

**Juliana Stevanato**

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA,  
DOS AMINOÁCIDOS ALANINA E GLUTAMINA E DO  
DIPEPTÍDEO ALANIL-GLUTAMINA NO MEIO DE CULTURA  
DE EMBRIÕES HUMANOS E OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO  
ASSISTIDA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do Título de  
Doutora em Ciências.

SÃO PAULO

2009

Juliana Stevanato

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA,**  
**DOS AMINOÁCIDOS ALANINA E GLUTAMINA E DO**  
**DIPEPTÍDEO ALANIL-GLUTAMINA NO MEIO DE CULTURA**  
**DE EMBRIÕES HUMANOS E OS EFEITOS NA REPRODUÇÃO**  
**ASSISTIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo -  
Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de  
Doutora em Ciências.

Orientador: Profº. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Co-orientador: Profº. Dr. Edson Guimarães Lo Turco

SÃO PAULO

2009

Stevanato, Juliana

**Análise da variação da concentração de amônia, dos aminoácidos alanina e glutamina e do dipeptídeo alanil-glutamina no meio de cultura de embriões humanos e os efeitos na reprodução assistida. /**

Juliana Stevanato -- São Paulo, 2009.

xv, 95 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Urologia.

Título em inglês: Analysis of the variation of the concentrations of ammonium, alanine, glutamine, and alanyl-glutamine in culture medium of human embryos and the effects on assisted reproduction.

1. Aminoácidos. 2. Amônia. 3. Embrião. 4. Fertilização *in vitro*. 5. HPLC.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

**DISCIPLINA DE UROLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Agnaldo Pereira  
Cedenho

**Chefe da Disciplina:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

## *DEDICATÓRIA*

*Aos meus pais Odair Stevanato e Sueli Chiarotti Stevanato que me deram a oportunidade de estudo e sempre me incentivaram.*

*Ao meu noivo Weliky Daniel P. Santos que sempre apoiou meus estudos e minha carreira profissional.*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla** meu orientador, minha profunda gratidão pelos ensinamentos, incentivo, colaboração, paciência, atenção e pela contribuição para a realização desta tese.

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, o meu reconhecimento e gratidão pela confiança depositada e o contínuo incentivo ao desenvolvimento da minha formação científica.

Ao **Prof. Dr. Ivo Lebrun** do Instituto Butantã pela colaboração, atenção e pela contribuição inestimável para a realização desta tese.

Ao **Prof. Dr. Edson Guimarães Lo Turco** meu co-orientador pelos ensinamentos, amizade e contribuição durante a minha jornada científica.

A **Aline Auada** do Instituto Butantã pela colaboração e atenção nas análises das minhas amostras.

Aos meus companheiros de trabalho na Embriologia **Edson Guimarães Lo Turco, Amanda Begatti Victorino e Maria Cristina M. Negrão** pela paciência, colaboração, atenção e amizade essenciais para a finalização deste trabalho.

A **Deborah Montagnini Spaine**, pelo incentivo, confiança e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho e da minha carreira profissional e científica.

As minhas grandes amigas de hoje e sempre **Adriana, Amanda, Paula, Thiesa e Camile** pela amizade, companheirismo e inestimável importância em todos os momentos que passei durante a tese.

A todos os **profissionais da Disciplina de Urologia e do Setor de Reprodução Humana** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu noivo **Weliky Daniel Pereira Santos** pelo incentivo, paciência, amor e atenção que em nenhum momento deixou de me apoiar e estar ao meu lado.

A **minha família** por todo apoio e incentivo na minha vida acadêmica e profissional e em tudo que conquistei até hoje.

A **Deus** por tudo que tenho e conquistei.

*“A iniciativa é uma atitude que concretiza realizações e de realizações nos tornamos digno de sucesso.”*



# SUMÁRIO

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Dedicatória .....                                                                        | v         |
| Agradecimentos .....                                                                     | vi        |
| Lista de figuras .....                                                                   | x         |
| Lista de tabelas .....                                                                   | xi        |
| Lista de abreviaturas e símbolos .....                                                   | xiii      |
| Resumo .....                                                                             | xv        |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1. Aspectos Relevantes relacionados à metabolômica embrionária ....                    | 2         |
| 1.2. A importância dos aminoácidos no desenvolvimento embrionário ...                    | 3         |
| 1.3. Influência da amônia no desenvolvimento embrionário .....                           | 10        |
| 1.4. Análise de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alto<br>Desempenho (HPLC) ..... | 12        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                | <b>14</b> |
| <b>3. MÉTODO .....</b>                                                                   | <b>15</b> |
| 3.1 Desenho do Estudo .....                                                              | 15        |
| 3.2 Protocolo de Estímulo Ovariano .....                                                 | 15        |
| 3.3 Captação dos oócitos e ICSI .....                                                    | 16        |
| 3.4 Cultivo embrionário .....                                                            | 17        |
| 3.5 Análise da morfologia embrionária .....                                              | 17        |
| 3.6 Constituição dos Grupos .....                                                        | 19        |
| 3.7. Análise de Aminoácidos .....                                                        | 19        |
| 3.8 Análise Estatística .....                                                            | 23        |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                               | <b>25</b> |
| 4.1 Agrupadas pela ocorrência ou não de gravidez .....                                   | 25        |
| 4.2 Análises quanto à qualidade embrionária .....                                        | 27        |
| 4.3 Análise quanto ao estímulo administrado .....                                        | 33        |
| 4.4 Análise de regressão logística .....                                                 | 35        |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                | <b>44</b> |
| 5.1 Aminoácidos e produção de amônia .....                                               | 49        |
| 5.2 Aminoácidos e estímulo hormonal .....                                                | 54        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>                                                               | <b>56</b> |
| <b>7. ANEXOS .....</b>                                                                   | <b>57</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                               | <b>65</b> |
| <b>Abstract</b>                                                                          |           |
| <b>Apêndice</b>                                                                          |           |
| <b>Bibliografia consultada</b>                                                           |           |

## Lista de Figuras

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Estrutura básica de um aminoácido.....                                                                                                                                                                                                                                    | 3  |
| <b>Figura 2.</b>  | Estrutura química da glutamina .....                                                                                                                                                                                                                                      | 5  |
| <b>Figura 3.</b>  | Bioquímica do metabolismo da glutamina: 1-glutamato desidrogenase, 2-glutamato oxolacetato, 3-glutamina sintetase, e 4-glutaminase semialdeído desidrogenase.....                                                                                                         | 7  |
| <b>Figura 4.</b>  | Estrutura química da alanina .....                                                                                                                                                                                                                                        | 8  |
| <b>Figura 5.</b>  | Estrutura química do dipeptídeo alanil-glutamina.....                                                                                                                                                                                                                     | 9  |
| <b>Figura 6.</b>  | Estrutura química da molécula de amônia.....                                                                                                                                                                                                                              | 10 |
| <b>Figura 7.</b>  | Esquema de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pelo sistema de gradiente.....                                                                                                                                                                   | 13 |
| <b>Figura 8.</b>  | Cromatograma do padrão utilizado para análise dos seguintes metabólitos: Gln (Glutamina); NH <sub>3</sub> (Amônia); Ala-Gln (Alanil-glutamina) e Ala (Alanina).....                                                                                                       | 23 |
| <b>Figura 9.</b>  | Curva ROC (Receiver Operating Characteristics) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis normalizadas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução e hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH)..... | 37 |
| <b>Figura 10.</b> | Curva ROC ( <i>Receiver Operating Characteristics</i> ) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis absolutas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, e também, idade, evolução e hormônio.....                                     | 39 |
| <b>Figura 11.</b> | Curva ROC ( <i>Receiver Operating Characteristics</i> ) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis normalizadas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia.....                                                                        | 41 |
| <b>Figura 12.</b> | Curva ROC ( <i>Receiver Operating Characteristics</i> ) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis absolutas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, mensurados no HPLC.....                                                       | 43 |
| <b>Figura 13.</b> | Esquema do metabolismo dos aminoácidos alanina, prolina e glutamina relacionada à produção de amônia.....                                                                                                                                                                 | 51 |

## **Lista de Tabelas**

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Idade da mulher, valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia que foram transferidos em ciclos que atingiram (n= 35) ou não (n= 27) .....                                                                                                                                                                                           | 26 |
| <b>Tabela 2.</b>  | Comparação da frequência da ocorrência de gestação em embriões com qualidade morfológica boa e ruim no segundo dia de desenvolvimento (d2).....                                                                                                                                                                                                                                | 27 |
| <b>Tabela 3.</b>  | Idade da mulher, valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos embriões bons (n= 37) e ruins (n= 25) no segundo dia de cultivo (d2).....                                                                                                                                                                              | 28 |
| <b>Tabela 4.</b>  | Comparação da frequência da ocorrência de gestação em embriões com qualidade morfológica boa e ruim no terceiro dia de desenvolvimento (d3).....                                                                                                                                                                                                                               | 29 |
| <b>Tabela 5.</b>  | Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos embriões bons (n= 44) e ruins (n= 18) no terceiro dia de cultivo (d3).....                                                                                                                                                                                              | 30 |
| <b>Tabela 6.</b>  | Comparação da frequência da ocorrência de gestação em embriões com evolução homogênea e heterogênea.....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 31 |
| <b>Tabela 7.</b>  | Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação ao desenvolvimento homogêneo (n= 29) e heterogêneo (n=33) dos embriões do segundo (d2) para o terceiro (d3) dia de cultivo.....                                                                                                                                             | 32 |
| <b>Tabela 8.</b>  | Comparação da frequência da ocorrência de gestação em mulheres que receberam durante o estímulo hormonal FSH ou FSH e LH.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 33 |
| <b>Tabela 9.</b>  | Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos hormônios FSH (n=47) ou FSH e LH (n=15) administrados durante o estímulo folicular.....                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Tabela 10.</b> | Valores normalizados de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução (homogênea ou heterogênea) e hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH) incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance ( <i>odds-ratio</i> ) para engravidar..... | 36 |

## **Lista de Tabelas (continuação)**

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 11.</b> | Valores absolutos de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, e também, idade, evolução e hormônio incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de $\text{Exp}(B)$ são as razões de chance ( <i>odds-ratio</i> ) para engravidar..... | 38 |
| <b>Tabela 12.</b> | Valores normalizados de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia incluída em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de $\text{Exp}(B)$ são as razões de chance ( <i>odds-ratio</i> ) para engravidar.....                                     | 40 |
| <b>Tabela 13.</b> | Valores absolutos de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia incluída em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de $\text{Exp}(B)$ são as razões de chance ( <i>odds-ratio</i> ) para engravidar.....                                        | 42 |

## **Lista de abreviaturas e símbolos**

Ala: Alanina

ATP: Adenosina tri-fosfato

BSA: Albumina sérica bovina

$\beta$ -hCG: Subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana

°C: graus Celsius

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CH: Hidrocarboneto

CO<sub>2</sub>: Gás carbônico

COOH: Grupo carboxila

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

d2: 48 horas de cultivo

d3: 72 horas de cultivo

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIV: Fertilização *in vitro*

FSH: Hormônio folículo estimulante

FTIR: Espectrometria de infravermelho com transformação Fourier

g: Grama

Gln: Glutamina

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

GTP: Guanosina tri-fosfato

H: Hidrogênio

H<sub>2</sub>O: Molécula de água

hCG: Gonadotrofina coriônica humana

HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho

HSA: Albumina sérica humana

HTF: Fluido da tuba uterina humana

ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IUI: Inseminação intra-uterina

LH: Hormônio luteinizante

mm: milímetros

mM: Milimolar  
mUI/mL: miliunidades internacionais por mililitros  
mg: miligramas  
MS: Espectrometria de massa  
mL: Mililitros  
N: Nitrogênio  
NaCl: Cloreto de sódio  
nmol: Nanomoles  
NAD: Dinocleotídeo de nicotinamida e adenina  
NH<sub>2</sub>: Grupo amino  
NH<sub>3</sub>: Amônia  
nm: Nanômetros  
OH: Hidroxila  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
pH: Potencial de hidrogênio  
pmol: Picomoles  
p:v: peso:volume  
q.s.p: Quantidade suficiente para  
RA: Reprodução assistida  
R-OH: Radical hidroxila  
RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear  
SSS: Suplemento substituto do soro  
tR: Tempo de retenção  
μM: Micromolar  
μm: Micrometros  
UI: Unidade internacional  
μL: Micro litros  
UV: Ultravioleta  
v:v: volume:volume

## Resumo

**Objetivo:** verificar a relação entre as concentrações no meio de cultura dos aminoácidos glutamina, alanina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia com a qualidade embrionária, a ocorrência de gravidez e a relação com o estímulo hormonal administrado. **Método:** foi realizado um estudo prospectivo caso controle com o meio de cultura de 62 embriões produzidos por 20 mulheres que foram submetidas ao programa de Reprodução Assistida da UNIFESP. Como critérios de inclusão foram considerados idade (igual ou inferior a 37 anos), de um a quatro embriões transferidos no 3º dia de cultivo, desde que tenha realizado o protocolo da ICSI e que tenham recebido hCG recombinante. Os grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a qualidade morfológica dos embriões no 2º e 3º dia de cultivo, evolução homogênea (embriões classificados como bons no 2º e 3º dia de cultivo) ou heterogênea, hormônio administrado durante o estímulo (FSH ou FSH e LH), e ocorrência ou não de gravidez, avaliada de acordo com o  $\beta$ -hCG sérico. As alíquotas dos meios de cultura foram coletadas após a transferência dos embriões e analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para quantificar os aminoácidos glutamina e alanina, o dipeptídeo alanil-glutamina e amônia presentes em cada amostra. As variáveis numéricas foram comparadas entre os grupos utilizando o teste T de *Student* para amostras não-pareadas (variáveis heterocedásticas foram transformadas), e frequências utilizando Qui-quadrado de *Pearson* ou um teste exato de *Fisher*. Um modelo logístico foi construído utilizando idade das pacientes, hormônios utilizados para a estimulação, qualidade embrionária, e os metabólitos mensurados, uma vez que maximizasse a preditibilidade da ocorrência de gravidez. Os dados estão apresentados como média; desvio padrão. **Resultados:** no grupo de embriões que foram transferidos para mulheres que atingiram a gravidez, quando comparado com aquelas que não atingiram, foram observados níveis menores de glutamina normalizada (1.4; 0.7 e 1.9; 0.7, respectivamente,  $p=0,004$ ) e amônia (0.2; 0.01 e 0.3; 0.1, respectivamente,  $p=0,008$ ). Níveis maiores de alanil-glutamina normalizada foram observados nos embriões com melhor qualidade morfológica no 2º e 3º dia e naqueles com evolução homogênea. Embriões de pacientes que receberam FSH e LH, quando comparados com aquelas pacientes que receberam somente FSH, apresentaram maiores concentrações de alanil-glutamina absoluta (334.9; 95.2 e 282.9; 62.4, respectivamente,  $p=0.017$ ). Na regressão logística, o melhor modelo preditivo para gravidez incluiu todos os valores normalizados de alanina, glutamina, idade, tipo de hormônio na estimulação, e evolução embrionária (77.4%,  $p=0.00005$ ). **Conclusão:** nas condições deste estudo, nossos resultados permitem concluir que, (i) embriões que possuem um desenvolvimento homogêneo e com boa qualidade no segundo e terceiro dia de cultivo embrionário apresentam maior quantidade de alanil-glutamina no meio de cultura, (ii) níveis menores de amônia absoluta e glutamina normalizada no meio de cultura durante o cultivo embrionário estão relacionados com maior ocorrência de gestação e (iii) pacientes que receberam como estímulo hormonal FSH e LH apresentam níveis maiores de alanil-glutamina absoluta no meio de cultura.

**Palavras-chave:** Aminoácidos, Amônia, Embrião, Fertilização *in vitro*, HPLC.

## 1. INTRODUÇÃO

As tecnologias de reprodução assistida permanecem em constantes avanços, desde o nascimento do primeiro indivíduo proveniente de fertilização *in vitro* (FIV) há 30 anos. Com o aumento do uso dessas tecnologias em humanos e em animais, a necessidade de selecionar os melhores embriões a serem transferidos é essencial, pois o alto número de gestações múltiplas, particularmente depois da FIV, é identificado como um problema devido ao alto risco associado à mãe e aos fetos. A redução do número de embriões transferidos é uma forma efetiva de minimizar a incidência de gestação múltipla, mas para isso há a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas de avaliação embrionária pré-transferência, visto que atualmente na maioria dos centros de reprodução assistida, são realizadas apenas avaliações morfológicas em diferentes estádios do desenvolvimento embrionário <sup>(1)</sup>.

Uma análise rápida e precisa da qualidade embrionária é de suma importância para elevar as taxas de gestação a partir da transferência de um único embrião. Entretanto, as avaliações morfológicas estão associadas a uma variabilidade intra e inter-observador, uma vez que a análise morfológica dos embriões não permite avaliar alterações genéticas e metabólicas que só podem ser observadas através de técnicas específicas, como as análises cromossomais de blastômeros e do metaboloma embrionário <sup>(1)</sup>.

A análise ou estudo da metabolômica é uma ferramenta que pode ser utilizada para este fim, e apresenta-se como um dos estudos mais recentes relacionados à avaliação não-invasiva da viabilidade embrionária, que tem como objetivo detectar metabólitos no meio de cultura, os quais podem refletir o quadro fisiológico do embrião através da análise do consumo e produção dos aminoácidos, perfil protéico, consumo de oxigênio entre outros <sup>(2-4)</sup>.

As avaliações morfológicas e genéticas da qualidade embrionária estão intrinsecamente relacionadas com a expressão de metabólitos no meio de cultura e envolvem inúmeros fatores que ainda não foram completamente estabelecidos, portanto merecem destaque no âmbito científico.



## 1.1 Aspectos Relevantes relacionados à metabolômica embrionária

A metabolômica é caracterizada pela avaliação global ou parcial das vias metabólicas ativas de um tecido, órgão ou sistema em um determinado momento de forma não-invasiva. Essa ciência é considerada a ligação entre o genótipo (potencial genético) e o fenótipo (produto dos genes *versus* ambiente e idade) <sup>(1,3-5)</sup>.

Com a análise global dos metabólitos é possível ter uma visão do fenótipo, levando à rapidez de diagnósticos, à melhora no levantamento prognóstico, e à compreensão das vias ativas e dos requerimentos, uma vez que os metabólitos de baixo peso molecular representam os produtos finais dos processos regulatórios celulares, e revelam respostas do sistema biológico para a variedade de influências genéticas, ambientais e de nutrientes pelas quais passam <sup>(1)</sup>.

A maioria das investigações relacionadas à avaliação oocitária e viabilidade embrionária tem como objetivo identificar os metabólitos relacionados ou traçar um perfil para uma classe seletiva, como aminoácidos ou ácidos graxos, o que possibilita um melhor entendimento das exigências metabólicas dos gametas e embriões <sup>(2-4)</sup>.

Nos últimos anos a metabolômica tem demonstrado ser uma tecnologia pós-genômica eficiente e rápida para a análise padrão de amostras biológicas, pois analisa substâncias de constituição química muito variada. Os métodos mais usados para a análise metabolômica são os cromatógrafos acoplados ou não a espectrometria de massa (MS) e as espectroscopias de ressonância nuclear magnética (RMN) e de infravermelho com transformação Fourier (FTIR) <sup>(5)</sup>.

