

Volume 16
Number 4
Jul-Ago 2012
ISSN 1517-5693

JBRA

Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Fertilidade.

Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

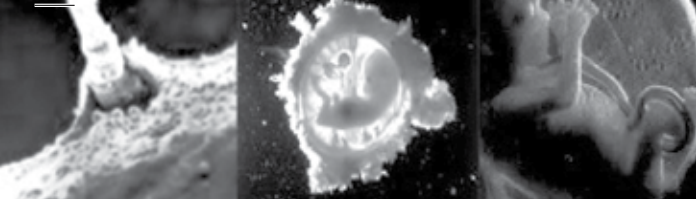
Merck Serono

SAC Merck Serono: 0800.113320

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.





JBRA

Assisted Reproduction

ÓRGÃO DE DIVULGAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO
ASSISTIDA E DA REDE LATINOAMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

ISSN: 1517-5693 - V. 16 | nº4 | Jul-Ago / 2012

INDEXADO NAS SEGUINTE BASES DE DADOS – *Indexed on the following databases:*

Compendex

PERIODICA (México)

EMBASE

Plataforma SCImago Journal & Country Rank

Excepta Médica

PORTAL DE PERIÓDICOS DA CAPES

Geobase

Scopus (Holanda)

JBRA - Assisted Reproduction

Jornalista Responsável:
Heber Maia – MTb 31.660

Endereço para Correspondência:
Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
Av. das Américas, 4666 - Sl. 312 / 313
Barra da Tijuca - RJ CEP 22649-900
E-mail: jornalsbra@cmb.com.br
Fone: (21) 2430-9060
Fax: (21) 2430-9070



**Comercialização, Produção
Editorial e Gráfica:**
AlamTec Ciência Médica Editorial LTDA
Rua das Roseiras, 464
CEP 03144-090 - São Paulo-SP
Tel/Fax: (11) 2341-8045
e-mail: alamtec@br.inter.net
www.alamtec.com.br

CORPO EDITORIAL – EDITORIAL BOARD

Editor – Editor

Maria do Carmo Borges de Souza (G&O Barra/
UFRJ RJ Brasil)

Editor Adjunto – Assistant Editor

Paulo Franco Taitson (ARQ / PUCMG Brasil)

Consultor Editorial – Editorial Consultant

José Gonçalves Franco Jr (UNESP – Botucatu /
CRH SP Brasil)

Editores Associados – Associate Editors

Edson Borges Jr (Fertility / Faculdade de Medicina
de Jundiaí - Inst Sapientiae SP Brasil)

João Batista A Oliveira (CRH SP Brasil)

Selmo Geber (Origen / UFMG Brasil)

Weydson Barros Leal (UFPE Brasil)

CONSULTORES CIENTÍFICOS – Scientific Reviewers

Adelino Amaral Silva (Gênesis / Escola Superior de
Ciências da Saúde DF Brasil)

Agnaldo Lopes da Silva Filho (UFMG Brasil)

Alessandro Schuffner (Conceber PR Brasil)

Álvaro Petracco (Fertilitat/ PUC RS Brasil)

Ana Cristina Allemand Mancebo (G&O Barra RJ Brasil)

Anne R Greenlee (OHSH EUA)

Antonio Requena (IVI Madrid Espanha)

Aroldo Camargos (UFMG Brasil)

Bela Zausner (Gênese BA Brasil)

Bruno Scheffer (IBRRA MG Brasil)

Buenaventura Coroleu (Instituto Universidade Dexeus,
Barcelona Espanha))

Carlos André Henriques (UFRJ / G&O Barra RJ Brasil)

Carlos María Romeo-Casabona (Universidade de
Deusto e do Pais Basco Espanha)

Cesar Cafatti (Clin Los Dominicos Chile)

Claudia Borrero (Conceptum Colombia)

Claudia G Petersen (CRH SP Brasil)

Cláudio Chillik (CEGYR Argentina)

Condesmar Marcondes Filho (Nucl Santista
RH SP Brasil)

David Vantman (CER Chile)

Dirceu H Mendes Pereira (Profert SP Brasil)

Eduardo Pandolfi Passos (SEGIR / UFRGS RS Brasil)

Ernesto Gallardo Lozano (IMER México)

Fabio Firmbach Pasqualotto (Conception /
UCS RS Brasil)

Fernando Zegers-Hochschild (Clin Las Condes Chile)

Francisco Risquez (Clin La Trinidad Venezuela)

