

Ação dos medicamentos para estimulação ovariana sobre a primeira geração de filhotes de camundongos *Mus musculus*

Action of ovarian stimulation drugs on the first generation of offspring of *Mus musculus* mice

Lia Mara Rossi¹, Milena Compagnoli Vasconcellos², Camila Aparecida Polli², Alessandra Defácio², Melissa Alves Santos², Ana Carolina de Alencar Gonçalves², Edna Marina Cappi Maia³

Resumo

Objetivos: Analisar o efeito dos hormônios utilizados em diferentes protocolos para a indução ovulatória sobre a evolução da gestação e formação dos órgãos reprodutivos da descendência em camundongos *Mus musculus* cujas progenitoras foram submetidas aos medicamentos de indução ovulatória em diferentes dosagens. **Métodos:** Sessenta fêmeas foram divididas em grupos de acordo com o protocolo de superovulação: Grupo A: 10 IU eCG (Gonadotrofina Coriônica equina IP) e 10 IU hCG (Gonadotrofina Coriônica humana IP); Grupo B: 20 IU eCG IP e 20 IU hCG IP; Grupo C (controle): injeção IP de solução salina (NaCl 0,9%). Após nascimento, filhotes foram pesados e avaliados quanto à presença de mal-formações. Parâmetros como duração da gestação, peso dos filhotes, perda gestacional, número de filhotes nascidos por fêmea, peso e histologia dos órgãos reprodutivos também foram avaliados. Resultados: Não foram notadas mal-formações maiores nos animais nascidos com e sem o uso de drogas indutoras da ovulação. Um número menor de filhotes nascidos por fêmea foi notado nos grupos submetidos à indução ovulatória. Filhotes ao nascimento apresentaram peso semelhante nos três grupos, assim como também não foi notada diferença significativa quando o peso e a morfologia dos órgãos reprodutivos foram comparados entre os grupos. **Conclusões:** Altas doses de hormônios para indução da ovulação podem comprometer a qualidade dos oócitos de camundongos quando fecundados naturalmente, com consequente prejuízo no número dos filhotes nascidos por fêmea.

Descritores: Indução da ovulação, Técnicas reprodutivas assistidas, Gonadotropinas/dosagem & administração, Hormônio liberador de gonadotropina/ dosagem & administração, Oócitos, Camundongos

Abstract

Objectives: To analyze the effect of hormones used in different protocols for ovulatory induction on pregnancy evolution and reproductive organogenesis in *Mus musculus* mice offspring whose mothers were submitted to ovulatory-inducing drugs at different dosages. **Methods:** Sixty females were divided into groups according to superovulation protocol: Group A: 10 IU eCG (equine chorionic gonadotropin IP) and 10 IU hCG (human chorionic gonadotropin IP), Group B: 20 IU eCG IP and 20 IU hCG IP, Group C (control): IP injection of NaCl 0.9%. After birth, pups were weighed and evaluated for the presence of malformations. Parameters including duration of pregnancy, weight of pups, pregnancy loss, number of pups born per female, weight and histology of reproductive organs were also evaluated. **Results:** No significant differences in malformations occurred between animals from groups with and without use of ovulation-inducing drugs. However, a fewer offspring per female was observed in the groups submitted to ovulatory induction. Weight of pups at birth was similar across the three groups, and no significant differences in weight or morphology of reproductive organs were found among groups. **Conclusions:** High doses of ovulation-inducing hormones may compromise the quality of mice oocytes when fertilized naturally, with consequent reduction in the number of pups born per female.

Key words: Ovulation induction; Reproductive techniques, assisted; Gonadotropins/dosage & administration; Gonadotropin-releasing hormone/dosage & administration; Oocytes; Mice

Introdução

Estima-se que, devido a fatores comportamentais, sociais e ambientais cerca de 7 a 10% dos casais por ano irão recorrer a serviços que tratam dos distúrbios

1. Professor Adjunto da Disciplina de Histologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí

2. Acadêmica do 6º Ano do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Jundiaí

3. Professor Adjunto da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí

Trabalho realizado: Faculdade de Medicina de Jundiaí
Trabalho com bolsa PIBIC – Faculdade de Medicina de Jundiaí

Endereço para correspondência: Lia Mara Rossi. Faculdade de Medicina de Jundiaí. Rua Francisco Telles, 250 - Vila Arens - 13202-550 - Jundiaí - SP - Brasil

da fertilidade, independentemente do fator causador. Para estes casais, o tratamento com gonadotrofinas é rotineiramente utilizado para induzir a produção de múltiplos folículos ovarianos e com isso aumentar o número de oócitos e consequentemente, embriões obtidos pelas técnicas de fertilização *in vitro*^(1,2).

