlo Niehues e Jaime Julak Junior, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos te convidando a participar de um estudo intitulado “ESTUDO COMPARATIVO DA QUALIDADE OOCITÁRIA E TAXA DE FERTILIZAÇÃO EM PACIENTES INFÉRTEIS JOVENS COM RESERVA OVARIANA NORMAL E BAIXA SUBMETIDAS À ICSI”. Neste estudo, serão coletados dados do seu prontuário clínico como idade do casal, tempo e causa de infertilidade, resultados de exames laboratoriais e de imagem (ecografias), resultados obtidos com a fertilização in vitro realizada (qualidade dos óvulos e da fecundação, qualidade de embrião, e eventual gestação e parto).

Existem poucos estudos científicos que avaliam a qualidade dos óvulos e fecundação em mulheres jovens com baixa reserva ovariana (poucos óvulos para a idade).

O objetivo desta pesquisa é avaliar se as mulheres jovens com poucos óvulos apresentam a mesma ou diferente qualidade dos óvulos e taxa de fecundação.

A pesquisadora responsável por este estudo, Viviane Margareth Scantamburlo Niehues, médica ginecologista, poderá ser contatada na Rua Bom Jesus, 758, Bairro Juvevê, Curitiba –PR, ou pelos telefones (41) 333522544/ (41) 99433400, de segunda a sexta-feiras de 8 às 17h para esclarecer eventuais dúvidas que possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP/HC/UPFR pelo Telefone 3360-1041. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.


MARIA JOSÉ MOÇELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UPFR
 Matrícula 7462

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____



As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas (orientador e pesquisador). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha e fui informado que minha participação será sem custos ou ganhos financeiros para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Nome e Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Local e data

(Somente para o responsável do projeto)

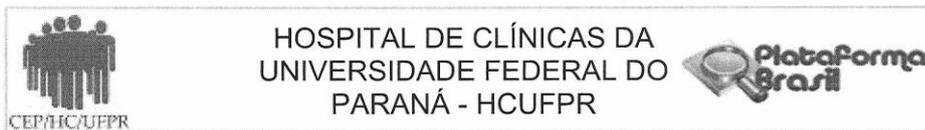
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

(Nome e Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE)

Local e data


MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HCU/UFPR
Matrícula 7462

ANEXO 1 - CARTAS DE APROVAÇÃO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo da qualidade oocitária e taxa de fertilização em pacientes inférteis jovens com reserva ovariana normal e baixa submetidas à ICSI.

Pesquisador: Viviane Margareth Scantamburlo Niehues

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51021715.9.0000.0096

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.461.359

Apresentação do Projeto:

ESTUDO COMPARATIVO DA QUALIDADE OOCITÁRIA E TAXA DE FERTILIZAÇÃO EM PACIENTES INFÉRTEIS JOVENS COM RESERVA OVARIANA NORMAL E BAIXA SUBMETIDAS À ICSI.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a qualidade oocitária e taxa de fertilização de pacientes inférteis jovens com reserva ovariana normal e baixa submetidas à ICSI.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

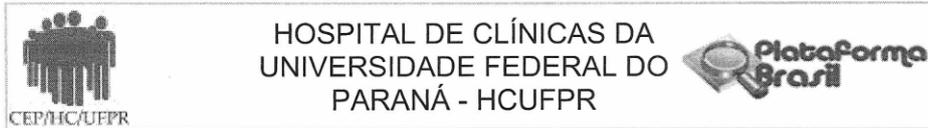
Quanto ao risco não se aplica, visto se tratar de estudo retrospectivo.

Quanto aos benefícios, será de importante valia na ampliação dos conhecimentos acerca da baixa reserva ovariana em mulheres inférteis jovens. Não se sabe ao certo se o fato de apresentarem menor quantidade de oócitos, a qualidade destes pode ser comparada a de mulheres com idade avançada. Desta forma, poderemos estimar a real taxa de sucesso naquele grupo num tratamento de Fertilização Assistida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho retrospectivo avaliação laboratorial e de dados clínicos que interessam ao estudo de fertilidade e reprodução assistida.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR

Continuação do Parecer: 1.461.359

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O presente trabalho preenche todos os termos de apresentação obrigatórias.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após avaliação dos objetivos não foi observado infração ética na presente pesquisa.

Pesquisador atendeu a pendência do CEP, projeto considerado aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

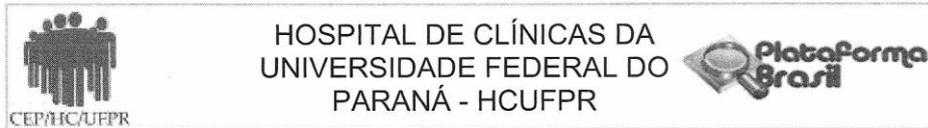
Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_621951.pdf	01/03/2016 23:29:42		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	recurso_carta_de_encaminhamento_do_pesquisador_ao_CEP.pdf	01/03/2016 23:29:14	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	qualificacao_de_todos_os_pesquisadores.doc	16/11/2015 13:42:07	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_orientador0001.pdf	16/11/2015 13:39:19	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.461.359