Francisco J.B. Sampaio (UERJ Brasil)

Humberto Ikuo Shibasaki (UFMT Brasil)

Jorge Blaquier (Fertilab Argentina)

João Pedro Junqueira Caetano (Pró-Criar/
Mater Dei MG Brasil)

Joaquim Roberto C Lopes (Cenafert BA Brasil)

Jonathas Borges Soares (Faculdade Medicina do ABC /
Projeto Alfa SP Brasil)

Juan Manuel Montoya (Conceptum Colombia)

Ivan Valencia Madera (CEMEFES Ecuador)

Karen Sermon (VUB Bélgica)

Leila Montenegro S Farah (Fertility / Faculdade de
Medicina de Jundiaí - Inst Sapientiae SP Brasil)

Leticia Urdapilleta (Cegyr Argentina)

Lídio Jair Ribas Centa (Androlab/ UFPR Brasil)

Luiz Fernando Dale (C Medicina RJ Brasil)

Madalena Caldas (GERAR PE Brasil)

Marcos Sampaio (Origen MG Brasil)

Mariângela Badalotti (Fertilitat PUC RS Brasil)

Marilena Correa (IMS-UERJ Brasil)

Mario Cavagna (H Perola B/ CRH SP Brasil)

Maria Silva Approbato (UFG Brasil)

Marisa Decat de Moura (IBBRA/Universidade
FUMEC BH Brasil)

Miguel Angel Checa (Universidade Autônoma
de Bracelona Espanha)

Newton Eduardo Busso (Fac. CM Santa Casa de SP /
Unifert SP Brasil)

Paulo Serafini (Huntington/ USP SP Brasil)

Ricardo Melo Marinho (FCMMG MG Brasil)

Roberta Wonchockier (Projeto Alfa SP Brasil)

Roberto Coco (Fecunditas Argentina)

Rose Marie M Melamed (Fertility SP Brasil)

Sidney Glina (Fac. Medicina do ABC /
Hosp Albert Einstein SP Brasil)

Silvana Chedid Chedid-Grieco (SP Brasil)

Sergio Reis Soares (IVI Lisboa Portugal)

Renato Fanchin (Hôpital A. Bécclère,
University Paris-Sud 11 França)

Inovação Recombinante.

Pergoveris

(alfafolitropina e alfalutropina)

Precisão,
pureza e
consistência
na associação
das duas
gonadotrofinas^{1,2}



Referências bibliográficas: 1. Basset R.M. et al. Continued improvements in the quality and consistency of follitropin alfa, recombinant human FSH. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005; 10(2): 169-177(9). 2. Gervais A, et al. Glycosylation of recombinant gonadotrophins: characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology* 2003; 13(3):179-189.

Bula do produto no interior desta publicação. Destinado exclusivamente à classe médica. Veiculado em junho de 2012.

Inovação Recombinante.

Pergoveris

(alfafolitropina e alfalutropina)