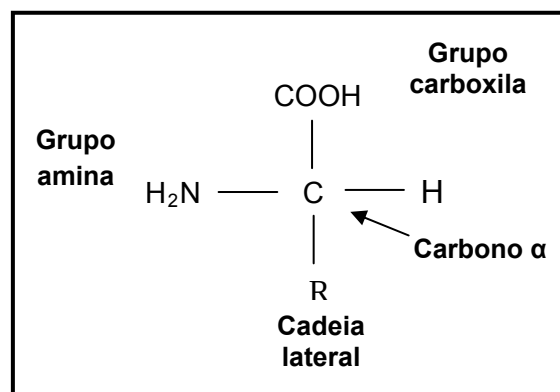
O perfil de uma classe particular de metabólitos (aminoácidos) por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) tem atraído muita atenção, e é proposto como uma forma de seleção não-invasiva do desenvolvimento embrionário pré-transferência <sup>(6,7)</sup>. Brison et al. (2004) realizou um estudo clínico retrospectivo que envolveu 53 ciclos de fertilização *in vitro* com ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozóide), no qual empregou o método da HPLC para a seleção embrionária, baseado na depleção e surgimento de aminoácidos no meio de cultura. A análise por do meio de cultura mostrou que o *turnover* de três aminoácidos (asparagina, glicina e leucina) foi um bom preditor da ocorrência de gravidez clínica e nascimento <sup>(8)</sup>. Os autores ainda demonstraram que outros fatores considerados determinantes para a gravidez não tinham associação, tais como idade materna, reserva ovariana, número

de células embrionárias e grau morfológico dos embriões. Assim, a combinação destas formas de avaliações (número de células, grau morfológico e metabolismo de aminoácidos) poderia, potencialmente, aumentar as chances de selecionar os melhores embriões para a transferência <sup>(3, 8, 9)</sup>.

## 1.2 A importância dos aminoácidos no desenvolvimento embrionário

### 1.2.1 Aminoácidos

Aminoácidos são compostos orgânicos que possuem uma estrutura básica comum, apresentada na Figura 1, que consiste de uma molécula de carbono central denominado carbono  $\alpha$ , a qual possui quatro ligantes diferentes, um grupo carboxila (COOH), um grupo amina (NH<sub>2</sub>) e um radical R também chamado cadeia lateral do aminoácido (que pode consistir desde um único átomo de hidrogênio até complexos anéis aromáticos). As proteínas são formadas a partir de um conjunto de aminoácidos que se diferenciam pelas suas cadeias laterais. Quando presentes em proteínas, os aminoácidos são denominados de resíduos, pois no processo de formação da proteína ocorre a perda de átomos, geralmente uma molécula de água que compunha a estrutura completa do aminoácido <sup>(10)</sup>.



**Figura 1:** Estrutura básica de um aminoácido.

Dependendo da natureza química da cadeia lateral, os aminoácidos podem ser divididos em três classes. A primeira classe compreende os aminoácidos com cadeia lateral estritamente hidrofóbica, isto é, o composto da cadeia lateral não se dissolve em contato com a água (Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina e Prolina). Aminoácidos que possuem cadeia lateral estritamente hidrofílica, isto é, o composto se dissolve em contato com a água, compõem a segunda classe (Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina, Glutamina, Histidina e Argenina). A terceira classe é composta pelos aminoácidos com características polares e apolares, também chamados anfipáticos (Lisina, Tirosina, Metionina e Triptofano) <sup>(11,12)</sup>.

Os aminoácidos, com base na forma como são adquiridos, podem ser classificados em dois tipos: essenciais ou não essenciais. Considera-se essenciais, ou indispensáveis, aqueles que o nosso organismo não tem capacidade de sintetizar, logo, a única forma de que dispomos para obtê-los, é através da ingestão de determinados alimentos, como: carne, ovos, leite e seus derivados, dentre eles estão: arginina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, serina, treonina, triptofano e valina <sup>(13)</sup>.

Quanto aos aminoácidos não essenciais, são aqueles que o nosso organismo consegue produzir. Assim, destacamos alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína, glicina, glutamina, hidroxiprolina, prolina, serina e tirosina <sup>(13)</sup>.

### **1.2.2 Aminoácidos e cultivo embrionário**

Os aminoácidos participam ativamente do desenvolvimento embrionário, como precursor dos processos biossintéticos, na síntese de proteínas e nos processos metabólicos. Além disso, possuem grande importância nos meios de cultura, como agentes quelantes, osmorreguladores, tampões de pH, antioxidantes, reguladores do metabolismo energético e como substratos energéticos <sup>(14)</sup>.

O requerimento básico dos embriões durante o cultivo inclui uma mistura de sais fisiológicos, uma fonte energética, e uma fonte de nitrogênio a partir de uma macromolécula como albumina sérica bovina (BSA), albumina sérica humana (HSA) ou suplemento substituto do soro (SSS). Na ausência de uma fonte alternativa de proteínas, pressupomos que qualquer síntese protéica durante o desenvolvimento inicial do embrião no meio de cultura é com a utilização de aminoácidos presentes no

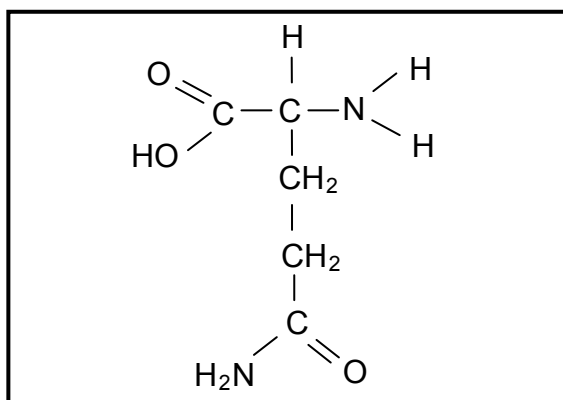
meio <sup>(15)</sup>.

Os embriões podem se desenvolver na ausência de aminoácidos exógenos, uma vez que já possui em seu material intracelular um *turnover* protéico que não aumenta até a fase de blastocisto. No entanto, é provável que todas as proteínas presentes no pré-embrião são alteradas dentro das primeiras 72 horas de cultivo e, por isso, a ausência de aminoácidos pode promover alterações no desenvolvimento embrionário <sup>(16,17)</sup>. Epstein e Smith (1973) demonstraram que aminoácidos exógenos são incorporados pelas proteínas durante o desenvolvimento inicial de embriões de camundongos <sup>(18)</sup>.

No entanto, as primeiras quantificações de aminoácidos consumidos por embriões em cultivo, foram reportadas por Gardner et al. (1989) que utilizaram uma técnica modificada não-invasiva por ultramicrofluorimetria de Leese et al. (1984) <sup>(19,20)</sup>. Os dados mostraram decréscimo no consumo de glutamina por embriões de camundongo durante as primeiras clivagens, o que não foi observado no estágio de blastocisto onde o consumo foi elevado.

### 1.2.3 Glutamina

A glutamina (Gln) é um aminoácido não essencial e, como tal, pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. Sua massa molecular é de 147,1 Da e na sua composição química encontram-se: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,9%) (Figura 2) <sup>(13)</sup>.



**Figura 2:** Estrutura química da glutamina.

A glutamina está presente em muitas proteínas e é o aminoácido mais abundante no plasma e tecidos. Em humanos, a glutamina representa por volta de 20% do total de aminoácidos livres no plasma, com concentrações que variam de 0,5 a 0,9mM. Junto com a alanina (Ala), representa aproximadamente 80% dos aminoácidos liberados do músculo esquelético <sup>(21)</sup>. Apesar de não ser um aminoácido essencial, em situações especiais como trauma, septicemia, câncer e, eventualmente, no esforço físico extremo, as concentrações intracelulares e plasmáticas desse aminoácido diminuem em até 50%. Assim, quando a demanda é maior que a produção, estabelece-se um quadro de deficiência de glutamina. Por esta razão, este aminoácido foi recentemente reclassificado como “condicionalmente essencial” <sup>(22,23)</sup>.

A glutamina pode ser sintetizada em vários tecidos a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato e glutamato via glutamato aminotransferase e glutamina sintetase, ambas, enzimas citosólicas (Figura 3).

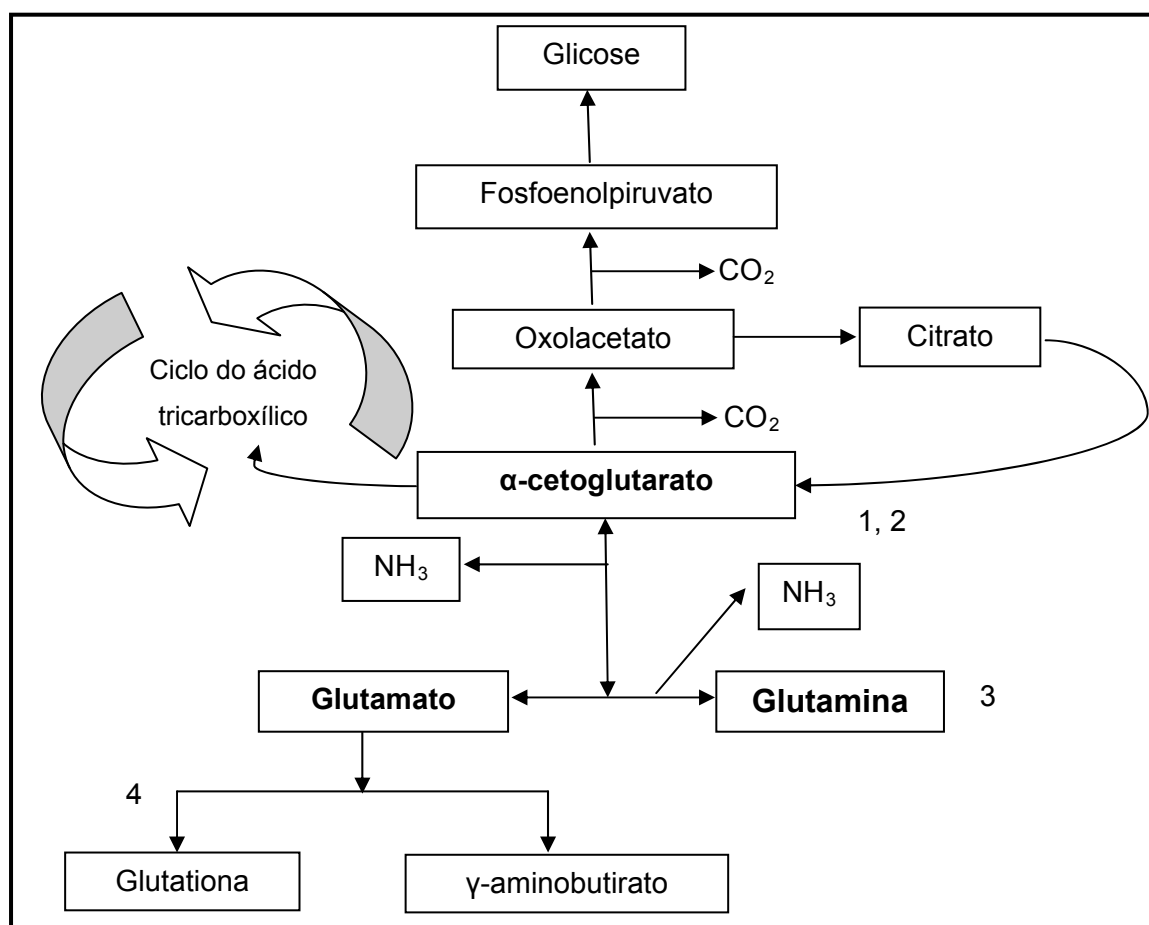
A concentração intracelular de glutamina varia entre 2 e 20mM (dependendo da natureza da célula) e sua concentração extracelular é de aproximadamente 0,7 mM <sup>(24)</sup>. A glutamina desempenha uma série de papéis fisiológicos importantes que incluem: (1) transferência de nitrogênio entre órgãos, (2) detoxificação da amônia e manutenção do equilíbrio ácido-básico durante a acidose, (3) precursor de nitrogênio para a síntese e degradação protéica <sup>(25-27)</sup>; (4) substrato energético para as células do sistema imune, em particular macrófagos e linfócitos, e também enterócitos (células da mucosa intestinal). Estudos *in vitro* sugerem que a diminuição da concentração da glutamina plasmática pode afetar e comprometer o funcionamento dessas células <sup>(26)</sup>.

A glutamina é um dos aminoácidos mais importantes para o processo metabólico das células, por isso é comumente adicionada ao meio de cultura embrionário. Pode ser metabolizada e convertida a glutamato pela glutamina sintetase e então para  $\alpha$ -cetoglutarato na qual pode ser oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de *Krebs*) para gerar ATP, que é de grande importância no início do desenvolvimento embrionário <sup>(28)</sup>. Carney and Bavister (1987) e Chanot et al. (1989) foram os primeiros a demonstrar que a adição exclusivamente de glutamina ao meio de cultura embrionário de ratos e *hamster* exercia efeitos benéficos no desenvolvimento até o estágio de blastocisto <sup>(29,30)</sup>. O metabolismo oxidativo da glutamina foi relatado em embriões de ratos <sup>(30)</sup>, bovinos <sup>(31,32)</sup>, porcos <sup>(33)</sup> e humanos <sup>(34)</sup>, onde a inserção de glutamina aumenta significativamente a formação de blastocistos.

Além das já citadas, a glutamina possui também outras funções, como:

fornecer carbono e nitrogênio para a síntese de purina, pirimidina, guanosina tri-fosfato (GTP) e NAD <sup>(15)</sup>, proteção contra o estresse oxidativo <sup>(35)</sup>, age como uma osmorreguladora orgânica <sup>(36)</sup> e como suposta reguladora do metabolismo da glicose <sup>(37)</sup>.

No entanto há um potencial inconveniente relacionado ao uso desse aminoácido no meio de cultura embrionário, pois uma vez que é quimicamente instável, sofre quebras espontâneas em quantidades equimolares de amônia e ácido carboxílico da pirrolidona, no qual podem ser deletérios ao desenvolvimento embrionário <sup>(38)</sup>.

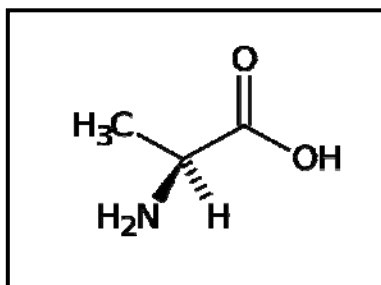


**Figura 3:** Bioquímica do metabolismo da glutamina: 1-glutamato desidrogenase, 2-glutamato oxolacetato, 3-glutamina sintetase e 4-glutaminase semi-aldeído desidrogenase.

### 1.2.4 Alanina

A alanina (Ala) é o nome comum para o ácido 2-aminopropanóico, um aminoácido não-essencial, cristalino formado por hidrólise de proteína (quebra de moléculas de proteína em meio aquoso). O grupo variável ligado ao carbono  $\alpha$ , que distingue um aminoácido de outro, é nesse caso um grupo metilo. Esse grupo confere um carácter hidrofóbico à alanina, classificando-se esta como aminoácido alifático. Pela mesma razão, é estruturalmente um dos aminoácidos mais simples (Figura 4) <sup>(39)</sup>.

A transferência de um grupo amina para o piruvato resulta na síntese de alanina *in vivo*. Assim, a alanina possui uma relação próxima a vias metabólicas como a glicólise, a gliconeogênese e o ciclo do ácido tricarboxílico <sup>(39)</sup>.



**Figura 4:** Estrutura química da Alanina.

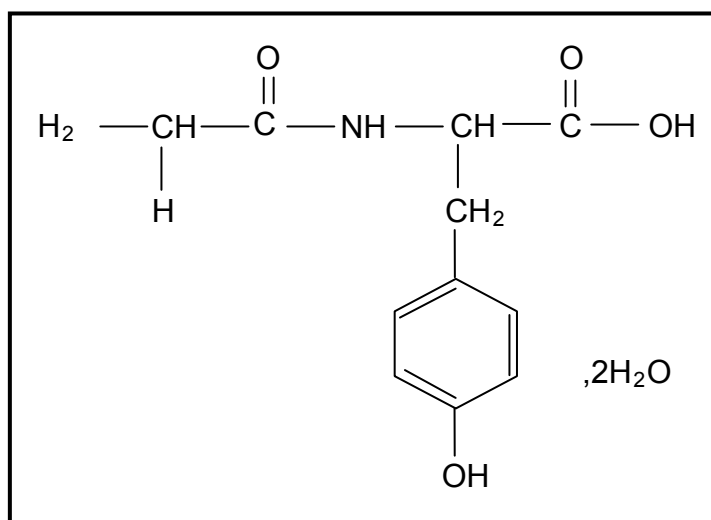
Já a suplementação com alanina oferece benefícios adicionais devido a sua ação osmorreguladora intracelular <sup>(40)</sup> ou reguladora de pH <sup>(41)</sup>.

Partridge e Leese (1996) quantificaram a depleção e o aparecimento de aminoácidos em grupos de embriões bovinos *in vitro* e *in vivo* em diferentes estádios de desenvolvimento. Esses autores observaram que durante a fase de zigoto somente a glutamina sofria significativa depleção. Já no estágio de quatro células, treze aminoácidos eram utilizados em grandes quantidades e no estágio de blastocisto somente quatro. Outra observação consistente foi que em todos os estádios de desenvolvimento houve o aparecimento de alanina no meio de cultura, o que sugere um papel importante desse aminoácido como meio de exportação dos íons amônia produzidos <sup>(42)</sup>, uma vez que os embriões não possuem um ciclo de uréia funcional <sup>(9,43)</sup>. Em outro estudo, Orsi e Leese (2004) mostraram que a ausência de piruvato altera o perfil dos aminoácidos, particularmente na produção de alanina, o que sustenta a idéia de que a diminuição de sua produção é uma forma de dispor os íons amônia no meio de cultura <sup>(44)</sup>.

### 1.2.5 Alanil-glutamina

Nos últimos anos, grande parte das empresas que produzem meios de cultura embrionário está substituindo o aminoácido glutamina pelo dipeptídeo alanil-glutamina, uma vez que o dipeptídeo apresenta maior estabilidade e menor solubilidade em água (Figura 5) <sup>(45)</sup>.

Embora a glutamina seja totalmente transitória em cultura, pode ser substituída por um dipeptídeo estável como a alanil-glutamina ou glicil-glutamina, que possuem o efeito benéfico da glutamina sem o problema da formação da amônia. Portanto, com o aumento das evidências dos efeitos inibitórios e tóxicos da amônia para os embriões em cultivo, é de extrema importância que o meio utilizado nos laboratórios de fertilização *in vitro* substitua a glutamina por um dipeptídeo estável capaz, principalmente, de proteger o embrião contra o estresse oxidativo e preservar a viabilidade e qualidade celular <sup>(14)</sup>.



**Figura 5:** Estrutura química do dipeptídeo alanil-glutamina.

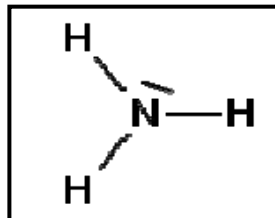


### 1.3 Influência da amônia no desenvolvimento embrionário

#### 1.3.1 Amônia

O amoníaco, gás amoníaco ou amônia é um composto químico cuja molécula é constituída por um átomo de nitrogênio (N) e três átomos de hidrogênio (H) de fórmula  $\text{NH}_3$  (Figura 6). É um gás incolor à temperatura ambiente, possuindo odor muito forte.

A amônia é um importante metabólito presente nos mamíferos, devido o seu papel essencial na regulação ácido-básica e na biosíntese das purinas, pirimidinas e dos aminoácidos não-essenciais. Surge pela desaminação dos aminoácidos no fígado, como um metabólito na excitação do nervo e na atividade muscular, e no aparelho gastrointestinal pela quebra enzimática de componentes do alimento com o auxílio da flora bacteriana. Aproximadamente 99% da amônia produzida são absorvidas do aparelho gastrointestinal e transportadas ao fígado, onde é incorporada na uréia como parte do ciclo da uréia. A uréia no fígado é absorvida pelo sangue, transferida ao rim, e excretada na urina, desta, dois terços originam do epitélio tubular do rim onde, como um produto da reação da glutaminase, mantém o equilíbrio ácido-básico pela retirada de íons hidrogênio <sup>(47)</sup>.