Quando são empregadas as técnicas de reprodução assistida de baixa complexidade (inseminação intra-uterina ou coito programado), a mulher receberá gonadotrofinas exógenas que estimulam o crescimento folicular monitorado por exames ultra-sonográficos seriados e dosagens séricas das concentrações de estradiol que culminam com a ovulação; introdução do sêmen processado na cavidade uterina a fim de que a fertilização ocorra naturalmente. No caso do coito programado, o casal é orientado a ter relações sexuais⁽¹⁾.

As gonadotrofinas exógenas (hormônio folículo estimulante - FSH) são administradas, na maior parte das vezes, após o bloqueio hipofisário com drogas agonistas ou antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Após a administração do FSH exógeno, ocorre um aumento da esteroidogênese pelas células foliculares que recobrem o oócito em crescimento (prófase I da segunda divisão meiótica). Como suporte medicamentoso da segunda fase do ciclo menstrual, drogas como progesterona e estrógeno podem ser administradas^(3,4).

Em roedores, o modelo clássico de hiperestimulação ovariana envolve uma injeção de eCG para mimetizar a atividade do hormônio folículo estimulante (FSH) no que se refere ao desenvolvimento de múltiplos folículos, seguido de uma dose de hCG, para produzir os efeitos do hormônio luteinizante (LH) em relação à maturação folicular e ovulação. Estudos em animais comparando ciclos ovarianos naturais e estimulados têm demonstrado efeitos deletérios da estimulação com gonadotrofinas, possivelmente devido a uma perda na coordenação dos processos de gametogênese. Apesar de as fêmeas adultas de roedores serem capazes de produzir oócitos e embriões que levam a gestação a termo e nascimento de filhotes, tem sido observado um aumento nas taxas de mortalidade e anormalidades fetais^(5,6).

Estes tratamentos já foram reportados como teratogênicos em camundongos, bovinos e hamsters causando uma redução na qualidade e competência de oócitos e embriões. Em animais, a exemplo do que acontece em humanos, a superovulação - estimulação do desenvolvimento de um maior número de folículos durante um ciclo - é realizada pela aplicação de hormônios gonadotróficos séricos extraídos de éguas gestantes^(5,7,8). Estudo recente demonstra que a superovulação parece comprometer a qualidade oocitária e interfere na manutenção da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário na

fase pré-implantacional, podendo este fato ter repercussões clínicas para a avaliação de pacientes após a reprodução assistida. Neste estudo há a sugestão de que os mecanismos de manutenção dessa expressão gênica são menos complexos nos tecidos derivados do trofoectoderma⁽⁹⁾.

Nos dias de hoje, uma das maiores preocupações em reprodução assistida tem sido acompanhar o desenvolvimento dos bebês nascidos por estas técnicas. Em estudo publicado por Amor, Halliday⁽¹⁰⁾ foram demonstradas evidências sobre a associação entre síndromes causadas por distúrbios do "imprinting" genético (Síndrome de Beckwith-Wiedemann e Angelman) e técnicas de reprodução assistida. Especula-se também que, drogas como o citrato de clomifeno testadas em ratos, sob regime de terapia crônica, parecem causar apoptose das células epiteliais da região do istmo, ativação ciliar e bloqueio da passagem de gametas e embriões pela tuba uterina, podendo acarretar em gestações ectópicas⁽¹¹⁾; assim como também tem sido realizados estudos experimentais com o objetivo de avaliar o comprometimento nos órgãos reprodutores.

Hossaini et al⁽¹²⁾ demonstraram que o uso de estrogênio conjugado em ratos normais da raça Fischer e Wistar diminuiu o peso dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimo, próstata, vesícula seminal), e a produção de espermatozoides causando degeneração dos túbulos seminíferos.

Em outro estudo, Ebling et al⁽¹³⁾ foi possível notar que o implante de estradiol em camundongos *Mus musculus* com hipogonadismo hipogonadotrófico provocou aumento do peso dos testículos, crescimento do epidídimo e espermatogênese mais avançada, reforçando a significativa ação nos órgãos sexuais.