Pergoveris® alfafolitropina (r-hFSH) 150UI (11µg) alfalutropina (r-hLH) 75UI (3µg). USO SUBCUTÂNEO USO ADULTO **Indicações:** Pergoveris® é indicado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Nos ensaios clínicos, estas pacientes foram definidas por um nível sérico de LH <1,2 UI/L. **Contra-indicações:** Hipersensibilidade à alfafolitropina, alfalutropina ou a qualquer dos excipientes; tumores do hipotálamo ou da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos não originados por doença do ovário policístico; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida; carcinoma do útero, ovário ou mama e nas situações em que não é possível a obtenção de uma resposta efetiva (insuficiência ovariana primária, malformações dos órgãos sexuais incompatíveis com gravidez e fibromiomas uterinos incompatíveis com gravidez). **Cuidados e Advertências:** Na mulher, a utilização segura e eficaz de Pergoveris® requer monitorização ecográfica regular da resposta ovariana, de preferência em conjunto com a determinação dos níveis séricos de estradiol. Deve ser utilizada em mulheres a dose mínima eficaz em relação ao objetivo do tratamento. As pacientes devem ser avaliadas para as seguintes situações, devendo ser instituído um tratamento específico apropriado: hipotireoidismo; insuficiência da supra-renal; hiperprolactinemia; tumores do hipotálamo ou da hipófise. A síndrome de hiperestimulação ovariana (OHSS) é uma situação clínica distinta da hipertrofia ovariana assintomática, podendo se manifestar em graus crescentes de gravidade. Uma resposta excessiva ovariana ao tratamento com gonatropinas raramente origina uma OHSS, exceto quando se administra hCG para induzir a ovulação. Portanto, em casos de hiperestimulação ovariana é prudente não administrar hCG e recomendar à paciente que se abstenha de ter relações sexuais ou utilize métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Em mulheres submetidas à indução da ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é aumentada quando comparada à concepção natural. A maioria das concepções múltiplas é de gêmeos. Gravidez e aleitamento: Pergoveris® não deve ser administrado durante a gravidez ou o aleitamento. **Reações adversas:** Cefaléia, exacerbação de asma, dor abdominal e sintomas gastro-intestinais, tromboembolismo normalmente associado com síndrome de hiperestimulação ovariana grave (OHSS), reações no local da injeção. Reações alérgicas sistêmicas leves (eritema cutâneo, edema, urticária, dificuldades respiratórias) e graves (reações anafiláticas). Cistos ovarianos, dor mamária, dor pélvica, OHSS, torção do ovário. **Interações medicamentosas:** Pergoveris® não deve ser administrado com outros medicamentos na mesma seringa, exceto com alfafolitropina. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente. Um regime posológico recomendado inicia-se com a administração diária de um frasco de Pergoveris®. Caso um aumento da dose de FSH seja considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado preferencialmente após intervalos de 7-14 dias e com incrementos de 37,5 a 75 UI, utilizando um medicamento contendo alfafolitropina. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos por até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de 5.000 UI a 10.000 UI de hCG, 24 a 48 horas após a última injeção de Pergoveris®. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG e no dia seguinte. Caso se obtenha uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Cuidados de conservação:** Prazo de validade: 24 meses. Este medicamento é de uso único e deve ser utilizado imediatamente após abertura e reconstituição. Conservar em temperatura entre 15 e 30°C. Conservar na embalagem original para proteger da luz. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Registro MS: 1.0089.0360.

Contraindicação: carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Pergoveris® não deve ser administrado com outros medicamentos na mesma seringa, exceto com alfafolitropina.

AO PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.

Destinado exclusivamente à classe médica. Veiculado em junho de 2012.

DIRETORIA DA SBRA - 2011/2012**PRESIDENTE**

Adelino Amaral Silva

VICE PRESIDENTE

Edson Borges Júnior

SECRETÁRIO

Paulo Franco Taitson

TESOUREIRA

Hitomi Miura Nakagava

DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES**EDITORA**

Maria do Carmo Borges de Souza

EDITOR ADJUNTO

Paulo Franco Taitson

e-mail: jornalsbra@cmb.com.br

Diretoria da REDLARA - 2011-2014**DIRETORA EXECUTIVA**

Maria do Carmo Borges de Souza

Brasil

E-mail: direjecutiva@redlara.com

mariadocarmo@cmb.com.br

VICE DIRETOR EXECUTIVO

Roberto Coco

Argentina

E-mail: robertococo@fecunditas.com.ar

DIRETORES REGIONAIS**REGIÃO:** Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Panamá, República Dominicana

Carlos Félix Arce

México

carfelar@infosel.net.mx

REGIÃO: Bolívia, Chile & Peru

Fabrizio Vizcarra Alosilla

Peru

favizcarraredlara@gmail.com

REGIÃO: Colômbia, Equador & Venezuela

María Teresa Urbina

Venezuela

E-mail: mturbina@hotmail.com

REGIÃO: Argentina, Paraguai & Uruguai

Gabriel Fiszbajn

Argentina

E-mail: fiszbajn@cegyr.com

REGIÃO: Brasil

Selmo Geber

Brasil.

E-mail: selmogeber@origen.com.br

SECRETÁRIA EXECUTIVA

Marina Diaz

México

E-mail: info@redlara.com

INFORMAÇÕES GERAIS

1. O JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – www.sbra.com.br) e da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida (www.redlara.com) para conteúdos científicos, com periodicidade bimestral. É dirigido a especialistas e pesquisadores em saúde, particularmente ginecologistas, andrologistas, biólogos, urologistas e embriologistas. São aceitos para avaliação estudos básicos e clínicos nas áreas de reprodução assistida, infertilidade, genética reprodutiva, imunologia reprodutiva, andrologia, microbiologia reprodutiva, laboratório em reprodução assistida e endocrinologia ginecológica, sob a forma de artigos originais, artigos de revisão, artigos de atualização e relatos de caso (conforme detalhamento a seguir). Os artigos podem ser submetidos nos idiomas português, espanhol ou inglês. Autores interessados em traduzir seu artigo para inglês podem solicitar um orçamento de tradução ao J Bras Rep Assist.