**Figura 6:** Estrutura química da molécula de amônia

#### 1.3.2 Amônia e cultivo embrionário

A adição de aminoácidos específicos no meio de cultura facilita o desenvolvimento embrionário. Contudo, o efeito benéfico decresce com a duração do cultivo, já que a utilização dos aminoácidos pelo embrião produz níveis elevados de amônia, que por sua vez inibe o desenvolvimento até o estágio de blastocisto e suas clivagens <sup>(48)</sup>.

Durante a cultura *in vitro*, os embriões são expostos a condições estáticas e por

isso depende do meio de cultivo e das condições biofísicas do sistema de cultura, que podem ser alteradas pelo aparecimento de substâncias tóxicas, como a amônia. Segundo Lane e Gardner (2003), o acúmulo de amônia no meio de cultura de embriões de camundongos pode proporcionar muitos danos, dentre eles: diminuição do desenvolvimento até blastocisto, *déficit* no metabolismo embrionário, regulação do pH e na expressão dos genes, além de alterações no desenvolvimento fetal <sup>(49)</sup>. Orsi e Leese (2004) demonstraram que a exposição da amônia afeta negativamente o metabolismo dos aminoácidos nos blastocistos bovino *in vitro* <sup>(44)</sup>.

Uma das conseqüências da presença dos aminoácidos nos meios de cultura, particularmente da glutamina, é a quebra espontânea a 37°C para a produção de amônia em solução aquosa <sup>(50)</sup>. Os níveis de amônia que são produzidos por um meio que contém glutamina (1mM) incubado a 37°C por um período de 24 horas são significativamente maiores do que foi demonstrado como prejudicial ao desenvolvimento embrionário. Apesar de alguns autores demonstrarem que mesmo com níveis altos de amônia (300µM) o embrião pode se desenvolver até o estágio de blastocisto, não significa que os blastômeros e conseqüentemente os embriões tenham qualidade <sup>(29,51,52)</sup>.

Gardner e Lane (1994) sugeriram que a presença de altas concentrações de amônia no meio de cultura induz o nascimento de ratos com anormalidades congênitas como anencefalia, que pode estar relacionado à presença de glutamina no meio de cultura como precursora dessa toxicidade <sup>(53)</sup>.

Zander et al. (2006) observaram os efeitos da amônia em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de camundongos, que mostrou uma significativa redução na capacidade de implantação, aumento da perda fetal após implantação, diminuição do desenvolvimento a termo e do peso ao nascer, em relação ao controle sem adição de amônia <sup>(52)</sup>. Outro estudo demonstrou que os níveis de amônia produzidos durante a incubação no meio de cultura com glutamina inibem o desenvolvimento de blastocistos humanos *in vitro* <sup>(54)</sup>.

Ainda há muitas controvérsias relacionadas aos efeitos tóxicos da amônia sobre os embriões humanos, como também a indução de anormalidades congênitas que ela pode gerar. De qualquer maneira, é importante o desenvolvimento de estratégias que diminuam a produção desta molécula no meio de cultura, como a utilização de dipeptídeos mais estáveis em solução aquosa que não irão atuar como precursores de amônia.

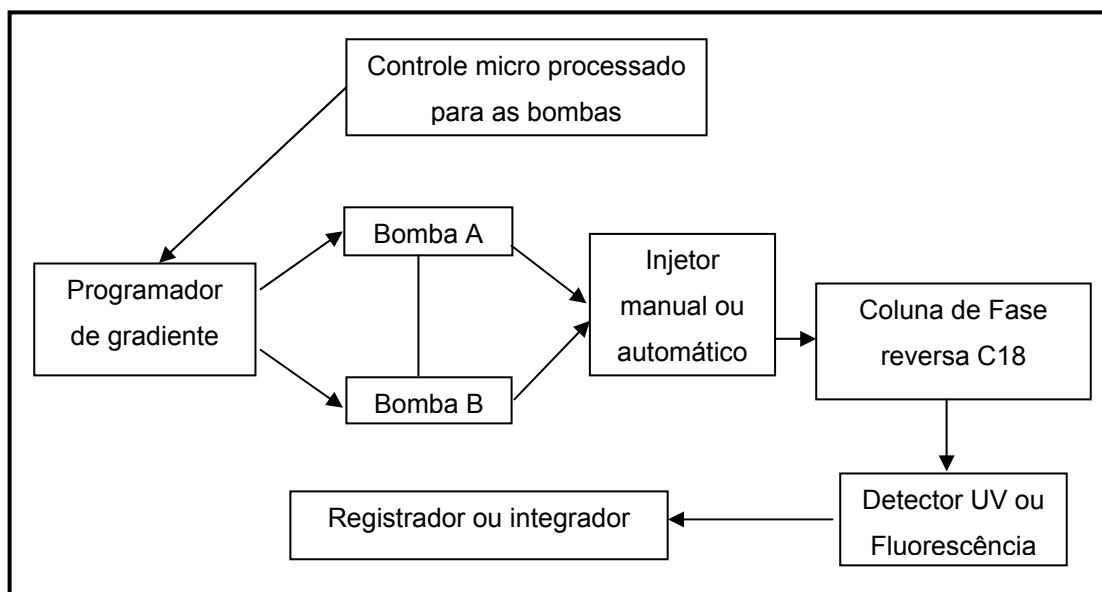
#### **1.4 Análise de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)**

A análise de aminoácidos através da HPLC com detecção no UV-visível é uma das técnicas mais utilizadas para análise metabólica de um material biológico que contenha proteínas, peptídeos ou mesmo aminoácidos livres, por ser um método qualitativo e quantitativo. A caracterização geralmente é feita comparando-se o perfil dos espectros de absorção no UV e o tempo de retenção ( $t_R$ ), com os padrões autênticos ou com padrões específicos da amostra analisada <sup>(55)</sup>.

Dentre as técnicas analíticas de separação, a HPLC é amplamente utilizada, por possuir alta sensibilidade e especificidade, fácil adaptação em determinações quantitativas acuradas, baixo custo em relação a outras técnicas, adequação a separações de espécies não voláteis ou termicamente instáveis e ampla aplicabilidade a diferentes substâncias. Dependendo do detector pode atingir sensibilidade de até 1-2 nmoles ou se o sistema estiver otimizado de até 20 a 50 pmoles <sup>(56)</sup>.

Para a análise de aminoácidos em uma determinada amostra biológica é necessário um preparo prévio que consiste normalmente em duas etapas sequenciais: hidrólise (digestão ácida do material) e derivatização que vai possibilitar através do acoplamento com um cromóforo ou fluoróforo a identificação do aminoácido em determinadas condições. Após essas etapas o material é aplicado no sistema de cromatografia e o resultado é comparado com um padrão de aminoácidos de concentração conhecida.

Existem vários equipamentos para a realização da técnica, sendo que basicamente um sistema de HPLC (figura 7) consiste de um reservatório, sistema de bombeamento da fase móvel, injetor, coluna, detector e um registrador de dados <sup>(56)</sup>.



**Figura 7:** Esquema de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pelo sistema de gradiente.

Pouco se sabe sobre o perfil metabólico ideal compatível com alta qualidade embrionária e conseqüente viabilidade gestacional, como também sobre as diferentes funções de todos os componentes do meio de cultura no desenvolvimento embrionário. Contudo, a tecnologia desenvolvida para a análise de metabólitos é cada vez mais promissora e permite que muitos estudos sejam voltados ao melhor entendimento e caracterização de metabólitos que ainda não foram totalmente elucidados <sup>(6,57,58)</sup>.

## **2. OBJETIVO**

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Verificar a relação entre as concentrações, no meio de cultura, dos aminoácidos glutamina, alanina, do dipeptídeo alanil-glutamina e do subproduto amônia e a qualidade do desenvolvimento de embriões humanos cultivados por 72 horas;
2. Verificar a relação entre as concentrações, no meio de cultura, dos aminoácidos glutamina, alanina, do dipeptídeo alanil-glutamina e do subproduto amônia e a ocorrência de gravidez;
3. Verificar a relação entre as concentrações, no meio de cultura, dos aminoácidos glutamina, alanina, do dipeptídeo alanil-glutamina e do subproduto amônia e o estímulo hormonal ovariano (FSH ou FSH e LH).

### **3. MÉTODO**

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) (nº do processo 0535/08). Todas as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1).

#### **3.1 Desenho do Estudo**

Foi realizado um estudo prospectivo caso controle com o meio de cultura de 62 embriões produzidos por 20 mulheres (consecutivas) que foram submetidas ao programa de Reprodução Assistida da UNIFESP.

Como rotina do ambulatório do Setor de Reprodução Humana, essas pacientes foram avaliadas clínica e laboratorialmente e, dependendo da causa da infertilidade do casal, direcionadas ao tratamento com análogo agonista ou antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) para otimizar a sua resposta ovariana, proporcionando uma maior recuperação de gametas. Para esse estudo, foram incluídas apenas pacientes direcionadas ao tratamento com análogo antagonista de GnRH.

Como critérios de inclusão foram considerados o meio de cultura embrionário de pacientes com idade igual ou inferior a 37 anos que receberam de um a quatro embriões transferidos no 3º dia de cultivo, independente da causa de infertilidade, desde que tenha realizado o protocolo da Injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e que tenham recebido gonadotrofina coriônica humana (hCG) recombinante (Ovidrel® Merk Serono, Darmstadt, Germany).

#### **3.2 Protocolo de Estímulo Ovariano**

As pacientes do Programa de Fertilização *in vitro* desta Universidade foram submetidas a um de dois protocolos de estímulo ovariano controlado de acordo com a orientação médica. Para um dos estímulos foi administrado, a partir do 3º dia do ciclo menstrual, hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) (Gonal F®) (Merk Serono, Darmstadt, Germany) na dose de 225 UI diariamente e, para o segundo

estímulo, além do FSH recombinante (225 UI) as pacientes recebiam uma dose adicional de 75 UI de hormônio luteinizante (LH) e FSH, (Merional<sup>®</sup>, Meizler, Suíça ou Menopur<sup>®</sup>, Ferring, EUA) altamente purificado. Foram realizadas ultra-sonografias seriadas a partir do 5º dia do ciclo para verificação do crescimento folicular e endometrial.

Quando ao menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 14 mm foi observado, introduziu-se o antagonista de GnRH (Cetrotide<sup>®</sup>, Merk Serono, Darmstadt, Alemanha) na dose de 0,25 mg diárias, via subcutânea. Após o surgimento de pelo menos um folículo com diâmetro maior ou igual a 17 mm foi administrado o hCG recombinante (Ovidrel<sup>®</sup> Merk Serono, Darmstadt, Germany) na dose de 6.500 UI (250 µg). Após 35 horas da administração do hCG, foi realizada a cirurgia para punção dos folículos ovarianos e aspiração do conteúdo folicular, por via vaginal, dirigida por ultra-sonografia.

### **3.3 Captação dos oócitos e ICSI**

Para a obtenção dos oócitos, as pacientes foram submetidas à punção-aspiração dos folículos ovarianos sob anestesia no centro cirúrgico do Hospital São Paulo.

Os tubos contendo os líquidos foliculares, após a aspiração dos folículos, eram levados para o laboratório de Fertilização *in vitro*, situado no próprio centro cirúrgico. O líquido folicular de cada folículo foi cuidadosamente examinado à procura dos oócitos. Após esse exame, os oócitos encontrados eram mantidos durante 3 (três) horas em estufas (Forma Scientific<sup>®</sup> – modelo 3110) com ambiente controlado a 6% de CO<sub>2</sub> em ar, 90% de umidade e a 37° C para que ocorra a estabilização dessas células no meio de cultura ECM com gentamicina (anexo 2) (*Early Cleavage Medium* [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]), suplementado com 10% v:v de Suplemento substituto do soro (SSS [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]) (anexo 3).

Após esse período foi realizada a denudação dos oócitos para a retirada das células da granulosa (complexo *cumulus* – corona), através da adição de hialuronidase (0,08% p:v em HTF com HEPES [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]) e com o auxílio de duas pipetas de denudação com calibres de 170µm e 130µm respectivamente (Cook<sup>®</sup> Urological Inc., Indiana, EUA).

Os oócitos denudos foram classificados em imaturo quando apresentavam vesícula germinativa ou se não possuíam o primeiro corpúsculo polar, maturo se não apresentavam vesícula germinativa e possuía o primeiro corpúsculo polar (metáfase II da meiose) e degenerado se apresentavam alterações morfológicas graves. No máximo quatro gametas classificados como maduros foram utilizados na rotina do laboratório de fertilização *in vitro* (fertilização) e os restantes foram descartados. Após o procedimento da ICSI, as células foram colocadas em gotas de meio de cultura próprio para o desenvolvimento embrionário, onde permaneceram até a transferência dos embriões. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo embriologista.

### **3.4 Cultivo embrionário**

Para o cultivo embrionário foi utilizado o meio de cultura ECM com gentamicina (anexo 2) (*Early Cleavage Medium* [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]), suplementado com 10% v:v de Suplemento substituto do soro (SSS [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]) (anexo 3), preparado um dia antes da captação dos oócitos (mantidos em estufa controlada para a estabilização) em gotas de 100µl para oócitos e 50µl para pré-embriões, essas que permaneciam sob óleo mineral estéril (Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA). As gotas de meio de cultura foram preparadas em placas de poliestireno tratadas e estéreis de 35 mm x 10 mm (Corning<sup>®</sup>, Nova York, EUA). Cada embrião foi cultivado em uma única gota.

O meio de cultura onde os embriões foram cultivados foi utilizado para a técnica da avaliação por HPLC. Esse meio foi utilizado apenas após a transferência dos embriões que foram cultivados nele, que em condições normais, seriam descartados.

### **3.5 Análise da morfologia embrionária**

Para a avaliação morfológica dos embriões bons e ruins no segundo (d2) e terceiro (d3) dia de cultivo foram utilizados os critérios da rotina do laboratório de fertilização *in vitro* da UNIFESP com a utilização de um microscópio óptico invertido (Nikon<sup>®</sup> eclipse T2000-U) com uma placa aquecedora acoplada à 37° C (Tokai Hit<sup>®</sup> modelo: MARTS- SMZUT) (Quadros 1 e 2).



**Quadro 1:** Número de blastômeros dos embriões bons e ruins no segundo (d2) e terceiro (d3) dia de desenvolvimento.

| Embrião d3 (72 horas)      | Embrião d2 (48 horas)  |
|----------------------------|------------------------|
| Bom<br>(7 - 9 blastômeros) | Bom<br>(4 blastômeros) |
| Ruim*                      | Ruim*                  |

\*Ruim: número de células maior ou menor que o estabelecido

**Quadro 2:** Características morfológicas de embriões bons e ruins no segundo (d2) e terceiro (d3) dia de desenvolvimento.

| Embriões d2 e d3    | Características morfológicas |                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Bom</u></b>   | <u>Grau IV</u>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 10% de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração clara e sem granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos simétricos.</li> </ul>                    |
|                     | <u>Grau III</u>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 10 a 20% de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração clara e pouca granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos levemente assimétricos.</li> </ul> |
| <b><u>Ruim*</u></b> | <u>Grau II</u>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Até 20 a 50% de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração escura e granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos assimétricos.</li> </ul>                |
|                     | <u>Grau I</u>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mais de 50% de fragmentação;</li> <li>• Blastômeros com coloração escura e granulação;</li> <li>• Blastômeros com tamanhos assimétricos.</li> </ul>                 |

\*Independente do número de blastômeros grau I e II são considerados ruins.

### **3.6 Constituição dos Grupos**

Os grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a qualidade morfológica dos embriões no segundo e terceiro dia de cultivo, evolução embrionária homogênea (embriões classificados como bons no 2º e 3º dia de cultivo) ou heterogênea (embriões classificados como ruins no 2º e/ou 3º dia de cultivo), idade da mulher e hormônio administrado durante o estímulo (FSH ou FSH e LH). A gravidez foi avaliada de acordo com o  $\beta$ -hCG sérico medido 15 dias após a transferência embrionária, baseado em cada embrião, sendo considerado positivo quando maior que 25 mUI/mL.

As alíquotas dos meios de cultura foram analisadas por HPLC (por um procedimento cego) para quantificar os aminoácidos glutamina e alanina, o dipeptídeo alanil-glutamina e amônia presentes em cada amostra. Após a coleta dos dados, a análise foi realizada através da subdivisão nos seguintes subgrupos: (i) de acordo com a ocorrência de  $\beta$ -hCG positivo ou negativo; (ii) de acordo com a qualidade embrionária no 2º dia; (iii) de acordo com a qualidade embrionária no 3º dia; (iv) de acordo com a homogeneidade da evolução; e (v) de acordo com o estímulo hormonal.

### **3.7 Análise de Aminoácidos**

#### **3.7.1 Preparo da Amostra**

O meio de cultura contido em cada gota de 50 $\mu$ L foi coletado (somente no 3º dia de cultivo) separadamente logo após a transferência dos embriões e colocado em tubos de micro-centrífuga estéril e identificado com a qualidade de cada embrião que foi cultivado. Além das gotas onde foram cultivados os embriões, sempre era coletada uma gota sem embrião que passou pelas mesmas condições das demais durante os três dias de cultivo para ser utilizada como valor do branco para normalização. As amostras foram armazenadas em freezer a -20º C até o momento da análise. Para a determinação da concentração dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia foi utilizado o método de HPLC, comparando os resultados com os valores de concentração pré-determinados obtidos dos padrões.

### 3.7.2 HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho)

As concentrações dos aminoácidos alanina, glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia presentes nos meios de cultura foram determinadas através da derivatização dos aminoácidos com fenilisotiocianato (Sigma<sup>®</sup> – P-1034) e identificação por cromatografia em um HPLC modelo *HP Hewlett-Packard 1100 series*, com a utilização de uma coluna com sílica ultra-pura *ACE<sup>®</sup> HPLC Columns 3, C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm* (Apêndice 1 - fotos). A comparação foi efetuada com uma solução padrão de aminoácidos de concentração conhecida, de acordo com o método de Heinrikson e Meredith <sup>(59)</sup>.

### 3.7.3 Padrões

A comparação foi efetuada com uma solução padrão dos aminoácidos analisados (Glutamina e Alanina) e do metabólito amônia de concentração conhecida, adquiridos no departamento de bioquímica do Instituto Butantã (USP). Prepararam-se soluções aquosas destes padrões nas concentrações de 2.500µM para os aminoácidos e 25µM para a amônia de acordo com o método de Heinrikson e Meredith <sup>(59)</sup>.

### 3.7.4 Derivatização

Para a reação de derivatização foi preparado um reagente específico no momento da utilização (q.s.p.), que consistia de: 70% de Etanol (Merk), 10% de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>), 10% de trietilamina e 10% de fenilisotiocianato (v:v:v:v). Homogeneizava a mistura no agitador de tubos *vortex* e aguardava 12 minutos em repouso para a utilização. Essa solução poderia ser utilizada em um período máximo de 12 horas devido a sua baixa estabilidade.

O processo de derivatização consiste no acoplamento do fenilisotiocianato ao NH<sub>2</sub> do aminoácido. Para isso, com a utilização de uma seringa *Hamilton<sup>®</sup>* de 100µL retirava-se 20µL da amostra, 20µL do reagente de derivatização e colocava-se em outro micro tubo estéril deixando em repouso por 15 minutos. Após esse período era acrescentado 60µL de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>), e ficava mais 15 minutos em repouso.

Após esse período eram injetados manualmente 50µL da amostra preparada no sistema do HPLC.

Para o padrão foi realizado o mesmo preparo anterior, mas no lugar da amostra foi acrescido 50µL do padrão, 30µL do reagente de derivatização e 20µL de água padrão cromatográfico.

### **3.7.5 Separação dos aminoácidos por HPLC**

A separação dos aminoácidos foi realizada através de um equipamento de HPLC equipado com uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm) pelo sistema de gradiente (duas bombas). A temperatura foi estabelecida em 37°C, uma vez que o aquecimento da coluna permite uma resolução melhor (separação) entre os picos de cada aminoácido. O tempo e o gradiente de análise foram estabelecidos no equipamento para 21 min e detecção a 254nm por amostra, de forma que era possível identificar os picos específicos de cada composto e a sua concentração de forma mais precisa nos gráficos emitidos (anexo 4).