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_viviane_msniehues_2015comite2.doc	16/11/2015 13:36:51	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	demonstrativo_infraestrutura0001.pdf	16/11/2015 13:35:27	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto0001.pdf	16/11/2015 13:34:32	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_projeto.doc	11/11/2015 22:56:37	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados.pdf	11/11/2015 22:56:14	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Confidencialidade.pdf	11/11/2015 22:55:47	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_uso_especifico_do_material.pdf	11/11/2015 22:54:58	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Responsabilidade_com_a_Pesquisa.pdf	11/11/2015 22:54:23	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia_das_Unidades_e_Servicos_envolvidos.pdf	11/11/2015 22:53:33	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_tornar_publico_os_resultados.pdf	11/11/2015 22:52:48	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_compromisso_dos_pesquisadores.pdf	11/11/2015 22:52:27	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

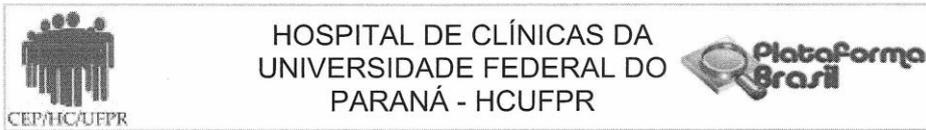
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 22 de Março de 2016

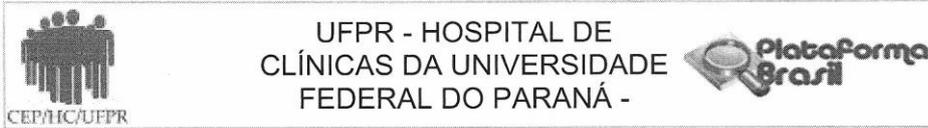
Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 1.461.359

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE RESERVA OVARIANA E QUALIDADE OOCITÁRIA EM MULHERES JOVENS SUBMETIDAS À ICSI

Pesquisador: Viviane Margareth Scantamburlo Niehues

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51021715.9.0000.0096

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.367.724

Apresentação do Projeto:

ASSOCIAÇÃO ENTRE RESERVA OVARIANA E QUALIDADE OOCITÁRIA EM MULHERES JOVENS SUBMETIDAS À ICSI

Objetivo da Pesquisa:

Analisar os métodos de avaliação de reserva ovariana em mulheres inférteis jovens submetidas à ICSI e a existência de associação com qualidade oocitária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não se aplica, considerando que serão analisados dados de prontuários.

Benefícios:

Poder esclarecer a paciente quanto às suas taxas de sucesso na ICSI de acordo com sua reserva ovariana e não apenas na idade cronológica. Isto implica em qualidade na decisão terapêutica bem como real expectativa de sucesso no tratamento proposto.

Metodologia de Análise de Dados:

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo retrospectivo de avaliação de prontuário focado em comparar morfologia e qualidade de reservas ovárias e qualidade de oscitas para FIV.

Emenda:

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181	CEP: 80.060-900
Bairro: Alto da Glória	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041	Fax: (41)3360-1041
	E-mail: cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.367.724

Atualização dos objetivos, metodologia e análise estatísticas. Solicita também a alteração do título da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram cumpridos

Recomendações:

cumprir o cronograma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Inadequações ou pendências não observadas

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da Emenda.

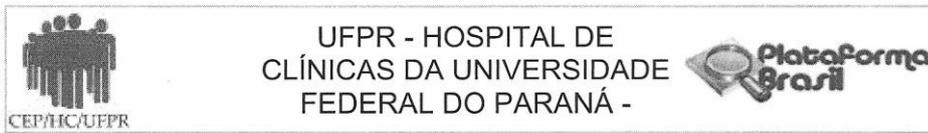
Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivados.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_977558 E1.pdf	17/10/2017 22:39:57		Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_emenda_VMSN.pdf	17/10/2017 22:31:22	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado_viviane_msniehues_2017emenda.doc	17/10/2017 22:30:22	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto2_VMSN.pdf	17/10/2017 22:29:22	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.367.724

Recurso Anexado pelo Pesquisador	recurso_carta_de_encaminhamento_do_pesquisador_ao_CEP.pdf	01/03/2016 23:29:14	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	qualificacao_de_todos_os_pesquisadores.doc	16/11/2015 13:42:07	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_orientador0001.pdf	16/11/2015 13:39:19	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	demonstrativo_infraestrutura0001.pdf	16/11/2015 13:35:27	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_projeto.doc	11/11/2015 22:56:37	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados.pdf	11/11/2015 22:56:14	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Confidencialidade.pdf	11/11/2015 22:55:47	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_uso_especifico_do_material.pdf	11/11/2015 22:54:58	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Responsabilidade_com_a_Pesquisa.pdf	11/11/2015 22:54:23	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia_das_Unidades_e_Servicos_envolvidos.pdf	11/11/2015 22:53:33	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_tornar_publico_os_resultados.pdf	11/11/2015 22:52:48	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_compromisso_dos_pesquisadores.pdf	11/11/2015 22:52:27	Viviane Margareth Scantamburlo Niehues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br



Continuação do Parecer: 2.367.724

CURITIBA, 06 de Novembro de 2017

Assinado por:
maria cristina sartor
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-900
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 **Fax:** (41)3360-1041 **E-mail:** cep@hc.ufpr.br