Com base nestas informações, este estudo teve por objetivo analisar o efeito dos hormônios utilizados em diferentes protocolos para a indução ovulatória sobre a organogênese da descendência em camundongos *Mus musculus* cujas progenitoras foram submetidas aos medicamentos de indução ovulatória em diferentes dosagens.

Métodos

Sessenta fêmeas e quinze machos de camundongos *Mus musculus* com oito semanas de idade foram incluídos neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí, com regime de alimentação com água e ração *ad libitum* e suplementação com sementes de aveia, girassol e milho, com períodos de 12 horas de luz e com temperatura controlados.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o protocolo de superovulação, a saber: Grupo A: Fêmeas superovuladas com 10 IU eCG (*equine chorionic*

Tabela 1

Descrição dos grupos de estudo			
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Animais	20 fêmeas + 5 machos	20 fêmeas + 5 machos	20 fêmeas + 5 machos
Tratamento	10 UI de hormônios	20 UI de hormônios	Solução salina

gonadotrophin - NovormonR, Intraperitoneal - IP) e 10 IU hCG (*human chorionic gonadotrophin* - VetecorR, IP); Grupo B: Fêmeas superovuladas com 20 IU eCG (Gonadotrofina Coriônica equina - NovormonR, IP) e 20 IU hCG (Gonadotrofina Coriônica humana - VetecorR, IP); Grupo C (controle): Fêmeas com injeção IP de solução salina (NaCl 0,9%).

Nos grupos A e B, as fêmeas receberam eCG nas quantidades estipuladas para cada grupo no dia 1, escolhido aleatoriamente e hCG no dia 3 (48 horas depois). Procedeu-se acasalamento na proporção de duas fêmeas para cada macho no dia 3, logo após a injeção do hormônio ou da solução salina. Na manhã do dia 4, verificou-se a presença da rolha (tampão) vaginal. O dia no qual foi notada a rolha vaginal foi considerado o primeiro dia da prenhez.

Fêmeas que apresentaram tampão vaginal foram colocadas em caixas separadas e monitoradas durante 21 ± 5 dias, momento provável do nascimento dos filhotes. No momento do nascimento, os filhotes foram pesados e a presença de mal-formações maiores foi avaliada. Também foram avaliados: (1) duração da gestação (número médio em dias, \pm desvio padrão); (2) peso dos filhotes ao nascimento (em gramas \pm desvio padrão); (3) perda gestacional (fêmeas com diagnóstico de gestação sem evolução); (4) filhotes nascidos por fêmea (número médio \pm desvio padrão); (5) presença de mal-formações ao nascimento; (6) peso dos órgãos reprodutivos (em gramas \pm desvio padrão).

Filhotes de oito semanas fêmeas foram submetidos à eutanásia e seus órgãos reprodutivos retirados, pesados e fixados por imersão em formol. As amostras foram preparadas de acordo com protocolo rotineiro para análise histológica. Cortes histológicos foram realizados com 5 μ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina. Os dados foram analisados pelo programa MINITAB14. Anova e Kruskal-Wallis foram

utilizados quando indicados para análise estatística, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente diferente.

Resultados

Não houve diferença estatística quando a duração da gestação foi comparada entre os grupos ($21,0 \pm 2,3$; $18,8 \pm 5,6$; $19,3 \pm 0,6$; grupos A, B e C, respectivamente, $p=0,662$; gráfico 1). Um número menor de filhotes nascidos por fêmea nos grupos A e B foi notado ($4,8 \pm 2,3$ e $4,6 \pm 2,9$) quando comparados ao número obtido no grupo controle ($10,7 \pm 0,6$; $p=0,011$; gráfico 2). Estas diferenças também foram significantes quando o grupo A foi comparado com o controle ($p=0,023$) e quando o grupo B foi comparado com o controle ($p=0,031$). Não houve diferença significativa quando grupos A e B foram comparados ($p=0,786$).

Em relação ao peso dos filhotes ao nascimento, não foi notada diferença significativa quando os grupos foram comparados ($1,7 \pm 0,2$; $1,5 \pm 0,4$; $1,7 \pm 0,1$; respectivamente, grupos A, B e C, $p=0,247$; gráfico 3).

O peso dos ovários direitos, esquerdos e úteros das fêmeas nascidas nos três grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas; assim como também não foi notada diferença significativa estatística quando o peso dos testículos esquerdos e direitos retirados dos machos nascidos nos três grupos de estudo foi comparado (tabela 2).