Antes de iniciar a corrida das amostras no HPLC era verificado a reprodutibilidade da curva padrão com os tempos de retenção e os coeficientes inter-ensaios, estes que não foram significantes para alterar os resultados entre as amostras.

Utilizou-se na eluição dos aminoácidos, um sistema de gradiente de acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha), com as fases móveis polares constituídas de:

**Solução A:** 440mL de solução estoque (anexo 5);  
60mL de acetonitrila.

**Solução B:** 100mL de água milli-Q;  
400mL de acetonitrila;  
100µL solução de EDTA (Sigma® – E-9884) (anexo 5).

### 3.7.6 Identificação e cálculo do conteúdo de aminoácidos

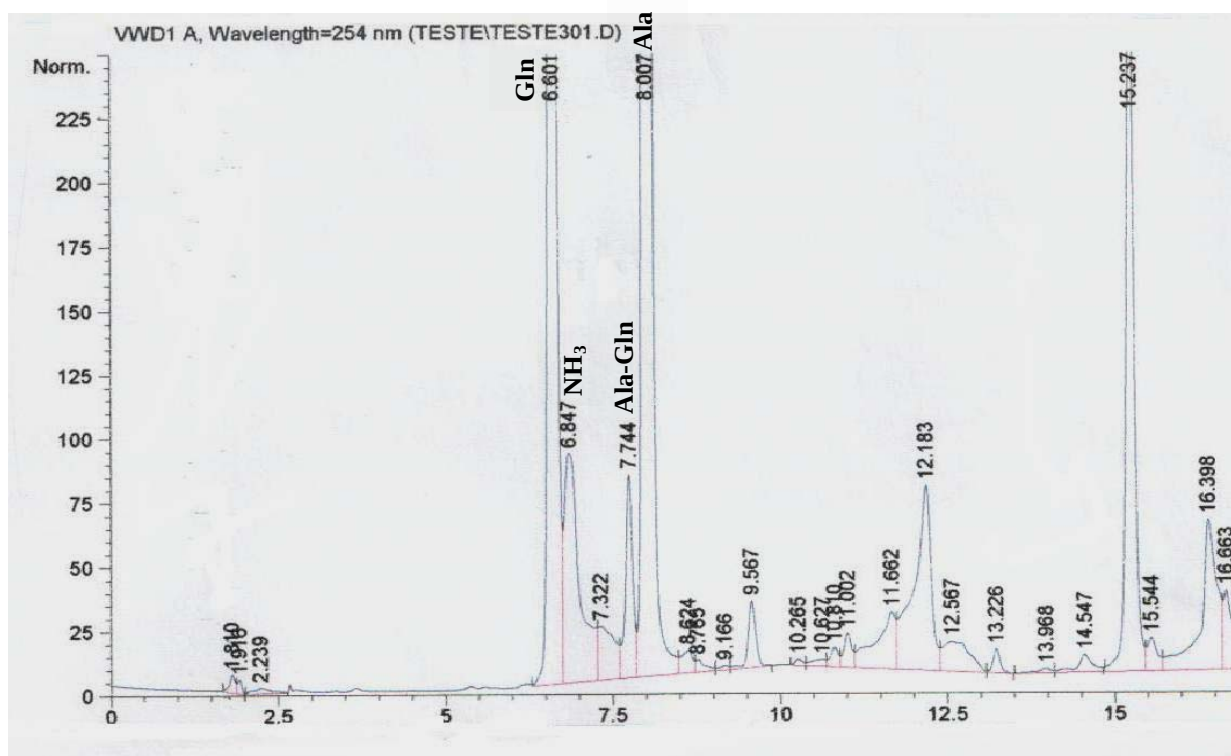
Após a confecção do cromatograma da amostra e do padrão (figura 8) que serviu como referência, foi efetuada a identificação de cada um dos aminoácidos, baseada no tempo de retenção de cada um e na área do pico obtida na amostra em comparação ao padrão utilizado.

A fórmula geral para o cálculo foi:

$$\frac{\text{Área do aminoácido da amostra}}{\text{Área do aminoácido do padrão}} \times \text{Concentração do aminoácido no padrão} = \text{Concentração do aminoácido na amostra}$$

Além disto, foi calculada a razão entre a concentração de cada componente na gota em que o embrião foi cultivado, e em uma gota sem embriões cultivada por três dias (branco), para obter o valor normalizado. Esta razão foi calculada da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Concentração na gota com embrião}}{\text{Concentração na gota sem embrião}} = \text{Valor normalizado entre as concentrações}$$



**Figura 8:** Cromatograma do padrão utilizado para análise dos seguintes metabólitos: Gln (Glutamina); NH<sub>3</sub> (Amônia); Ala-Gln (Alanil-glutamina) e Ala (Alanina).

### 3.8 Análise Estatística

Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam homogeneidade das variâncias. Para testes de comparação de médias, variáveis heterocedásticas foram transformadas, e foi utilizado um teste T de *Student* para amostras não-pareadas, utilizando como fator de agrupamento o evento a ser estudado (ocorrência ou não de gravidez, qualidade embrionária nos 2° e 3° dias, evolução e estímulo hormonal). Variáveis categóricas foram comparadas através de um teste de Qui-quadrado de *Pearson*, ou um teste exato de *Fisher*, conforme apropriado.

Para verificar o impacto dos aminoácidos glutamina, alanina, do dipeptídeo alanil-glutamina e do subproduto amônia nas taxas de gravidez em mulheres com idade até 37 anos, foi realizada uma regressão logística. Foram adicionadas, no programa de análise estatística, todas as variáveis que pudessem participar no modelo como variáveis independentes (excluindo aquelas correlacionadas com outras). A variável resposta no modelo foi  $\beta$ -hCG, sendo a alteração na chance de ocorrência de  $\beta$ -hCG=1 calculada.

Após o cálculo de um modelo contendo todas as variáveis independentes relevantes, os valores preditivo positivo, preditivo negativo e preditivo total foram calculados (porcentagem de acerto quando o resultado real [observado] foi positivo, negativo, e total), e em seguida o modelo era calculado novamente, excluindo a variável independente menos significativa. Estes passos foram seguidos até ser montado um modelo que maximizasse o acerto na predição de ocorrência ou não de gravidez.

Em seguida, foi desenhada uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) comparando os valores previstos com os valores observados. Caso a área sob a curva apresentasse um valor significativamente maior do que 50% ( $p < 0,05$ ), o modelo foi considerado importante como fator de predição.

Para o estudo, foi adotado um alfa de 5%.

## **4. RESULTADOS**

Neste estudo, os 62 embriões das 20 pacientes inclusas foram agrupados de diferentes maneiras com o objetivo de verificar a concentração dos aminoácidos (glutamina e alanina) e dos compostos (alanil-glutamina e amônia) no meio de cultura embrionário de acordo com a qualidade embrionária (d2, d3, evolução homogênea ou heterogênea), o estímulo hormonal (FSH ou FSH e LH) e ocorrência ou não de gravidez.

### **4.1 Agrupadas pela ocorrência ou não de gravidez**

Neste grupo há 35 embriões que levaram à gravidez provenientes das 11 pacientes que engravidaram (onde, 5 pacientes receberam 4 embriões, 4 receberam 3 embriões, 1 recebeu 2 embriões e 1 recebeu 1 embrião) e 27 embriões que não levaram à gravidez (das 9 pacientes que não engravidaram 5 receberam 4 embriões, 3 receberam 2 embriões e 1 recebeu 1 embrião). Estes dois subgrupos foram avaliados quanto à idade da paciente, as concentrações da amônia, dos aminoácidos glutamina e alanina, e do dipeptídeo alanil-glutamina. Os resultados estão apresentados na tabela 1. No grupo de embriões que foram transferidos para mulheres que atingiram a gravidez, foi observada uma menor quantidade de glutamina normalizada ( $p=0,004$ ) e uma menor quantidade absoluta de amônia ( $p=0,008$ ).



**Tabela 1.** Idade da mulher, valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em embriões que foram transferidos em ciclos que atingiram (n= 35) ou não (n= 27) a gravidez

|                                          | <b>β-hCG positivo</b> | <b>β-hCG negativo</b> | <b>p</b> |
|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| <b>Idade da mulher (anos)</b>            |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 33,8; 3,2             | 31,6; 3,0             | 0,009*   |
| IC 95%                                   | [32,7; 34,9]          | [30,4; 32,8]          |          |
| Mín-máx                                  | 28-37                 | 25-36                 |          |
| <b>Glutamina normalizada (μM)</b>        |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 1,4; 0,7              | 1,9; 0,7              | 0,004*   |
| IC 95%                                   | [1,1; 1,6]            | [1,6; 2,2]            |          |
| Mín-máx                                  | 0,3-2,9               | 0,8-3,2               |          |
| <b>Alanina normalizada (μM)</b>          |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 1,7; 1,1              | 1,7; 0,8              | 0,787    |
| IC 95%                                   | [1,3; 2,1]            | [1,3; 2,0]            |          |
| Mín-máx                                  | 0,1-5,9               | 0,6-3,7               |          |
| <b>Alanil-glutamina normalizada (μM)</b> |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 1,7; 1,2              | 1,2; 0,5              | 0,122    |
| IC 95%                                   | [1,2; 2,1]            | [1,0; 1,4]            |          |
| Mín-máx                                  | 0,5-5,4               | 0,6-2,5               |          |
| <b>Amônia normalizada (μM)</b>           |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 1,4; 0,9              | 1,7; 0,7              | 0,174    |
| IC 95%                                   | [1,1; 1,7]            | [1,4; 1,9]            |          |
| Mín-máx                                  | 0,1-4,6               | 0,7-3,4               |          |
| <b>Glutamina (μM)</b>                    |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 6,9; 2,7              | 6,6; 1,7              | 0,636    |
| IC 95%                                   | [6,0; 7,9]            | [6,0; 7,3]            |          |
| Mín-máx                                  | 2,1-12,7              | 3,3-10,7              |          |
| <b>Alanina (μM)</b>                      |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 28,1; 8,8             | 27,2; 12,5            | 0,760    |
| IC 95%                                   | [22,9; 31,5]          | [24,6; 31,6]          |          |
| Mín-máx                                  | 3,1-51,1              | 14,1-53,5             |          |
| <b>Alanil-glutamina (μM)</b>             |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 309,7; 82,3           | 277,2; 58,9           | 0,088    |
| IC 95%                                   | [281,4; 338,0]        | [253,9; 300,5]        |          |
| Mín-máx                                  | 180,2-591,1           | 156,4-417,2           |          |
| <b>Amônia (μM)</b>                       |                       |                       |          |
| Média; DP                                | 0,2; 0,01             | 0,3; 0,1              | 0,008*   |
| IC 95%                                   | [0,2; 0,3]            | [0,3; 0,4]            |          |
| Mín-máx                                  | 0,01-0,7              | 0,1-0,6               |          |

DP – desvio padrão

IC 95% – intervalo de confiança de 95% da média

\* - p<0,05

## 4.2 Análises quanto à qualidade embrionária

Os resultados relacionados à qualidade dos embriões no segundo dia de cultivo (d2) estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Os embriões com boa qualidade morfológica não apresentaram maior frequência de ocorrência de gravidez ( $p=0,104$ ), mas apresentaram maior quantidade normalizada do dipeptídeo alanil-glutamina em relação aos embriões com qualidade ruim ( $p=0,021$ ).

**Tabela 2.** Comparação da frequência da ocorrência de gravidez em embriões com qualidade morfológica boa e ruim no segundo dia de desenvolvimento (d2)

|            |      | $\beta$ -hCG |            | Total |
|------------|------|--------------|------------|-------|
|            |      | Negativo     | Positivo   |       |
| Embrião d2 | Ruim | 14 (56,0%)   | 11 (44,0%) | 25    |
|            | Bom  | 13 (35,1%)   | 24 (64,9%) | 37    |
| Total      |      | 27           | 35         | 62    |

$p=0,104$  (Qui-quadrado de Pearson)

**Tabela 3.** Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos embriões bons (n= 37) e ruins (n= 25) no segundo dia de cultivo (d2)

|                                          | <b>Embriões<br/>Bons</b> | <b>Embriões<br/>Ruins</b> | <b>p</b> |
|------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| <b>Glutamina normalizada (µM)</b>        |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 1,6; 0,8                 | 1,6; 0,8                  | 0,821    |
| IC 95%                                   | [1,3; 1,9]               | [1,3; 2,0]                |          |
| Mín-máx                                  | 0,3-3,2                  | 0,3-3,2                   |          |
| <b>Alanina normalizada (µM)</b>          |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 1,9; 1,1                 | 1,4; 0,7                  | 0,109    |
| IC 95%                                   | [1,5; 2,2]               | [1,1; 1,7]                |          |
| Mín-máx                                  | 0,1-5,9                  | 0,3-3,4                   |          |
| <b>Alanil-glutamina normalizada (µM)</b> |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 1,7; 1,2                 | 1,1; 0,3                  | 0,021*   |
| IC 95%                                   | [1,3; 2,1]               | [1,0; 1,3]                |          |
| Mín-máx                                  | 0,6-5,4                  | 0,5-2,0                   |          |
| <b>Amônia normalizada (µM)</b>           |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 1,5; 0,9                 | 1,5; 0,6                  | 0,900    |
| IC 95%                                   | [1,2; 1,8]               | [1,2; 1,7]                |          |
| Mín-máx                                  | 0,1-4,6                  | 0,7-3,4                   |          |
| <b>Glutamina (µM)</b>                    |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 6,9; 2,2                 | 6,7; 2,5                  | 0,869    |
| IC 95%                                   | [6,1; 7,6]               | [5,7; 7,8]                |          |
| Mín-máx                                  | 2,1-12,2                 | 2,9-12,7                  |          |
| <b>Alanina (µM)</b>                      |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 27,4; 10,7               | 23,8; 32,7                | 0,863    |
| IC 95%                                   | [23,8; 31,0]             | [23,1; 32,7]              |          |
| Mín-máx                                  | 3,1-51,1                 | 7,9-53,5                  |          |
| <b>Alanil-glutamina (µM)</b>             |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 299,5; 83,2              | 289,6; 59,9               | 0,613    |
| IC 95%                                   | [271,7; 327,2]           | [264,9; 314,4]            |          |
| Mín-máx                                  | 167,1-591,1              | 156,4-417,2               |          |
| <b>Amônia (µM)</b>                       |                          |                           |          |
| Média; DP                                | 0,30; 0,17               | 0,33; 0,14                | 0,532    |
| IC 95%                                   | [0,24; 0,36]             | [0,27; 0,39]              |          |
| Mín-máx                                  | 0,01-0,70                | 0,16-0,61                 |          |

DP – desvio padrão

IC 95% – intervalo de confiança de 95% da média

\* - p<0,05

Os resultados relacionados à qualidade dos embriões no terceiro dia de cultivo (d3) estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Os embriões com boa qualidade morfológica apresentaram maior frequência de ocorrência de gravidez ( $p=0,019$ ), bem como maior quantidade normalizada do dipeptídeo alanil-glutamina em relação aos embriões com qualidade ruim ( $p=0,019$ ).

**Tabela 4.** Comparação da frequência da ocorrência de gravidez em embriões com qualidade morfológica boa e ruim no terceiro dia de desenvolvimento (d3)

|            |      | $\beta$ -hCG |            | Total |
|------------|------|--------------|------------|-------|
|            |      | Negativo     | Positivo   |       |
| Embrião d3 | Ruim | 12 (66,7%)   | 6 (33,3%)  | 18    |
|            | Bom  | 15 (34,1%)   | 29 (65,9%) | 44    |
| Total      |      | 27           | 35         | 62    |

$p=0,019$  (Qui-quadrado de Pearson)

**Tabela 5.** Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos embriões bons (n= 44) e ruins (n= 18) no terceiro dia de cultivo (d3)

|                                          | Embriões<br>Bons | Embriões<br>Ruins | p      |
|------------------------------------------|------------------|-------------------|--------|
| <b>Glutamina normalizada (µM)</b>        |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 1,6; 0,8         | 1,5; 0,6          | 0,622  |
| IC 95%                                   | [1,4; 1,9]       | [1,2; 1,8]        |        |
| Mín-máx                                  | 0,3-3,2          | 0,6-2,8           |        |
| <b>Alanina normalizada (µM)</b>          |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 1,8; 1,1         | 1,4; 0,8          | 0,176  |
| IC 95%                                   | [1,5; 2,1]       | [1,0; 1,8]        |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-5,9          | 0,4-3,4           |        |
| <b>Alanil-glutamina normalizada (µM)</b> |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 1,6; 1,1         | 1,1; 0,3          | 0,019* |
| IC 95%                                   | [1,3; 2,0]       | [0,9; 1,2]        |        |
| Mín-máx                                  | 0,6-5,4          | 0,5-1,6           |        |
| <b>Amônia normalizada (µM)</b>           |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 1,5; 0,9         | 1,4; 0,8          | 0,684  |
| IC 95%                                   | [1,3; 1,8]       | [1,1; 1,8]        |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-4,6          | 0,7-3,4           |        |
| <b>Glutamina (µM)</b>                    |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 6,9; 2,4         | 6,5; 1,9          | 0,546  |
| IC 95%                                   | [6,2; 7,7]       | [5,6; 7,5]        |        |
| Mín-máx                                  | 2,1-12,7         | 2,9-10,7          |        |
| <b>Alanina (µM)</b>                      |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 27,4; 11,5       | 28,1; 9,8         | 0,814  |
| IC 95%                                   | [23,9; 30,9]     | [23,2; 33,0]      |        |
| Mín-máx                                  | 3,1-51,1         | 14,9-53,5         |        |
| <b>Alanil-glutamina (µM)</b>             |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 298,0; 80,7      | 289,4; 57,3       | 0,680  |
| IC 95%                                   | [273,5; 322,6]   | [260,8; 317,9]    |        |
| Mín-máx                                  | 156,4-591,1      | 167,1-417,2       |        |
| <b>Amônia (µM)</b>                       |                  |                   |        |
| Média; DP                                | 0,3; 0,1         | 0,3; 0,16         | 0,776  |
| IC 95%                                   | [0,2; 0,3]       | [0,2; 0,4]        |        |
| Mín-máx                                  | 0,01-0,7         | 0,1-0,6           |        |

DP – desvio padrão

IC 95% – intervalo de confiança de 95% da média

\* - p<0,05

Os resultados relacionados à evolução do desenvolvimento embrionário do segundo (d2) para o terceiro dia (d3) de cultivo estão apresentados nas tabelas 6 e 7. Os embriões com crescimento homogêneo não apresentaram maior frequência de ocorrência de gravidez ( $p=0,100$ ), mas apresentaram maior quantidade de alanil-glutamina normalizada ( $p=0,003$ ).

**Tabela 6.** Comparação da frequência da ocorrência de gravidez em embriões com evolução homogênea e heterogênea

|          |             | $\beta$ -hCG |            | Total |
|----------|-------------|--------------|------------|-------|
|          |             | Negativo     | Positivo   |       |
| Evolução | Heterogênea | 18 (52,9%)   | 16 (47,1%) | 34    |
|          | Homogênea   | 9 (32,1%)    | 19 (67,9%) | 28    |
| Total    |             | 27           | 35         | 62    |

$p=0,100$  (Qui-quadrado de Pearson)

**Tabela 7.** Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação ao desenvolvimento homogêneo (n= 29) e heterogêneo (n= 33) dos embriões do segundo (d2) para o terceiro (d3) dia de cultivo

|                                          | Desenvolvimento Homogêneo | Desenvolvimento Heterogêneo | p      |
|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------|
| <b>Glutamina normalizada (µM)</b>        |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 1,6; 0,9                  | 1,6; 0,7                    | 0,871  |
| IC 95%                                   | [1,3; 2,0]                | [1,3; 1,8]                  |        |
| Mín-máx                                  | 0,3-3,2                   | 0,3-3,2                     |        |
| <b>Alanina normalizada (µM)</b>          |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 2,0; 1,2                  | 1,4; 0,7                    | 0,697  |
| IC 95%                                   | [1,6; 2,5]                | [1,2; 1,7]                  |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-5,9                   | 0,3-3,4                     |        |
| <b>Alanil-glutamina normalizada (µM)</b> |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 1,9; 1,3                  | 1,1; 0,3                    | 0,003* |
| IC 95%                                   | [1,4; 2,4]                | [1,0; 1,2]                  |        |
| Mín-máx                                  | 0,7-5,4                   | 0,5-2,0                     |        |
| <b>Amônia normalizada (µM)</b>           |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 1,5; 1,0                  | 1,5; 0,6                    | 0,977  |
| IC 95%                                   | [1,1; 1,9]                | [1,2; 1,7]                  |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-4,6                   | 0,7-3,4                     |        |
| <b>Glutamina (µM)</b>                    |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 6,4; 2,3                  | 7,0; 2,3                    | 0,397  |
| IC 95%                                   | [5,0; 7,7]                | [6,3; 7,6]                  |        |
| Mín-máx                                  | 2,9-10,7                  | 2,1-12,7                    |        |
| <b>Alanina (µM)</b>                      |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 28,3; 11,2                | 26,7; 10,8                  | 0,556  |
| IC 95%                                   | [22,5; 30,9]              | [24,4; 32,3]                |        |
| Mín-máx                                  | 3,1-51,1                  | 7,9-53,5                    |        |
| <b>Alanil-glutamina (µM)</b>             |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 294,5; 83,8               | 296,4; 66,7                 | 0,922  |
| IC 95%                                   | [262,0; 327,0]            | [273,1 319,7]               |        |
| Mín-máx                                  | 185,2-591,1               | 156,4-456,3                 |        |
| <b>Amônia (µM)</b>                       |                           |                             |        |
| Média; DP                                | 0,3; 0,1                  | 0,2; 0,1                    | 0,254  |
| IC 95%                                   | [0,2; 0,3]                | [0,2; 0,3]                  |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-0,7                   | 0,01-0,6                    |        |

DP – desvio padrão

IC 95% – intervalo de confiança de 95% da média

\* -  $p < 0,05$

### 4.3 Análise quanto ao estímulo administrado

Os resultados relacionados à administração durante o estímulo hormonal de FSH e LH ou somente FSH estão apresentados nas tabelas 8 e 9. As pacientes que receberam, durante o estímulo folicular, os hormônios FSH e LH apresentaram maior frequência de ocorrência de gravidez ( $p=0,035$ ), bem como maior quantidade absoluta do dipeptídeo alanil-glutamina ( $p= 0,017$ ) em relação às pacientes que receberam somente FSH durante o estímulo hormonal.

**Tabela 8.** Comparação da frequência da ocorrência de gravidez em mulheres que receberam durante o estímulo hormonal FSH ou FSH e LH

|          |          | $\beta$ -hCG |            | Total |
|----------|----------|--------------|------------|-------|
|          |          | Negativo     | Positivo   |       |
| Hormônio | FSH e LH | 3 (20,0%)    | 12 (80,0%) | 15    |
|          | FSH      | 24 (51,1%)   | 23 (48,9%) | 47    |
|          | Total    | 27           | 35         | 62    |

$p=0,035$  (Qui-quadrado de Pearson)



**Tabela 9.** Valores dos aminoácidos alanina e glutamina, do dipeptídeo alanil-glutamina e da amônia em relação aos hormônios FSH (n=47) ou FSH e LH (n=15) administrados durante o estímulo folicular

|                                          | FSH            | FSH e LH       | p      |
|------------------------------------------|----------------|----------------|--------|
| <b>Glutamina normalizada (µM)</b>        |                |                |        |
| Média; DP                                | 1,7; 0,8       | 1,3; 0,6       | 0,111  |
| IC 95%                                   | [1,5; 1,9]     | [1,0; 1,7]     |        |
| Mín-máx                                  | 0,3-3,2        | 0,6-2,9        |        |
| <b>Alanina normalizada (µM)</b>          |                |                |        |
| Média; DP                                | 1,8; 1,1       | 1,5; 0,9       | 0,357  |
| IC 95%                                   | [1,5; 2,1]     | [1,0; 2,0]     |        |
| Mín-máx                                  | 0,3-5,9        | 0,1-3,1        |        |
| <b>Alanil-glutamina normalizada (µM)</b> |                |                |        |
| Média; DP                                | 1,5; 1,1       | 1,2; 0,5       | 0,268  |
| IC 95%                                   | [1,2; 1,9]     | [1,0; 1,5]     |        |
| Mín-máx                                  | 0,6-5,4        | 0,5-2,5        |        |
| <b>Amônia normalizada (µM)</b>           |                |                |        |
| Média; DP                                | 1,5; 0,8       | 1,6; 1,0       | 0,449  |
| IC 95%                                   | [1,2; 1,7]     | [1,1; 2,2]     |        |
| Mín-máx                                  | 0,1-3,4        | 0,7-4,6        |        |
| <b>Glutamina (µM)</b>                    |                |                |        |
| Média; DP                                | 7,0; 2,3       | 6,4; 2,3       | 0,397  |
| IC 95%                                   | [6,3; 7,6]     | [5,0; 7,7]     |        |
| Mín-máx                                  | 2,1-12,7       | 2,9-10,7       |        |
| <b>Alanina (µM)</b>                      |                |                |        |
| Média; DP                                | 26,7; 9,4      | 30,3; 15,0     | 0,269  |
| IC 95%                                   | [23,9; 29,5]   | [22,0; 38,7]   |        |
| Mín-máx                                  | 7,9-53,5       | 3,1-51,5       |        |
| <b>Alanil-glutamina (µM)</b>             |                |                |        |
| Média; DP                                | 282,9; 62,4    | 334,9; 95,2    | 0,017* |
| IC 95%                                   | [282,2; 387,7] | [264,6; 301,3] |        |
| Mín-máx                                  | 156,4-423,8    | 226,2-591,1    |        |
| <b>Amônia (µM)</b>                       |                |                |        |
| Média; DP                                | 0,3; 0,1       | 0,3; 0,1       | 0,994  |
| IC 95%                                   | [0,2; 0,3]     | [0,2; 0,4]     |        |
| Mín-máx                                  | 0,01-0,6       | 0,1-0,7        |        |

DP – desvio padrão

IC 95% – intervalo de confiança de 95% da média

\* – p<0,05

#### **4.4 Análise de regressão logística**

Para verificar o efeito da função dos aminoácidos e da amônia nos resultados de gravidez em ciclos de reprodução assistida e qualidade embrionária em mulheres com até 37 anos, um modelo logístico foi escolhido que maximizasse a porcentagem de acerto. Para tanto, inicialmente foram incluídas todas as variáveis a serem estudadas e que não apresentassem alta correlação entre si. De maneira regressiva, foram removidas as variáveis menos significativas até atingir um máximo de acerto na predição.

No total, quatro modelos foram estudados. O primeiro modelo incluiu os valores normalizados de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução e hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH). O segundo modelo incluiu os valores absolutos de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, além de idade, evolução e hormônio. Os outros dois modelos utilizaram apenas os valores medidos no HPLC, sendo que o modelo 3 incluiu os valores normalizados e o modelo 4 os valores absolutos.

#### 4.4.1 Modelo logístico utilizando valores normalizados

**Tabela 10.** Valores normalizados de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução (homogênea ou heterogênea) e hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH) incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar

|                                           | p      | Exp(B) | IC 95%          |
|-------------------------------------------|--------|--------|-----------------|
| Idade                                     | 0,118  | 1,048  | [0,988; 1,110]  |
| Glutamina normalizada                     | 0,023* | 0,272  | [0,089; 0,835]  |
| Alanil-glutamina normalizada              | 0,199  | 3,291  | [0,535; 20,262] |
| FSH (1) ou FSH e LH (0)                   | 0,119  | 0,311  | [0,072; 1,350]  |
| Evolução homogênea (1) ou heterogênea (0) | 0,247  | 2,104  | [0,597; 7,410]  |

p – probabilidade de erro ao afirmar que o valor de Exp(b) é diferente de 1,0.

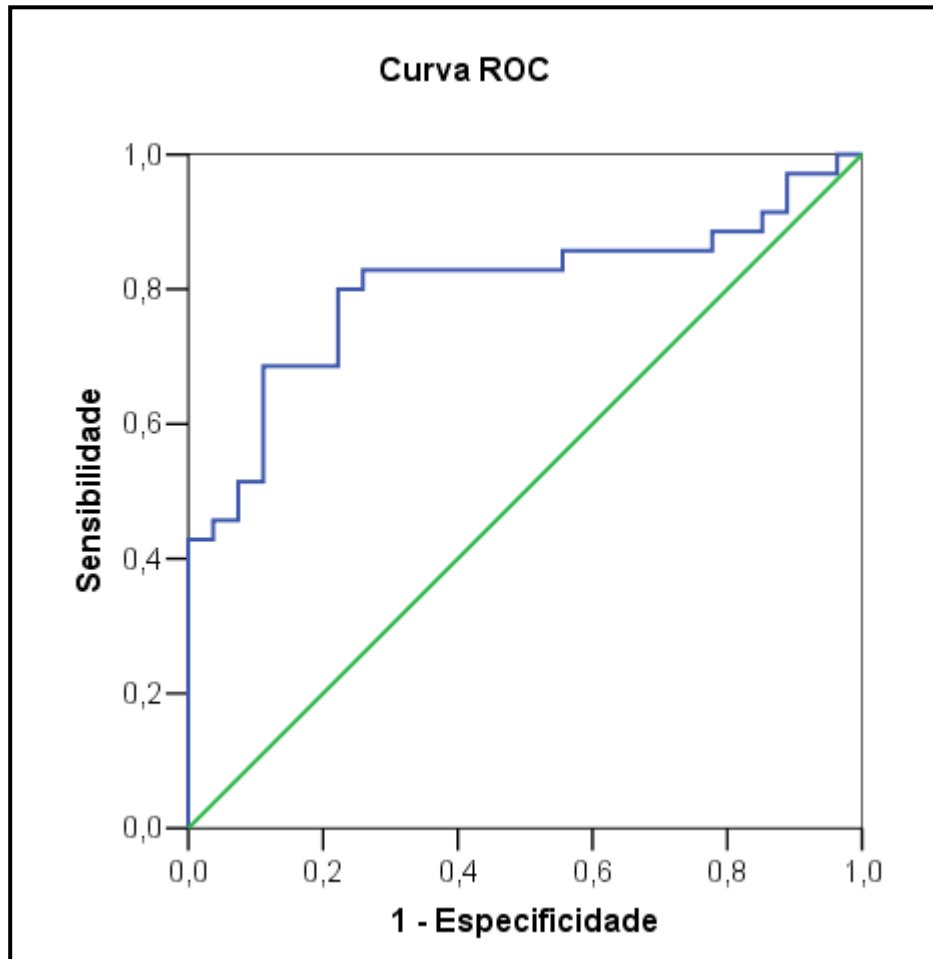
Exp(b) – Odds-ratio para ocorrência de gravidez. Valores acima de 1 indicam que valores crescentes nas variáveis independentes aumentam a chance de ocorrência de gravidez, enquanto valores abaixo de 1 indicam diminuição na chance de ocorrência de gravidez. Para as variáveis categóricas, o valor 0 é o de referência, e o Exp(b) indica a alteração na chance de ocorrência de gravidez ao alterar de 0 para 1.

\* -  $p < 0,05$

**Quadro 3.** Valores observados e preditos pelo modelo logístico de gravidez e porcentagem de acerto do modelo apresentado na tabela 10

| Observado<br>(gravidez) | Modelo (previsão) |     |                          |
|-------------------------|-------------------|-----|--------------------------|
|                         | Gravidez          |     | Porcentagem de<br>acerto |
|                         | Não               | Sim |                          |
| Não                     | 20                | 7   | 77,8%                    |
| Sim                     | 8                 | 27  | 77,1%                    |
| Porcentagem total       |                   |     | 77,4%                    |

**Figura 9.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis normalizadas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução e hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH).



Área sob a curva = 0,802

$p = 0,00005$

Sensibilidade= 80,0% e especificidade= 77,8%

#### 4.4.2 Modelo logístico utilizando valores absolutos

**Tabela 11.** Valores absolutos de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, e também, idade, evolução e hormônio incluídas em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar

|                         | p      | Exp(B) | IC 95%         |
|-------------------------|--------|--------|----------------|
| FSH (1) ou FSH e LH (0) | 0,016* | 0,103  | [0,016; 0,654] |
| Alanina                 | 0,031* | 0,929  | [0,869; 0,993] |
| Alanil-glutamina        | 0,018* | 1,099  | [1,016; 1,188] |
| Amônia                  | 0,016* | 0,964  | [0,935; 0,993] |
| Glutamina               | 0,057  | 1,464  | [0,989; 2,168] |

p – probabilidade de erro ao afirmar que o valor de Exp(b) é diferente de 1,0.

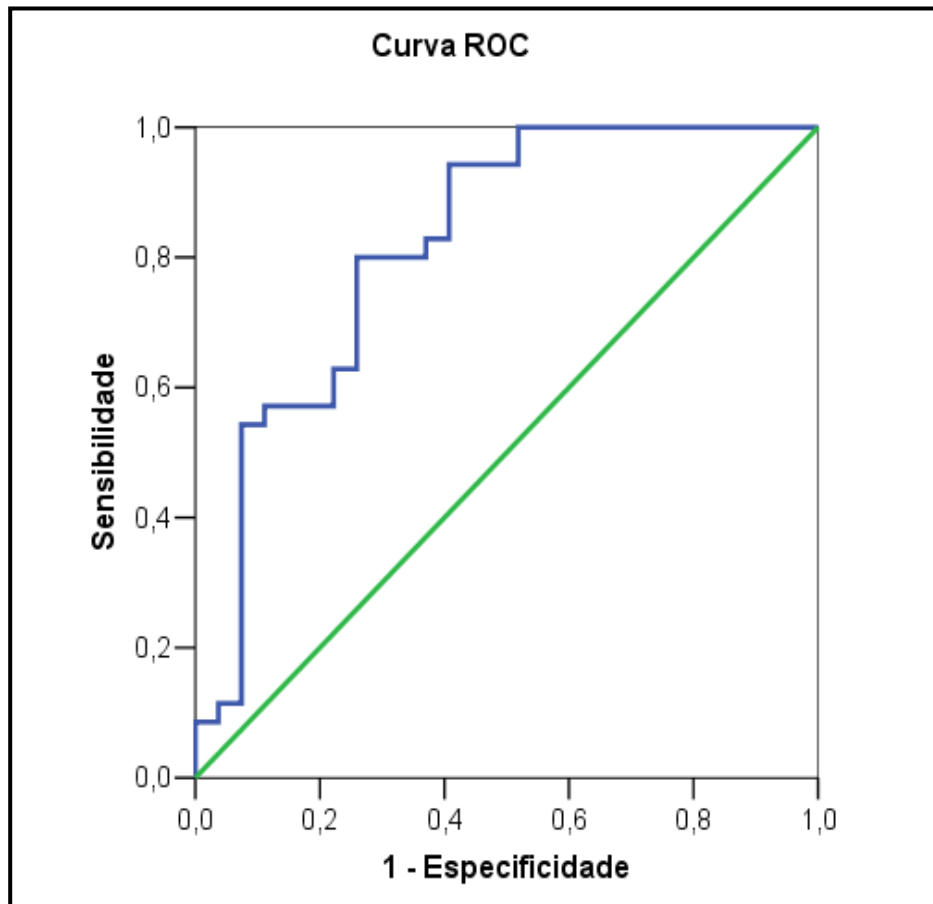
Exp(b) – Odds-ratio para ocorrência de gravidez. Valores acima de 1 indicam que valores crescentes nas variáveis independentes aumentam a chance de ocorrência de gravidez, enquanto valores abaixo de 1 indicam diminuição na chance de ocorrência de gravidez. Para as variáveis categóricas, o valor 0 é o de referência, e o Exp(b) indica a alteração na chance de ocorrência de gravidez ao alterar de 0 para 1.

\* -  $p < 0,05$

**Quadro 4.** Valores observados e preditos pelo modelo logístico de gravidez e porcentagem de acerto do modelo apresentado na tabela 11

| Observado<br>(gravidez) | Modelo (previsão) |     |                          |
|-------------------------|-------------------|-----|--------------------------|
|                         | Gravidez          |     | Porcentagem de<br>acerto |
|                         | Não               | Sim |                          |
| Não                     | 18                | 9   | 66,7%                    |
| Sim                     | 7                 | 28  | 80,0%                    |
| Porcentagem total       |                   |     | 74,2%                    |

**Figura 10.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis absolutas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, e também, idade, evolução e hormônio.



Área sob a curva = 0,820

p= 0,00002

Sensibilidade= 80,0% e especificidade= 74,1%

#### 4.4.3 Modelo logístico utilizando somente os valores normalizados medidos no HPLC

**Tabela 12.** Valores normalizados de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia incluída em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar

|                              | p      | Exp(B) | IC 95%           |
|------------------------------|--------|--------|------------------|
| Glutamina normalizada        | 0,034* | 0,295  | [0,095; 0,911]   |
| Alanil-glutamina normalizada | 0,026* | 19,317 | [1,423; 262,129] |

p – probabilidade de erro ao afirmar que o valor de Exp(b) é diferente de 1,0.

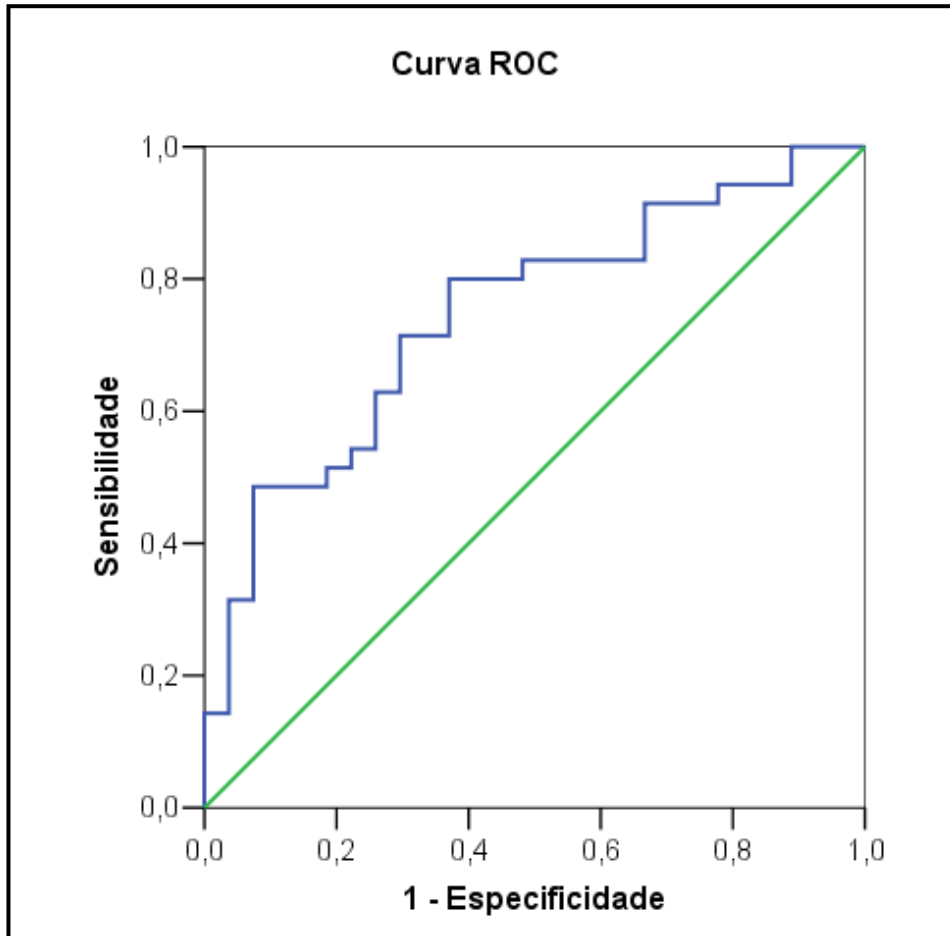
Exp(b) – Odds-ratio para ocorrência de gravidez. Valores acima de 1 indicam que valores crescentes nas variáveis independentes aumentam a chance de ocorrência de gravidez, enquanto valores abaixo de 1 indicam diminuição na chance de ocorrência de gravidez.