A análise histológica dos órgãos reprodutivos dos grupos A e B não apresentou alterações quando comparados com o grupo controle. Os ovários apresentavam predominantemente epitélio simples cúbico seguidos de túnica albugínea. Os folículos foram observados em diferentes estágios de desenvolvimento no estroma cortical. Células glandulares intersticiais, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos foram observados no estroma medular. Pequenos cistos tam-

Tabela 2

Comparação entre a média (\pm desvio padrão) do peso dos órgãos reprodutivos (em gramas) dos filhotes nascidos em cada grupo de estudo.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Valor de P
Ovário direito	0,008 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,004	0,881
Ovário esquerdo	0,007 \pm 0,002	0,006 \pm 0,002	0,009 \pm 0,003	0,200
Útero	0,079 \pm 0,038	0,199 \pm 0,223	0,141 \pm 0,084	0,327
Testículo direito	0,097 \pm 0,010	0,089 \pm 0,065	0,093 \pm 0,008	0,167
Testículo esquerdo	0,090 \pm 0,011	0,085 \pm 0,006	0,092 \pm 0,011	0,455

bém foram observados. Observações histológicas não mostraram variações entre tratamentos na morfologia geral do tecido.

A histologia uterina também não demonstrou diferenças quando os grupos A e B foram comparados ao controle; no entanto, tal análise não foi considerada, pois a eutanásia aconteceu em diferentes períodos do ciclo estral. Os testículos apresentaram cortes transversais de túbulos seminíferos com revestimento albugíneo e epitélio germinativo característico apresentando células da linhagem germinativa desde espermatogônia até espermatozoides, com cabeça em foice, na

luz do túbulo. Células de Leydig apresentaram-se no espaço intersticial (intertubular). Este aspecto foi observado nos três grupos estudados.

Comparação em relação entre a média (\pm desvio padrão) do número de filhotes nascidos em cada grupo de animais estudado (Anova, $p=0,011$) e (c) Comparação entre o peso dos filhotes nascidos (em gramas) em cada grupo estudado (Anova, $p=0,247$)

Discussão

Cerca de 2 a 3% dos bebês nascidos na Europa e 1% dos bebês nascidos nos EUA, são provenientes de Técnicas de Reprodução Assistidas, que muito avançaram nas últimas décadas, sendo consideradas promissoras e atualmente são mescladas com preocupações relacionadas aos problemas causados na prole⁽¹⁴⁾.

Estudos têm demonstrado que a superovulação em camundongos pode exercer impacto negativo sobre a qualidade de oócitos e embriões assim como comprometer a receptividade uterina⁽¹⁵⁾, além de causar retardo no desenvolvimento embrionário (in vivo e in vitro), aumento na taxa de formação para blastocisto, retardo no crescimento fetal e aumento na taxa de absorção fetal⁽¹⁶⁾.

Muitos estudos têm sido realizados neste sentido. Wennerrholm et al⁽¹⁷⁾, em estudo realizado com 1139 crianças, referem um maior número de mal-formações relacionado somente com a multiparidade. Sutcliffe et al⁽¹⁸⁾ analisaram o desenvolvimento de 208 crianças de gestação única e concluiu que as alterações do desenvolvimento neuromotor eram semelhantes às da população geral.

Estudo realizado por van Steirteghem et al⁽¹⁹⁾ analisou 8319 cariótipos fetais (ICSI), não constatando problemas óbvios. No mesmo ano, outro estudo reportou em 2840 crianças, índices de mal-formações maiores nas técnicas de fertilização in vitro semelhantes à da população, assim como as complicações neonatais⁽²⁰⁾. Por outro lado, Schieve et al⁽²¹⁾, na análise de 42.000 nascimentos por técnicas de reprodução assistida comparados a três milhões de nascimentos por concepção natural, observaram aumento de 2,6 vezes no risco para baixo peso ao nascer nas crianças advindas de TRA, porém esse relaciona-se à multiparidade. Mais tarde, Devroey, van Steirteghem⁽²²⁾ revelaram aumento das anormalidades cromossômicas "de novo", semelhantes às taxas de mal-formações maiores entre FIV e ICSI: 3 e 4%. No entanto, apesar de estudos mostrarem maior ocorrência de mal-formações em bebês concebidos por técnicas de reprodução assistida, os mecanismos não são claros e os casais devem ser informados sobre os riscos potenciais do procedimento⁽²³⁾.