\* -  $p < 0,05$

**Quadro 5.** Valores observados e preditos pelo modelo logístico de gravidez e porcentagem de acerto do modelo apresentado na tabela 12.

| Observado<br>(gravidez) | Modelo (previsão) |     |                          |
|-------------------------|-------------------|-----|--------------------------|
|                         | Gravidez          |     | Porcentagem de<br>acerto |
|                         | Não               | Sim |                          |
| Não                     | 17                | 10  | 63,0%                    |
| Sim                     | 8                 | 27  | 77,1%                    |
| Porcentagem total       |                   |     | 71,0%                    |

**Figura 11.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis normalizadas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia.



Área sob a curva = 0,746

$p = 0,001$

Sensibilidade = 71,4% e especificidade = 70,4%



#### 4.4.4 Modelo logístico utilizando somente os valores absolutos medidos no HPLC

**Tabela 13.** Valores absolutos de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia incluída em um modelo logístico maximizando a porcentagem de acerto na predição da taxa de gravidez. Os valores de Exp(B) são as razões de chance (*odds-ratio*) para engravidar

|                  | p      | Exp(B) | IC 95%         |
|------------------|--------|--------|----------------|
| Glutamina        | 0,050  | 1,355  | [1,000; 1,836] |
| Alanina          | 0,010* | 0,917  | [0,857; 0,980] |
| Alanil-glutamina | 0,004* | 1,198  | [1,059; 1,355] |
| Amônia           | 0,050  | 0,974  | [0,949; 1,000] |

p – probabilidade de erro ao afirmar que o valor de Exp(b) é diferente de 1,0.

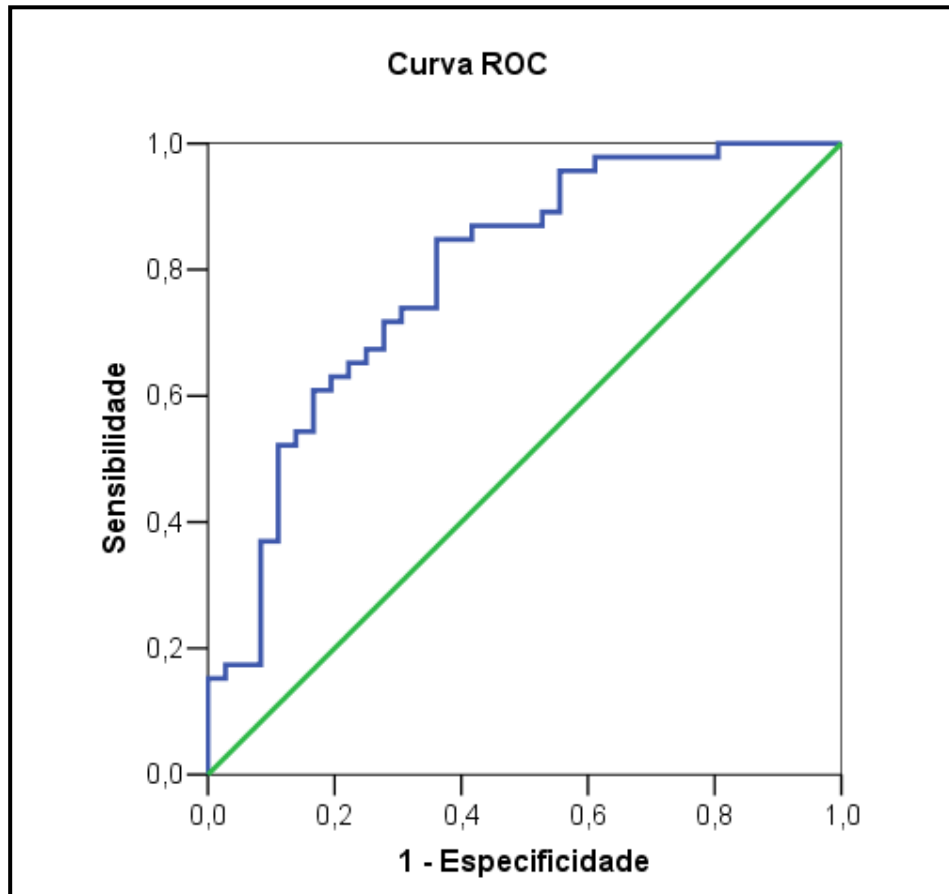
Exp(b) – Odds-ratio para ocorrência de gravidez. Valores acima de 1 indicam que valores crescentes nas variáveis independentes aumentam a chance de ocorrência de gravidez, enquanto valores abaixo de 1 indicam diminuição na chance de ocorrência de gravidez.

\* -  $p < 0,05$

**Quadro 6.** Valores observados e preditos pelo modelo logístico de gravidez e porcentagem de acerto do modelo apresentado na tabela 13

| Observado<br>(gravidez) | Modelo (previsão) |     |                          |
|-------------------------|-------------------|-----|--------------------------|
|                         | Gravidez          |     | Porcentagem de<br>acerto |
|                         | Não               | Sim |                          |
| Não                     | 23                | 13  | 63,9%                    |
| Sim                     | 7                 | 39  | 84,8%                    |
| Porcentagem total       |                   |     | 75,6%                    |

**Figura 12.** Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para o modelo logístico de predição de gestação utilizando as variáveis absolutas de glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia, mensurados no HPLC.



Área sob a curva = 0,792

$p = 0,00001$

Sensibilidade = 71,7% e especificidade = 72,2%

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo da reprodução assistida humana é obter sucesso e segurança na escolha de um único embrião com potencial de gestação para ser transferido, com o intuito de evitar a gestação múltipla, que oferece risco tanto para a mãe como para os bebês. Por isso, há mais de 20 anos são desenvolvidas pesquisas que visam à produção de testes que possam levar a um diagnóstico rápido e preciso do potencial de implantação embrionário e que seja capaz de ser introduzido na rotina laboratorial. Dentre essas pesquisas, sugere-se a realização da análise dos subprodutos consumidos e produzidos pelos embriões *in vitro* no meio de cultura no qual eles ficam expostos durante os primeiros estádios do desenvolvimento, através da cromatografia líquida de alto desempenho, para substâncias conhecidas <sup>(8)</sup>.

O presente estudo buscou verificar os níveis e a produção/depleção de dois aminoácidos (alanina e glutamina), um dipeptídeo (alanil-glutamina) e um subproduto de degradação de compostos nitrogenados (amônia). De acordo com vários autores, a presença de determinados aminoácidos no meio de cultura, proporciona melhor desenvolvimento embrionário em ratas <sup>(30,50,60,61)</sup>, ovelhas <sup>(48)</sup>, vacas <sup>(62,63)</sup>, porcas <sup>(64,65)</sup> e mulheres <sup>(66)</sup>. No entanto, a combinação precisa dos aminoácidos que devem ser adicionados ao meio de cultura de cada espécie é algo ainda incerto.

Brinster (1965) observou a importância dos aminoácidos no meio de cultura embrionário através da suplementação com uma fonte de nitrogênio para suportar o desenvolvimento pré-implantacional na ausência do soro fetal bovino <sup>(67)</sup>. Outros trabalhos subseqüentes envolveram a adição individual ou em grupo de aminoácidos no meio de cultura para relacionar com os estádios do desenvolvimento <sup>(29,67-70)</sup>.

Juetten e Bavister (1983) demonstraram que a adição de quatro aminoácidos (ácido glutâmico, isoleucina, metionina e fenilalanina) aumentava as taxas de clivagem de embriões de *hamsters in vitro*. Em outro estudo, os mesmos autores observaram que a adição dos quatro aminoácidos supracitados aumentou a proporção de embriões *in vivo* de *hamsters* em estágio de oito células e o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto <sup>(68)</sup>.

Mais adiante, Lane e Gardner (1997) observaram que a cultura de embriões de camundongos *in vitro* com aminoácidos não-essenciais e glutamina reduziu o tempo de mitose dos três primeiros ciclos celulares, diferente de quando cultivaram com aminoácidos essenciais que não apresentou alteração no desenvolvimento embrionário. Já quando introduziram os 20 aminoácidos notaram um aumento na taxa de clivagem somente durante o segundo ciclo celular <sup>(69)</sup>.

Em contrapartida outros estudos demonstraram efeitos inibitórios de certos aminoácidos no desenvolvimento embrionário, que pode refletir a dificuldade dos embriões no transporte de vários aminoácidos ao mesmo tempo. Carney e Bavister (1987) observaram que o potencial de desenvolvimento dos embriões de *hamsters* até o estágio de blastocisto diminuiu quando foram adicionados ao meio de cultura os 20 aminoácidos <sup>(29)</sup>. Pinyopummintr e Bavister (1996) demonstraram que embriões bovinos *in vitro*, quando suplementados com aminoácido essencial ou em combinação com aminoácidos não-essenciais, apresentaram diminuição das taxas de formação de blastocistos <sup>(70)</sup>. Os aminoácidos foram adicionados em concentrações presentes no meio de cultura TCM-199, significativamente maiores do que as encontradas no trato reprodutivo. Liu e Foote (1997) observaram que a redução de 50% dos aminoácidos essenciais adicionados ao meio de cultura bovino proporcionava o desenvolvimento embrionário igual ao obtido em um meio suplementado com albumina sérica bovina (BSA) <sup>(71)</sup>.

Relacionado a esse fato, há muitos trabalhos que investigam o papel dos aminoácidos no desenvolvimento embrionário considerando a suplementação com aminoácidos essenciais *versus* não-essenciais. Em embriões humanos, os aminoácidos não-essenciais são recomendados para as primeiras clivagens, enquanto para as etapas seguintes do desenvolvimento embrionário é utilizada uma mistura entre essenciais e não-essenciais <sup>(72)</sup>. Todavia, esta utilização tem sido muito questionada uma vez que essas duas divisões tradicionais dos aminoácidos estão dando espaço a uma terceira divisão relacionada aos aminoácidos “condicionalmente essenciais”, sintetizados por outros aminoácidos (taurina e glutamina) <sup>(73)</sup>.

O interesse pela glutamina, um dos aminoácidos mais abundantes no corpo

humano, tem aumentado devido ao fato de que ao mesmo tempo em que está relacionado à função antioxidante, pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio no meio de cultura embrionário, tornando-o nocivo aos embriões <sup>(74)</sup>.

Gardner et al. (1989) realizaram um dos primeiros trabalhos relacionados à quantificação de aminoácidos consumidos pelos embriões através da técnica não-invasiva de ultramicrofluorometria. Os dados mostraram que o consumo de glutamina por embriões de ratos diminuía durante as primeiras clivagens, mas subsequenteamente aumentava até o estágio de blastocisto <sup>(19)</sup>. Rieger et al. (1988), através de um substrato específico, também descreveram o metabolismo da glutamina, que mostrou ter importância durante os primeiros estádios (2 a 4 células) <sup>(31)</sup>. No entanto, as técnicas utilizadas por esse dois autores somente mensuraram o consumo e o aparecimento de aminoácidos individualmente.

Entretanto, determinar a importância de cada um dos 20 aminoácidos através dessas técnicas supracitadas demandaria tempo excessivo; com isso iniciou-se a utilização da técnica de HPLC, por ser menos dispendiosa mais rápida e possuir alta sensibilidade, especificidade e repetibilidade.

Houghton et al. (2002) mensuraram, através da técnica de HPLC, a depleção e o aparecimento (*turnover*) de uma mistura de 18 aminoácidos em embriões humanos durante o cultivo *in vitro*. Os autores observaram um *turnover* de aminoácidos maior entre os embriões com menor capacidade de desenvolvimento. Dentre os aminoácidos que foram consumidos, a leucina foi um aminoácido essencial com importante papel na sinalização de moléculas para a síntese de proteínas e a glutamina não foi consumida significativamente em nenhum estágio pelos embriões com melhor desenvolvimento, ao contrário dos embriões com menor qualidade que consumiram muito mais glutamina em todos os estádios <sup>(75,76)</sup>. Já os níveis de alanina foram maiores nos embriões que pararam o desenvolvimento, o que suporta indiretamente a proposição de que a alanina produz íons amônia em humanos, provavelmente pela via glutamato-desidrogenase e alanina transaminase, como demonstrado também por Partridge e Leese <sup>(9)</sup> em embriões bovinos <sup>(6,7)</sup>.

Com o intuito de melhorar as condições para o desenvolvimento embrionário e

diminuir os danos causados ao embrião pela suplementação de aminoácidos nos meios de cultivo, as empresas produtoras de meios têm adicionado o dipeptídeo alanil-glutamina, mais estável e menos solúvel em água. Isso ocorre porque a glutamina e a alanina, tradicionalmente adicionadas aos meios de cultivo, podem promover a formação de amônia, levando à diminuição da viabilidade embrionária e da chance de ocorrência de gravidez <sup>(74)</sup>.

Já em 1955, Eagle demonstrou os efeitos tóxicos de alguns aminoácidos, em especial da glutamina, e sugeriu que poderiam ser evitados pela utilização de dipeptídeos diretamente em cultura de células *in vitro* <sup>(45)</sup>. Dessa forma, Lane et al. (2001) substituíram, para o cultivo de embriões de ratos, a glutamina pela alanil-glutamina e observaram um melhor desenvolvimento embrionário <sup>(77)</sup>.

O presente trabalho observou que embriões com qualidade morfológica superior no segundo e terceiro dia de cultivo após a fertilização e que tiveram uma evolução homogênea durante o cultivo *in vitro* apresentaram maiores concentrações de alanil-glutamina quando comparados com embriões de qualidade morfológica inferior ou que tiveram desenvolvimento heterogêneo.

Desta forma, podemos hipotetizar que o embrião morfológicamente superior esteja produzindo ativamente o dipeptídeo alanil-glutamina, ou não está ocorrendo a degradação deste durante o cultivo *in vitro*, fato não observado na análise das concentrações normalizadas e absolutas dos aminoácidos alanina e glutamina. Estes resultados corroboram com os obtidos por Chen e Harcum (2005), que observaram maior estabilidade do dipeptídeo alanil-glutamina em não ser degradado (hidrólise) gerando alanina e glutamina livres no meio durante o cultivo embrionário e um aumento da viabilidade embrionária na presença somente deste dipeptídeo <sup>(74)</sup>.

Neste estudo, todos os embriões transferidos foram avaliados, demonstrando que a ocorrência de gravidez bioquímica tem correlação negativa com concentrações de glutamina normalizada e amônia, diferente de outros trabalhos que utilizam a taxa de implantação 0% ou 100% ou trabalham com a porcentagem de acordo com o número de embriões implantados <sup>(7,8)</sup>. Nossos resultados indicam que a degradação da glutamina produz amônia, portanto altos níveis de glutamina podem estar associados a

altas concentrações de amônia. Lane e Gardner (2003) relataram que concentrações elevadas de amônia podem alterar o padrão da expressão gênica de embriões levando a uma diminuição na qualidade embrionária e taxa de gestação <sup>(49)</sup>. Além dessas alterações, a amônia pode inibir o metabolismo oxidativo embrionário interferindo na atividade do malato-aspartato que tem como principal função a regulação da utilização de carboidratos pelo embrião <sup>(78)</sup>.

Muitos estudos mostram a relação entre baixa qualidade embrionária, menores taxas de gestação, produção de amônia e conseqüente presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio de cultura <sup>(54,74,79,80)</sup>. Muitas alterações podem predispor condições não adequadas de cultura e promover a indução do estresse celular e conseqüentemente alterações metabólicas. Essas alterações podem comprometer diretamente a viabilidade embrionária, e técnicas para a detecção destas mudanças provocadas pelo cultivo antes da transferência são de grande importância, uma vez que a qualidade intrínseca do embrião pode também estar relacionada a diferenças no seu metabolismo <sup>(81)</sup>.

Vergouw et al. (2008) sugeriram que modificações no meio de cultura por reações oxidativas podem ser indicadores do potencial reprodutivo e são independentes dos critérios de seleção morfológica utilizados rotineiramente pelas clínicas de reprodução assistida <sup>(82)</sup>.

A alta concentração de EROs promove níveis elevados de estresse oxidativo que podem interferir no processo de fertilização *in vitro*, diminuir a probabilidade de fertilização, induzir a fragmentação embrionária e com isso impedir o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocistos <sup>(83)</sup>. Por outro lado, já foi demonstrado em oócitos bovinos que quantidades moderadas de espécies reativas de oxigênio são essenciais para aumentar o potencial de maturação *in vitro* dos oócitos <sup>(84)</sup>. Desse modo, a presença de baixos níveis (ou de níveis “corretos”) de EROs no líquido folicular humano poderia ser um potencial marcador para prever o sucesso de gestação em pacientes submetidas aos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) <sup>(85-88)</sup>.

Um estudo prospectivo multicêntrico recente mostrou que o perfil metabólico não-invasivo do meio de cultura de embriões humanos, pode ser correlacionado aos

resultados de gravidez. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de Raman e NIR (próximo do Infravermelho) para analisar o meio de cultura de embriões transferidos no terceiro dia de cultura. Os resultados mostraram que o perfil espectral descrevia discretas diferenças nas concentrações de CH, NH e OH entre o meio de cultura de embriões que resultaram em gravidez daqueles que não resultaram. Os autores ainda observaram que a taxa de CH para R-OH no conteúdo do meio de cultura é reflexo do estresse oxidativo. Com a análise por espectrometria de Raman, os autores determinaram quatro regiões espectrais associadas com aquelas espécies moleculares importantes no estabelecimento da gravidez <sup>(80)</sup>.

Outro estudo de Agarwal et al. (2006) também identificou, através da utilização das mesmas técnicas em meios de cultura embrionário, plasma seminal e líquido folicular, a presença dos biomarcadores específicos para estresse oxidativo (R-OH, CH, OH e NH). Os resultados mostraram que existe relação no perfil metabólico das diferentes amostras analisadas sob estresse oxidativo com os resultados positivos e negativos de gravidez <sup>(79)</sup>.

Bedaiwy et al. (2004) demonstraram que níveis elevados de EROs no meio de cultura embrionário resultava em baixa formação de blastocistos, baixas taxas de clivagens e altos índices de fragmentação nos embriões. No entanto, a falta excessiva de EROs também gera um efeito negativo na fertilização *in vitro*, particularmente no processo de fertilização, o que indica que níveis fisiológicos normais são essenciais para a fertilização normal <sup>(89-91)</sup>.

## **5.1 Aminoácidos e produção de amônia**

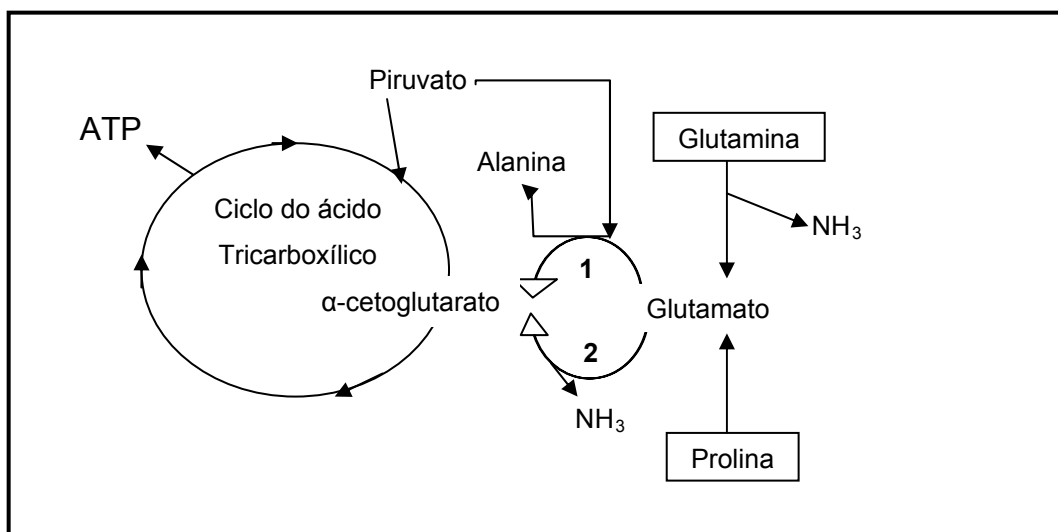
Durante o cultivo *in vitro*, os embriões são expostos a condições estáticas e, conseqüentemente, aos efeitos tóxicos da amônia que surge pela quebra espontânea dos aminoácidos no meio de cultura quando incubados a 37°C, e podem influenciar no desenvolvimento e qualidade embrionária <sup>(49)</sup>. Uma das maiores conseqüências da presença de amônia no meio de cultura embrionário está relacionado à regulação do



pH intracelular, essencial para o funcionamento adequado das células. Níveis elevados de amônia podem inibir significativamente essa habilidade nos embriões, comprometendo o seu desenvolvimento <sup>(92,93)</sup>.

Em um trabalho publicado em 1994 por Gardner e Lane, os autores observaram casos de anencefalia e redução do desenvolvimento fetal em ratos nos quais os pré-embriões tinham sido cultivados *in vitro*, e sugeriram que a anormalidade congênita deveria estar relacionada à presença de altas concentrações de amônia sintetizadas pelo aminoácido glutamina presente no meio de cultura *in vitro*. Essa indagação ainda origina muitas discussões no âmbito científico, uma vez que a glutamina é incluída na maioria dos meios de cultura para potencializar o sistema de cultivo de pré-embriões baseados em vários estudos em diferentes espécies, inclusive em embriões humanos <sup>(94-99)</sup>.

Normalmente, a produção de amônia está relacionada ao metabolismo da glutamina no meio de cultura, sendo esta hidrolisada a glutamato e amônia. O glutamato é por sua vez hidrolisado a  $\alpha$ -cetoglutarato através da via glutamato-desidrogenase, e também libera outras moléculas de amônia (figura 13, caminho 1). Alternativamente, o glutamato e o piruvato presentes no meio podem reagir para formar alanina e  $\alpha$ -cetoglutarato (Figura 13, caminho 2). O  $\alpha$ -cetoglutarato é oxidado através do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de *Krebs*) para gerar ATP como forma de energia para o desenvolvimento embrionário. A alanina é hipoteticamente secretada no meio como um mecanismo para reduzir a toxicidade da amônia pelo redirecionamento do grupo amina do glutamato para a alanina no lugar da molécula de amônia livre. Assim, a adição de alanina ao meio de cultura poderia inibir a reação do glutamato e do piruvato para produzir alanina e conseqüentemente impedir a secreção desse aminoácido pelas células <sup>(100-104)</sup>.



**Figura 13:** Esquema do metabolismo dos aminoácidos alanina, prolina e glutamina relacionada à produção de amônia. Adaptado de Chen et al, 2005.

Além dos aminoácidos mencionados outros também estão relacionados à produção de amônia, como é o caso da prolina, que pode tanto estimular o crescimento celular pela síntese de glutamato e conseqüente produção de  $\alpha$ -cetoglutarato (figura 13), como também gerar uma molécula de amônia. Mas diferente da glutamina, que gera duas moléculas de amônia por aminoácido presente, a prolina gera apenas uma molécula. Com isto, tem sido sugerida a substituição da glutamina pela prolina na suplementação dos meios de cultura, uma vez que esse aminoácido pode participar do ciclo do ácido tricarboxílico para a síntese de ATP com a vantagem de produzir menores quantidades de amônia durante o cultivo <sup>(51,69,74)</sup>.

Chen e Harcum (2005) realizaram um estudo onde foram comparados os níveis basais de alanina no meio de cultura com o meio após o cultivo embrionário e observaram que a alanina era secretada em altas concentrações principalmente no final do desenvolvimento *in vitro*. Esse resultado suporta a hipótese de que a secreção de alanina reduz o estresse pela amônia. Adicionalmente, a suplementação com alanina no meio de cultura elevou os níveis de glutamina quando comparado com o controle negativo. Esses níveis altos são provavelmente devido à combinação do baixo consumo de glutamina às baixas taxas de crescimento embrionário e à redução da reação glutamina/piruvato para alanina/ $\alpha$ -cetoglutarato <sup>(74)</sup>.

No estudo de Lane e Gardner (1994), os autores também simularam o efeito da glutamina através do acréscimo de amônia exógena. A adição de cloreto de amônia para modificar o meio do fluído tubário de ratos resultou em diminuição nas taxas de implantação e formação de blastocistos, além do aumento da chance de ocorrência de retardo no crescimento fetal e na incidência de anencefalia <sup>(94)</sup>. Nakazawa et al. (1997) demonstraram diretamente evidências de que o acúmulo de amônia é devido principalmente à quebra espontânea de glutamina, mostrando que a taxa de quebra da glutamina em solução aquosa é independente do sistema de cultura <sup>(50)</sup>.

No presente estudo não observamos um resultado significativo da amônia (como possível indutora de estresse oxidativo) com a qualidade morfológica dos embriões no d2, d3 e na evolução homogênea e heterogênea. Uma possível explicação para esse fato é a relação com o tempo de cultivo, sendo que a maioria dos trabalhos correlaciona os níveis elevados de amônia com o desenvolvimento até o estágio de blastocisto e geralmente não realizam análises que relacionam a qualidade do segundo e terceiro dia <sup>(6,7,19,54)</sup>. Como o tempo em que os embriões ficam expostos ao meio pode possuir grande influência nos resultados relacionados à concentração de amônia e qualidade embrionária, essa informação nos permite inferir que (i) os embriões são mais resistentes até o 3º dia, (ii) o processo de desenvolvimento embrionário até o 3º dia independe da qualidade celular ou (iii) os níveis de amônia observados no estudo eram bastante baixos, não gerando efeito deletério.

Realizamos também, quatro modelos de regressão logística que maximizassem a porcentagem de acerto na predição de ocorrência de gravidez, baseado em valores de variáveis independentes. Verificamos a relação entre as variáveis, glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia e também idade das mulheres, evolução embrionária (homogênea e heterogênea), hormônio utilizado (se FSH ou FSH e LH) e uma variável dependente categórica (neste caso, engravidar ou não), para montar um modelo de predição. Escolhemos os modelos que melhor previram resultados certos (gravidez ou ausência de gravidez) com o menor número possível de variáveis independentes, para manter o modelo o mais simples possível.

De acordo com as análises observamos que quando utilizamos os valores absolutos de todas as variáveis obtivemos uma porcentagem de acerto de 74,2% ao predizer a ocorrência de gravidez. O mesmo foi observado quando realizamos outro modelo logístico apenas com as variáveis absolutas mensuradas no HPLC (glutamina, alanina, alanil-glutamina e amônia), mas com uma porcentagem de acerto de 75,6%. Ambos os valores levaram a uma área sob a curva estatisticamente acima de 0,5 ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que os modelos contribuem para explicar a ocorrência de gravidez. Em outras palavras, podemos assumir que os aminoácidos (Ala e Gln), do dipeptídeo (alanil-glutamina) e da amônia, em diferentes concentrações, participam da chance de ocorrência de gravidez.

Quando observamos os outros dois modelos de regressão logística com os valores normalizados, obtivemos uma porcentagem de acerto de 77,4% ao predizer a ocorrência de gravidez utilizando um modelo que incluísse idade, estímulo e evolução, e de 71% quando utilizamos somente as variáveis normalizadas mensuradas no HPLC. É importante a constatação de que os valores de predição estão distantes de 1,0. Isto pode ser explicado pelo fato de que não apenas o embrião (e seu metabolismo) determina a gravidez, mas também outros fatores como a própria qualidade endometrial.

Outra informação interessante é a de que, quanto maior a concentração de glutamina normalizada, menor a chance de engravidar, enquanto, quanto maior a concentração de alanil-glutamina normalizada, maior a chance de engravidar. Interessantemente, a glutamina inverteu essa tendência quando observamos os valores reais medidos nas gotas, isso sugere que existe uma concentração ótima, mas que o embrião que produz glutamina não tem um potencial bom para atingir a gravidez.

## 5.2 Aminoácidos e estímulo hormonal

O rendimento e a qualidade dos embriões produzidos pelas múltiplas ovulações após as injeções de hormônio folículo estimulante (FSH) ainda são variáveis e imprevisíveis. Essa variabilidade residual ainda não é bem compreendida, mas diversos trabalhos têm demonstrado que as preparações comerciais utilizando FSH nem sempre são idênticas devido à relação inconstante entre o FSH e o hormônio luteinizante (LH) <sup>(105,106)</sup>.

Se por um lado já é consenso na literatura a importância do hormônio FSH para o crescimento folicular, o papel do LH na foliculogênese ainda não foi totalmente elucidado. Desde que essas questões são levantadas, diversos trabalhos são realizados principalmente com bovinos e humanos para determinar os efeitos do LH em diferentes soluções de FSH. Mas as conclusões não são claras e muitas vezes até contraditórias, como Donaldson et al. (1986), que observaram uma associação entre o aumento da concentração de LH na solução de FSH a uma significativa diminuição nas taxas de fertilização e com o aumento de embriões degenerados em bovinos <sup>(107)</sup>.

Ao contrário desses resultados Beckers (1987) observou que a redução da concentração de LH nas preparações comerciais de gonadotrofinas estava correlacionada à diminuição do número de embriões produzidos em bovinos, embora a qualidade morfológica tenha sido melhor <sup>(108)</sup>.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, quando relacionamos as pacientes que receberam as duas formas de estímulo (FSH e LH ou FSH), observamos que no grupo das pacientes que receberam FSH e LH a ocorrência de gravidez foi maior, bem como a quantidade absoluta do dipeptídeo alanil-glutamina em relação às pacientes que receberam somente FSH durante o estímulo hormonal. Apesar disto, não nos propusemos a verificar qual estímulo é melhor em termos de alcançar a gravidez, mesmo porque um mesmo estímulo pode produzir resultados bastante diferentes, mesmo em uma mesma paciente. Assim, apenas devemos considerar o fato de que as pacientes que receberam FSH e LH obtiveram maior taxa

de gravidez, e os níveis dos componentes no meio de cultura podem ter apresentado alguma participação. Todavia, um estudo mais extenso comparando os estímulos diferentes teria que ser desenhado a fim de responder essa pergunta.

Por fim, estudos prévios observaram diferentes relações de componentes presentes nos meios de cultura com o metabolismo embrionário <sup>(6-8,51,109-111)</sup>. Embora esses estudos solidificaram o grande potencial da identificação do perfil metabolômico embrionário, a utilização na rotina laboratorial ainda é limitada, uma vez que dependem de técnicas complexas, dispendiosas, que necessitam de muito tempo para a obtenção de resultados precisos e da presença de profissionais com treinamento específico para as determinadas tecnologias. Com isso, a necessidade de uma técnica rápida, precisa e não-invasiva para prever a viabilidade embrionária pré-transferência é o grande objetivo atualmente dos estudos relacionados à reprodução assistida.

Este trabalho demonstrou que é possível padronizar metodologias que possam objetivar e complementar as avaliações morfológicas utilizadas atualmente por laboratórios de fertilização *in vitro*, que ainda são consideradas subjetivas. Com isso, a compreensão real do metabolismo embrionário associado às análises morfológicas aumentaria a probabilidade de selecionar o melhor embrião com potencial de gestação, e o aumento da ocorrência de gestações.

Além disso, pudemos demonstrar que a mensuração do *turnover* de aminoácidos e da concentração de amônia através da técnica de HPLC poderia potencialmente aumentar nossa habilidade para selecionar o embrião mais viável para a transferência no terceiro dia de cultivo, em curto espaço de tempo e de forma pouco dispendiosa, sem a necessidade de estender o cultivo embrionário ou a utilização de meios seqüenciais.

## **6. CONCLUSÕES**

Nas condições deste estudo, os resultados permitem concluir que:

1. Embriões que possuem um desenvolvimento homogêneo e com boa qualidade no segundo e terceiro dias de cultivo embrionário apresentam maior quantidade de alanil-glutamina no meio de cultura;
2. Níveis menores de amônia absoluta e glutamina normalizada no meio de cultura durante o cultivo embrionário estão relacionados com maior ocorrência de gravidez.
3. Pacientes que receberam como estímulo hormonal FSH e LH apresentam níveis maiores de alanil-glutamina absoluta e maior frequência da ocorrência de gravidez.

### Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### TÍTULO DO PROJETO

##### **Análise da concentração da amônia, dos aminoácidos alanina e glutamina e do dipeptídeo alanil-glutamina no meio de cultura de embriões humanos**

##### 1. INFORMAÇÕES INICIAIS

Para que um indivíduo possa participar de uma pesquisa envolvendo novos tratamentos médicos, aparelhos ou novos procedimentos, esse deve dar o seu consentimento livre e esclarecido de tal participação. Esse consentimento deve se basear no entendimento da natureza e risco do tratamento, aparelho ou procedimento. É responsabilidade do coordenador da pesquisa fornecer, ao indivíduo que tomará parte na pesquisa, as informações necessárias para este entendimento.

##### 2. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Toda paciente que for submetida ao Programa de Fertilização *in vitro*, nesta Universidade ou em qualquer outro ambiente médico, será submetida a um tratamento medicamentoso para o estímulo controlado dos ovários. Este tratamento tem a função de produzir mais folículos (local onde o óvulo se desenvolve, dentro do ovário), e assim, mais óvulos. Para a obtenção dos óvulos produzidos, ela deverá ser submetida a uma punção-aspiração dos folículos ovarianos sob anestesia no centro cirúrgico. Esse tratamento utiliza um ultra-som transvaginal com uma agulha de aspiração que atravessa a região do fundo vaginal e atinge os ovários, para aspirar os óvulos de dentro dos folículos. Junto com os óvulos, virá um pouco de líquido – líquido folicular – e estes serão todos aspirados para dentro de tubos de plástico.

Os tubos contendo os líquidos foliculares (e os óvulos) serão levados para o laboratório de Fertilização *in vitro*, situado no próprio centro cirúrgico. O líquido folicular de cada folículo será cuidadosamente examinado à procura dos óvulos. Após este exame, os óvulos encontrados serão mantidos durante 3 (três) horas em incubadoras com ambiente controlado de 5% de CO<sub>2</sub> (gás carbônico) em ar, 90% de umidade, a 37° C (graus Celsius) para que ocorra sua estabilização.

Após esse tempo serão selecionados os 4 (quatro) melhores óvulos maduros e com capacidade de ser fecundado, para realizar os procedimentos de rotina (Fertilização *in vitro* – técnica que permite que o espermatozóide fecunde o óvulo fora do ambiente uterino, a saber, em uma placa de *Petri*) e o restante será descartado. Após o procedimento da Fertilização *in vitro*, os óvulos fertilizados são colocados em gotas de meio de cultura próprio para o desenvolvimento embrionário, um em cada



gota, onde permanecerão até que os embriões produzidos sejam transferidos para dentro do útero da paciente. Após a transferência dos embriões **as placas com o meio de cultura são desprezadas como rotina**. É justamente com estas **gotas de meio de cultura que são rotineiramente desprezadas depois da transferência** que será realizado este projeto.

Vale salientar, que esses procedimentos (tratamento medicamentoso, punção-aspiração dos folículos ovarianos e Fertilização *in vitro*) acima descritos fazem parte do seu tratamento, **independente desta pesquisa**, pois os meios de cultura que serão avaliados **são descartados rotineiramente** nesse processo e em nada irá mudar no seu tratamento em função deste estudo.

### 3. OBJETIVO

Esse estudo tem como objetivo traçar o perfil metabólico do meio de cultura embrionário que normalmente é desprezado após a transferência dos embriões e correlacionar com os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário.

### 4. RISCOS E DESCONFORTO

A utilização do meio de cultura é algo rotineiro no programa de fertilização *in vitro* estabelecido nesta Universidade há mais de dez anos.

É importante ressaltar que **participando ou não desta pesquisa** você será submetida ao estímulo ovariano controlado (tratamento medicamentoso), exames de ultra-sonografia transvaginal, punção-aspiração de folículos ovarianos sob anestesia no centro cirúrgico, Fertilização *in vitro* e cultivo embrionário, pois fazem parte do procedimento clínico, **independente da pesquisa**.

Todos os riscos e desconfortos são inerentes ao tratamento e não à pesquisa. Portanto, **não há risco ou desconforto** para você em decorrência desta pesquisa, **uma vez que o meio de cultura utilizado no procedimento de reprodução assistida é descartado após a transferência dos embriões de acordo com o protocolo de fertilização *in vitro* do laboratório desta Universidade**. Para tanto preciso de sua autorização para avaliar **o meio de cultura que será descartado**.

### 5. BENEFÍCIOS

**Não haverá benefícios** imediatos para você em participar deste estudo.

### 6. CONFIDENCIALIDADE

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes e a confidencialidade de todos os registros será mantida; entretanto, o Hospital São Paulo e o Ministério da Saúde poderão examinar os seus registros se necessário.

## 7. DANOS RELACIONADOS A ESTA PESQUISA

Como se trata de um procedimento estritamente relacionado ao tratamento de Fertilização *in vitro*, esta pesquisa não oferece **nenhum risco para a paciente** que concordar em participar deste projeto, **pois será utilizado apenas material de descarte**.

## 8. DÚVIDAS SOBRE A PESQUISA

Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, ou desenvolver qualquer problema relacionado à pesquisa, você deverá entrar em contato com o pesquisador principal.

Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Disciplina de Urologia – Departamento de Cirurgia

Rua Napoleão de Barros, 715, 2º andar

Telefone: 5576-4062

Comitê de Ética

Rua Botucatu, 572 – 1º andar Cj. 14

Telafone: 5571-1062 / Fax: 5539-7162

email: [cepunifesp@epm.br](mailto:cepunifesp@epm.br)

## 9. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação neste estudo é **voluntária**. **A sua recusa em participar não prejudicará o seu tratamento futuro ou os benefícios oferecidos pelo Hospital São Paulo**. Você é livre para deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem que haja qualquer penalidade ou prejuízo do tratamento médico.

Como só serão utilizados meios de cultura que são **descartados no procedimento de rotina**, não há nada que justifique uma indenização em decorrência desta pesquisa, **pois não haverá alteração na rotina do tratamento clínico pré-estabelecido no Programa de Fertilização *in vitro* da Universidade**.

## 10. DESPESAS E COMPENSAÇÕES

Você não terá despesas pessoais participando desta pesquisa em qualquer fase deste estudo, **pois os exames, procedimentos, consultas e hospitalização já fazem parte do seu tratamento, independente deste estudo**.

Você não terá compensação financeira por sua participação, pois não há dano pessoal em decorrência deste estudo que avaliará o material que, como rotina, é considerado **descarte**.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise do perfil metabólico do meio de cultura utilizado para cultivo de embriões humanos em diferentes estágios do desenvolvimento”.

Eu discuti com o Dr. Agnaldo Pereira Cedenho sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Assinatura do paciente/representante legal

Data    /    /

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

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Data    /    /

## Anexo 2

**Composição do meio de cultivo embrionário – *ECM* (*Early Cleavage Medium*)**  
[Irvine Scientific®, Santa Ana, Califórnia, EUA]).