Neste estudo, tentamos mimetizar o que acontece nos ciclos de baixa complexidade, ou seja, indução

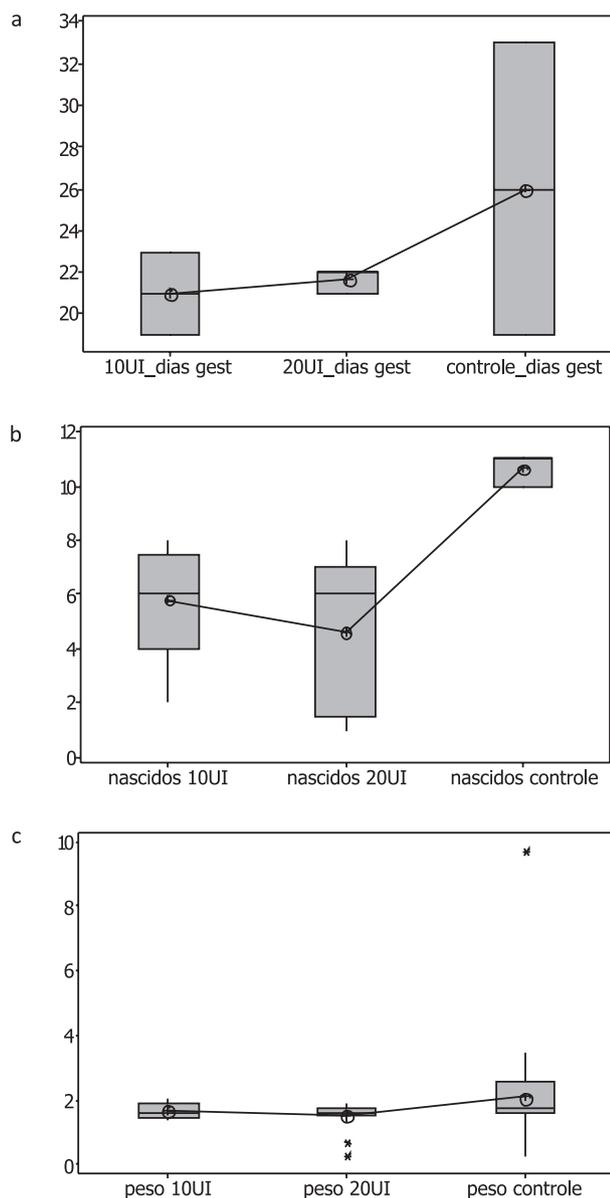


Gráfico 1 – (a) Comparação entre o número de dias (\pm desvio padrão) de gestação nos três grupos estudados (Anova, $p=0,662$); (b) Comparação em relação entre a média (\pm desvio padrão) do número de filhotes nascidos em cada grupo de animais estudado (Anova, $p=0,011$).

da ovulação sem a manipulação de oócitos com fertilização *in vivo*. Não houve diferença significativa quando a duração da gestação, o peso dos filhotes, a ocorrência de mal-formações maiores, o peso e a histologia dos órgãos reprodutivos foram comparados entre os grupos.

No entanto, foi possível notar que um número menor de filhotes nasceu nos grupos A e B, após a indução da ovulação. Provavelmente isto se explica devido ao grande número de folículos com receptores para FSH terem iniciado o processo de desenvolvimento, contudo, sem competência para suportá-lo. A foliculogênese é um processo extremamente complexo no qual várias ondas de seleção folicular, crescimento e atresia acontecem sucessivamente. Dependendo da espécie do animal, a segunda ou terceira onda somente, serão ondas ovulatórias. As demais, apesar de fazerem parte do processo, somente irão originar folículos atrésicos⁽²⁴⁾.

Alguns estudos em bovinos e equinos, entretanto, demonstram que os folículos que se desenvolvem em ondas anovulatórias são similares àqueles que se desenvolvem em ondas ovulatórias. Assim, como folículos subordinados, tem a mesma capacidade de desenvolvimento que folículos dominantes e, quando estimulados, são ovulados e formam oócitos maduros capazes de serem fertilizados⁽²⁵⁾.

Acreditamos que a maior parte dos folículos recrutados durante a ovulação com altas doses de hormônios possam ser oriundas da onda folicular não ovulatória e com isso, não serem capazes de suportar a fertilização e consequentemente, o nascimento de um filhote saudável. Neste estudo, vale salientar que as doses utilizadas para a indução foram duas e quatro vezes, respectivamente, grupo A e B, maiores do que a preconizada nos protocolos convencionais para superovulação em camundongos (5UI).