### Formulação

| Componentes            | mM        |
|------------------------|-----------|
| Glicose                | 0,50      |
| Cloreto de sódio       | 102,7     |
| Cloreto de potássio    | 2,50      |
| Sulfato de magnésio    | 0,20      |
| Cloreto de cálcio      | 1,70      |
| Bicarbonato de sódio   | 25,0      |
| Piruvato de sódio      | 0,33      |
| Lactato de sódio (D/L) | 20,77     |
| Alanil-glutamina       | 0,50      |
| Taurina                | 0,05      |
| Citrato de sódio       | 0,15 mg/L |
| EDTA, desidratado      | 10 µM     |
| Vermelho de fenol      | 4,8 mg/L  |
| Sulfato de gentamicina | 10 µg/mL  |

### **Anexo 3**

**Composição do soro para suplementação do meio de cultivo embrionário -**  
Suplemento Substituto do Soro (**SSS** [Irvine Scientific<sup>®</sup>, Santa Ana, Califórnia, EUA]).

#### **Formulação**

| <b>Componentes</b>           |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| Proteína total               | 6% peso/volume em solução salina |
| HSA (Albumina humana sérica) | 84%                              |
| Alfa e Beta Globulinas       | 16%                              |

## Anexo 4

**Gradiente programado no HPLC para a eluição dos aminoácidos derivatizados.**

|   | <b>Tempo (min)</b> | <b>Concentração<br/>Bomba A (%)</b> | <b>Concentração<br/>Bomba B (%)</b> | <b>Fluxo<br/>(mL/min)</b> |
|---|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1 | 0                  | 100                                 | 0                                   | 1,0                       |
| 2 | 12                 | 54                                  | 46                                  | 1,0                       |
| 3 | 15                 | 0                                   | 100                                 | 1,0                       |
| 4 | 16                 | 0                                   | 100                                 | 1,0                       |
| 5 | 17                 | 0                                   | 100                                 | 1,5                       |
| 6 | 18                 | 0                                   | 100                                 | 1,5                       |
| 7 | 20                 | 100                                 | 0                                   | 1,5                       |
| 8 | 21                 | 100                                 | 0                                   | 1,0                       |

## **Anexo 5**

- **Solução Tampão de Análise de Aminoácidos**

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Acetato de sódio           | 19 gr   |
| Água padrão cromatográfico | 1000 mL |
| Trietilamina               | 0,5 mL  |
| Solução de EDTA pH 8,0     | 200 µl  |

Titular pH 6.4 com ácido acético glacial e filtrar.

- **Solução estoque EDTA**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| EDTA                       | 100 mg |
| Água padrão cromatográfico | 100 mL |

Sonicar para dissolver.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Sinclair KD, Lea RG, Rees WD, Young LE. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Reproduction* 2007;64(Suppl):425-43.
2. Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes. Membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 2001;121:447-54.
3. Booth PJ, Humpherson PG, Watson TJ, Leese HJ. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro. *Reprod* 2005;130:655-68.
4. Thompson JG. The impact of nutrition of the cumulus oocyte complex and embryo on subsequent development in ruminants. *J Reprod Dev* 2006;52:169-75.
5. Goodacre R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *J Exp Bot* 2005;56(410):245-54.
6. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;17:999-1005.
7. Houghton FD, Leese HJ. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115(suppl 1):S92-6.
8. Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, et al. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum. Reprod* 2004;19:2319-24.



9. Partridge RJ, Leese HJ. Consumption of amino acid by bovine preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:945-50.
10. Copeland KC, Nair KS, Kaplowitz PB, Robbins DC, Calles-Escandon J. Discordant metabolic actions of insulin in extreme lipodystrophy of childhood *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(5):1240-5.
11. Schulz G e Schimer R. Principles of Protein structure. Springer-Verlag;1979.
12. Petsko G e Ringe D. Proteins Structure and Function. New Science Press 2004.
13. Campbell MK. Bioquímica. Artmed; 2006, 3º ed.
14. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2007;69:1109-17.
15. Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K. Early human embryo metabolism. *Bioessays* 1993;15:259-264.
16. Thompson JG., Sherman AN, Allen NW et al. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;50: 139-145.
17. Baumann CG, Morris DG, Sreenan JM, Leese HJ. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Mol Reprod and Dev* 2007;74,1345-1353.
18. Epstein CC, Smith SA. Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology* 1973;33:171-184.
19. Gardner DK, Clarke RN, Lechene CP, Biggers JD. Development of a noninvasive ultramicrofluorometric method for measuring net uptake of glutamine by single preimplantation mouse embryos. *Gamete Research* 1989;24:427-438.

20. Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1984;72:9-13.
21. Curi R. Glutamina: Metabolismo e aplicações clínicas no esporte. Rio de Janeiro: Sprint; 2000.
22. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential aminoacid? *Nutr Rev* 1990;48(8):297-309.
23. Neu J, Shenoy V, Chakrabarti R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *Faseb J* 1996;10(8):829-37.
24. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, et al. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 2005b; 204(2):392-401.
25. Rowbottom DG, Keast D, Morton AR. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med* 1996;21(2):80-97.
26. Parry-Billings M, Blomstrand E, McAndrew N, Newsholme EA. A communication link between skeletal muscle, brain, and cells of the immune system. *Int J Sports Med* 1990;11 suppl 2:122-8.
27. Jepson MM, Bates PC, Broadbent P, Pell JM, Millward DJ. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1988;255 (2 Pt 1):E166-72.
28. Wu F, Orlefors H, Bergstrom M et al. Uptake of C- and C-labelled glutamate, glutamine and aspartate in vitro and in vivo. *Anticancer Research* 2000;20:251-256.
29. Carney EW, Bavister BD. Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight-cell embryos in vitro. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1987;4:162-167.

30. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. Journal of Reproduction and fertility 1989;86:679-688.
31. Rieger D, Guay P. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. J Reprod Fertil 1988;83:585-591.
32. Rieger D, Betteridge KJ. Development related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. Reprod Fertil Dev 1992;4:547-557.
33. Humpherson PG, Leese HJ, Sturmey RG. Amino acid metabolism of the porcine blastocyst. Theriogenology 2005;64:1852-1866.
34. Devreker F, Winston RM, Van den Bergh M et al. amino acids promote human blastocysts development in vitro. Hum Reprod 1998;69:293-299.
35. Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, Takahashi M. Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and in vitro development of porcine preimplantation embryos. Zygote 2007;15:317-324.
36. Lawitts JA, Biggers JD. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. Mol Reprod Dev 1992;31:189-194.
37. Zielke HR, Ozand PT, Tildon JT et al. Growth of human diploid fibroblasts in the absence of glucose utilization. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1976;73:4110-4114.
38. Summers Mc, McGinnis LK, Lawitts JA e Biggers JD. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. Hum Reprod 2005;20:1364-1371.
39. Vollhardt, K.P.C, Score, N.E., *Organic Chemistry* (2<sup>nd</sup> edition), W.H.Freeman and Company, New York: 1994:1031-1034.

40. Van Winkle LJ, Haghighat N, Campione AL. Glycine protects preimplantation mouse conceptus from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. J Exp Zoo 1990;253:215-219.
41. McKiernan SH, Clayton MK, Bavister BD. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos *in vitro*. Mol Reprod Dev 1995;42:188-199.
42. Donnay I, Partridge RJ, Leese HJ. Can embryo metabolism be use for selecting bovine embryos before transfer? Reprod Nut dev 1999;39:523-233.
43. Orsi NM, Leese HJ. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. Theriogenology 2004a;61:561-572.
44. Orsi NM, Leese HJ. Ammonium exposure and pyruvate affect the amino acid metabolism of bovine blastocysts in vitro. Reproduction 2004b;127:131-140.
45. Eagle H. Utilization of dipeptides by mammalian cell in tissue culture. Proc Soc Explt Biol Med 1955;89:96-99.
46. Felix EP, Cardoso AA. Amônia (NH<sub>3</sub>) atmosférica: fontes, transformação, sorvedouros e métodos de análise. Quím. Nova 2004; 27(1):123-30.
47. World Health Organization (WHO) – Ammonia. In: The Environmental Health Criteria Series, Geneva, Who – IPCS (1986)/ Environmental Health Criteria 54.
48. Gardner D.K.; Lane, M.; Spitzer, A.; Batt, P.A. Enhanced rates of cleavage and development of sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod 1994;50:390-400.

49. Lane M e Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression, and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003;69:1109-17.
50. Nakazawa T, Ohashi K, Yamada M, Shinoda S, Saji F, Murata Y, Araki H. Effect of different concentrations of amino acids in human serum and follicular fluid on the development of one-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod Fertil* 1997;111:27-332.
51. Gardner DK e Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993;48:377-385.
52. Zander DL, Thompson JG, Lane M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biol Reprod* 2006;74:288-294.
53. Lane M e Gardner DK. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 1994;102:305-312.
54. Virant-Klun I, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E et al. Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2006;85:378-383.
55. Carreto JI, Carignan MO, Daleo G, Demarco SG. Occurrence of Mycosporine-Like Amino Acids in the Red-Tide Dinoflagellate alexandrium-Excavatum – UV-Photoprotective compounds. *Journal of Plankton Research* 1990;12(5):909-92.
56. Skoog AD, Holler JF, Nieman AT. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman; 2002:641-653.
57. Alikani M., Sadowy S., Cohen J. Human embryo morphology and developmental capacity. In: Van Soom A., Boerjan M., editors. *Assessment of Mammalian Embryo*

Quality, Invasive and Non-invasive techniques. Kluwer Academic Publishers 2002;1-31.

58. Sinclair KD & Singh R. Metabolomic: Approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 2007;S56-S62.
59. Heinrickson, R. L. & Meredith, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* 1984;136:65-74.
60. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev* 1995;41:232-238.
61. Lane M, Gardner DK. Amino acids and vitamins prevent culture induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 1998;13:991-997.
62. Rosenkranks CF e First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci* 1994;72:434-437.
63. Lee ES e Fukui Y. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by in vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Bio of Reprod* 1996;55:257-267.
64. Petters R, Johnson B, Reed M, Archibong A. Glucose, glutamine, and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J of Reprod Fertil* 1990;89:269-275.
65. Yoshioka K, Susuki C, Tanaka A et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol of Reprod* 2002;66:112-119.
66. Devreker F, Hardy K, van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S, Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:749-756.

67. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. III. The effects of fixed-nitrogen source. *J Exp Zool* 1965;158:69-78.
68. Juetten J, Bavister BD. The effects of amino acids, cumulus cells, and bovine serum albumin on in vitro fertilization and first cleavage of hamster eggs. *J of Exp Zoo* 1983;227:487-490.
69. Lane M, Gardner DK. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:398-403.
70. Pinyopummintr T e Bavister B. Effects of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reprod Fert and Dev* 1996;8:835-841.
71. Liu Z e Foote RH. Effects of amino acids and  $\alpha$ -amanitin on bovine embryos development in a simple protein-free medium. *Mol Reprod and Dev* 1997;46:278-285.
72. Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 1997;14:153-164.
73. Frayn KN. Metabolic regulation. In Snell, K. *Frontiers of Metabolism* 1. Portland Press Ltd, London; 1997
74. Chen P e Harcum SW. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *J of Biotech* 2005;117:277-286.
75. Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL e Jefferson LS. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* 1999;274:11647-11652.

76. Lynch CJ, Fox HL, Vary TC, Jefferson LS e Kimball SR. Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. *J Cell Biochem* 2000;77:234-251.
77. Lane M, Hooper K, Gardner DK. Effect of essential amino acids on mouse embryo viability and ammonium production. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:519-525.
78. Lane M, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000;62:16-22.
79. Agarwal A., Behr B., Burns DH., Nagy P., Sakkas D., Scott R. Metabolomic biomarkers of oxidative in ART: A rapid, non-invasive methodology to assess the selective viable gametes and embryos from their non-viable cohorts. In: *Proceedings of the Second international conference on cryopreservation of human oocyte* 2006.
80. Seli E., Sakkas D. Behr B., Nagy P., Kwok JS., Burns DH. Non-invasive metabolomic profiling of human embryo culture media correlates with pregnancy outcome. Initial results of the metabolomics study group for ART. In: *Proceedings of the 62nd annual meeting of American Society for Reproductive Medicine*; 2006.
81. Gardner DK e Sakkas D. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer – a review. *Placenta* 2003;24:5-12.
82. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats, Hompes PGA, Burns DH e Lambalk CB. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008;23:1499-1504.
83. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:325–32.



84. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997;18:454–60.
85. Margolin Y, Aten RF e Behrman HR. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1990;127:245-250.
86. Miyazaki T, Sucota K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bukley GB e Wallach EE. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 1991;91:207-212.
87. Riley JC e Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991b;198:781-791.
88. Sawada M e Carlson JC. Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1996;137:1580-1584.
89. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J e Agarwal A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004;82:593-600.
90. Kim IH, Van Langendonck A, Van Soest A, Vanroose G, Cusi AL, Hendriksen PJ e Bevers MM. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999;52:537-547.
91. Ali AA, Bilodeau JF e Sirard MA. An antioxidant requirement for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003;59:939-949.
92. Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Regulation of intracellular pH in hamster preimplantation embryos by the sodium hydrogen ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) antiporter. *Biol Reprod* 1998;59:1483-1490.

93. Lane M, Baltz JM, Bavister BD. Bicarbonate/chloride exchange regulates intracellular pH of embryos but not oocytes of the hamster. *Biol Reprod* 1999;61:452-457.
94. Lane M e Gardner DK. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 1994;102:305-96.
95. Daniel JC. Studies on the growth of 5-day old rabbit blastocysts in vitro. *J Embryol Exp Morph* 1965;13:83-96.
96. Naglee DL, Maurer RR, Foote RH. Effect of osmolarity on the in vitro development of rabbit embryos in a chemically defined medium. *Exp Cell Res* 1969;58:331-3.
97. Kane MT e Foote RH. Culture of 2- and 4-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970;133:921-5.
98. Menezo YJR. Milieu synthetique pour la survier, et maturation dês gametes ET pour la culture de l'oeuf feconde. *C R Acad Sci (Paris)* 1976;282:1967-70.
99. Menezo Y. Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer. *Fertil Steril* 1984;42:750-5.
100. Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. Transient responses of hybridoma cells to lactate and ammonia pulse and step changes in continuous culture. *Bioproc Eng* 1988;3:113-122.
101. Ozturb SS, Riley MR, Palsson. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and serum concentration. *Biotech Prog* 1992;6:121-128.
102. Street JC, Delort AM, Braddock PSH, Brindle KM. A H-1 N-15 NMR-study of nitrogen-metabolism in cultured mammalian cells. *Biochem J* 1993;291:485-492.

- 103.Hansen HA e Emborg C. Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension Chinese-hamster ovary cell-culture. Biotech Prog 1994;10:121-124.
- 104.Schneider M, Marison IW, VonStockar U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. J Biotechnol 1996;46:161-185.
- 105.Lindsell CE, Ratkumar K, Manning AW, Emery SK, Mapletoft RJ, Murphy BD. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. Theriogenology 1986;25:167.
- 106.Murphy BD, Mapletoft RJ, Manns J, Humphrey WD. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology 1984;21:117-25.
- 107.Donaldson LE e Ward DN. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. Vet Rec 1986;119:625-6.
- 108.Beckers JF. Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superpovulation in cattle.Theriogenology 1987;27:213.
- 109.Conaghan J, Hardy K, handyside AH, Winston RM, Leese HJ. Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology. J Assist Reprod Genet 1993;10:21-30.
- 110.Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. Fertile Steril 2001;76:1175-1180.
- 111.Stokes PJ, Hawkhead JA, Fawthrop RK, Picton HM, Sharma V, Leese HJ, Houghton FD. Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. Hum Reprod 2007;22:829-835.



## Abstract

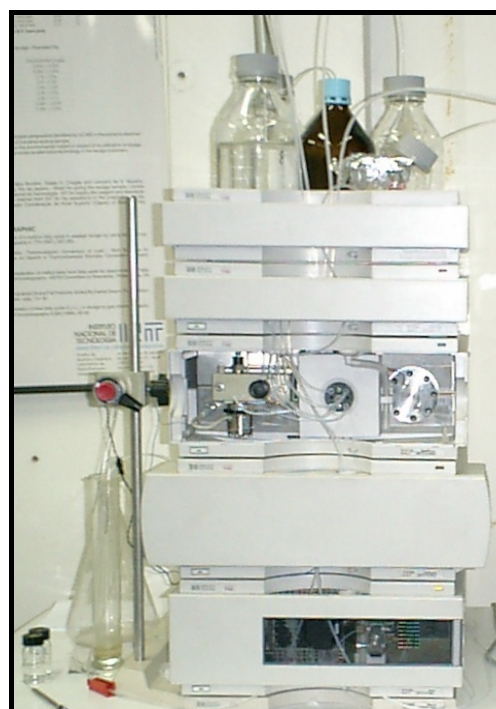
**Objective:** to verify the relations between culture media concentrations of ammonia, alanine, glutamine, and alanyl-glutamine and embryo quality, pregnancy, and type of hormonal stimulation. **Methods:** a prospective case-control study was carried out including 62 embryos from 20 women submitted to assisted reproduction at the São Paulo Federal University. Inclusion criteria were age (up to 37 years old), one to four embryos transferred at day 3 of embryo culture, couples submitted to ICSI, and LH peak achieved through hCG administration. Experimental groups were subdivided according to embryo morphologic quality on days 2 and 3, homogenous (good embryos on days 2 and 3) or heterogeneous evolution, type of hormonal stimulation used (FSH or FSH and LH), and occurrence of pregnancy evaluated by serum  $\beta$ -hCG. Culture media aliquots were collected after the embryos were transferred. Analysis of alanine, glutamine, alanyl-glutamine, and ammonia concentrations was performed using HPLC. Numerical variables were compared between groups using unpaired Student's T-test (heteroscedastic variables were transformed), and frequencies using Pearson's Chi-square or Fisher's exact test. Logistic models were constructed using female age, type of hormone used for stimulation, embryo quality, and the measured metabolites, in order to maximize predictability of occurrence of pregnancy. Data are presented as mean; standard deviation. **Results:** In the embryos transferred to women who achieved pregnancy, when compared to those who did not achieve pregnancy, lower levels of normalized glutamine (1.4; 0.7 and 1.9; 0.7, respectively,  $p=0.004$ ) and ammonia (0.2; 0.01 and 0.3; 0.1, respectively,  $p=0.008$ ) were observed. Higher levels of normalized alanyl-glutamine were observed in higher quality embryos on days 2 and 3, and on those who presented homogeneous evolution. Embryos from patients who received FSH with LH, when compared to those from patients who received only FSH, presented higher absolute values of alanyl-glutamine (334.9; 95.2 and 282.9; 62.4, respectively,  $p=0.017$ ). In logistic regression, the model which best predicted pregnancy included all the normalized values of alanine, glutamine, age, type of hormone, and evolution (77.4% correct,  $p=0.00005$ ). **Conclusion:** Our results allow us to conclude that, in our conditions: (i) embryos with better quality on days 2 and 3 and with a homogenous evolution are associated with higher contents of alanyl-glutamine in their culture media, (ii) lower levels of ammonia and glutamine in the culture media are associated to higher pregnancy rates, and (iii) FSH with LH during hormonal stimulation is associated to higher levels of alanyl-glutamine in the culture media.

**Key words:** Amino acids, Ammonia, Embryo, Fertilization *in vitro*, High Pressure Liquid Chromatography.

## APÊNDICE

### Apêndice 1

HPLC - modelo *HP Hewlett-Packard 1100 series*, utilizado para a análise das amostras.



## **Bibliografia Consultada**

Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR – 6023, Rio de Janeiro, 2000.

Rother ET e Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. São Paulo: Revista e ampliada; 2005.

Ferreira ABH, et al. Novo Aurélio – Dicionário da Língua Portuguesa séc. XXI. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2000.