No entanto, a possibilidade de um possível comprometimento na gestação e na descendência decorrente dos hormônios administrados não pode ser descartada. Ombelet⁽²⁶⁾ em estudo randomizado com grande casuística fizeram uma comparação entre 12.021 gestações únicas após estimulação ovariana, 12.021 gestações únicas espontâneas, 3.108 gestações gemelares após estímulo ovariano e 3.108 gestações gemelares em ciclo natural. Neste estudo observaram maior mortalidade neonatal, aumento no número de distúrbios respiratórios, maior prematuridade e menor peso ao nascimento após estímulo. Esta pesquisa revelou um indicío para o comprometimento independentemente da gemelaridade, relacionado com a estimulação ovariana.

Assim, este estudo nos permite inferir que altas doses de hormônios para indução da ovulação podem comprometer a qualidade dos oócitos de ca-

mundongos quando fecundados naturalmente, com consequente prejuízo no número dos filhotes nascidos por fêmea. A análise histológica complementar não apontou comprometimento nos órgãos reprodutivos dos filhotes.

Referências Bibliográficas

1. Edwards LJ, Kind KL, Armstrong DT, Thompson JG. Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on embryo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288:E845-51.
2. Fowler RE, Edwards RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol*. 1957 15:374-84.
3. Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, et al. Effect of follicle stimulating hormone or human chorionic gonadotrophin treatment on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) during the luteal phase of the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996; 44:169-75.
4. Schoolcraft WB, Hesla JS, Gee MJ. Experience with progesterone gel for luteal support in a highly successful IVF programme. *Hum Reprod*. 2000; 15:1284-8.
5. Sakai N, Endo A. Potential teratogenicity of gonadotropin treatment for ovulation induction in the mouse offspring. *Teratology*. 1987; 36:229-33.
6. Combelles CM, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotrophin stimulation in mouse. *Biol Reprod*. 2003; 68:812-21.
7. Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*. 1996; 46:1191-203.
8. McKiernan SH, Bavister BD. Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos. *Hum Reprod*. 1998; 13:724-9.
9. Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinting genes in midgestation mouse placenta. *Hum Mol Gen*. 2008; 17: 1653-65.
10. Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod*. 2008; 23:2826-34.
11. Shao R, Nutu M, Wejdegard B, Eggecioglu E, Fernandez-Rodríguez J, Karlsson-Lindahl L, et al. Clomiphene citrate causes aberrant tubal apoptosis and estrogen receptor activation in rat fallopian tube: implications for tubal ectopic pregnancy. *Biol Reprod*. 2009; 80:1262-71.
12. Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Pakarinen P, Larsen JJ. Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fisher and Wistar rats. *Reprod Toxicol*. 2003; 17:607-15.
13. Ebling FJ, Brooks AN, Cronin AS, Ford H, Kerr JB. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse: *Endocrinology*. 2000; 141:2861-9.
14. Schieve LA. The promise of single-embryo transfer. *N Engl J Med*. 2006; 354:1190-3.
15. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*. 2001; 16:221-5.
16. van der Auwera I, D, Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod*. 2001; 16:1237-43.
17. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, et al. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum. Reprod*. 2000; 15: 944-8.
18. Sutcliffe G. Health risks in babies born after assisted reproduction. *BMJ*. 2002; 325:117-8.

19. van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod*. 1993; 8:1055-60.
20. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*. 2002; 17:2600-14.
21. Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstet Gynecol*. 2004; 103:1154-63.
22. Devroey P, van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum. Reprod*. 2004; 10:19-28.
23. Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, Correa A, Hobbs CA, Rasmussen SA. National Birth Defects prevention study. Assisted reproduction technology and major structural birth defects in United States. *Hum Reprod*. 2009; 24: 360-6.
24. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11:193-8.
25. Uribe-Velasquez LF, Oba E, Lara-Herrera LC, Souza MIL, Villa-Velásquez H, Trinca LA, et al. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2alfa. *Rev Bras Zootec*. 2002; 31(supl. 2):944-53.
26. Ombelet W. Perinatal outcome of 12 021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: a cohort study. *Hum Reprod*. 2006; 21:1025-32.

Trabalho recebido: 14/10/2009

Trabalho aprovado: 22/11/2010