2. Artigos submetidos ao JBRA Assisted Reproduction devem ser inéditos, isto é, não devem ter sido publicados nem submetidos para análise por outras revistas, no todo ou parcialmente. Em casos de figuras já publicadas, autorização deve ser obtida e a fonte deve ser citada. Uma vez publicados, os artigos passam a ser de propriedade da SBRA.

3. As Instruções para Autores do JBRA Assisted Reproduction incorporam as recomendações dos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. A versão completa do texto está disponível em www.icmje.org. Manuscritos que estiverem em desacordo com as instruções aqui apresentadas serão devolvidos para a incorporação de ajustes antes da avaliação pelo Conselho Editorial.

4. Todo artigo publicado no JBRA Assisted Reproduction passa pelo processo de revisão por especialistas (peer review). Os artigos submetidos são primeiramente encaminhados aos editores para uma avaliação inicial quanto ao escopo do trabalho e às exigências editoriais do Jornal. Se a avaliação é positiva, o artigo é enviado a dois revisores especialistas na área pertinente. Todo o processo é anônimo, ou seja, os revisores são cegos quanto à identidade dos autores e seu local de origem e vice-versa. Após a avaliação do artigo pelos revisores, os artigos podem ser aceitos sem modificações, recusados ou devolvidos aos autores com sugestões de modificações, sendo que cada artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e modificações, sem que isso implique necessariamente a aceitação futura do trabalho.

5. O número de autores de cada manuscrito fica limitado a seis. O conceito de co-autoria implica contribuição substancial na concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados e redação ou revisão crítica do texto. Contribuições significativas feitas ao estudo, mas que não se enquadram nesses critérios, podem ser citadas na seção de agradecimentos.

6. Artigos de pesquisas clínicas (clinical trials) devem ser registrados em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde e pelo International Committee of Medical Journal Editors (por exemplo, www.actr.org.au, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm e www.trialregister.nl). O número de identificação do estudo deverá ser apresentado ao final do resumo.

7. Para textos que forem aceitos para publicação, uma declaração, assinada por todos os autores deverá ser enviada à revista, contendo as seguintes informações: a) o manuscrito é original; b) o manuscrito não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no JBRA Assisted Reproduction; c) todos os autores participaram ativamente na elaboração do estudo e aprovaram a versão final do texto; d) situações de potencial conflito de interesse (financeiro ou de outra natureza) estão sendo informadas; e) foi obtida aprovação do estudo pelo comitê de ética da instituição à qual o trabalho está vinculado (para

artigos que relatam dados de pesquisa experimental; f) foi obtido consentimento informado dos pacientes incluídos no estudo (quando aplicável). As informações sobre a aprovação do estudo por comitê de ética e a obtenção de consentimento informado também devem constar na seção Métodos do artigo.

8. Antes da publicação dos artigos aceitos, os autores correspondentes receberão, via e-mail, em arquivo PDF, o artigo editorado para aprovação. Nessa fase, as correções devem limitar-se a erros tipográficos, sem alteração do conteúdo do estudo. Os autores deverão devolver as provas aprovadas via e-mail ou fax até 48 horas após o recebimento da mensagem.

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

Artigos originais. Trabalhos resultantes de pesquisa científica que apresentam dados originais sobre aspectos experimentais ou observacionais de caráter médico, biológico, bioquímico e psicossocial e incluem análise estatística descritiva e/ou inferências de dados próprios. Esses artigos têm prioridade para publicação. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto (dividido nas seções Introdução, Métodos, Resultados, Discussão ou equivalentes, Conclusões), agradecimentos (se aplicável), lista de referências (máximo de 40), tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Artigos de revisão. Trabalhos que têm por objetivo resumir, analisar, avaliar ou sintetizar trabalhos de investigação já publicados em revistas científicas. Devem incluir síntese e análise crítica da literatura levantada e não ser confundidos com artigos de atualização. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, lista de referências, tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Artigos de atualização ou opinião. Trabalhos que relatam informações geralmente atuais sobre tema de interesse para determinadas especialidades (por exemplo, uma nova técnica ou método). Têm características distintas de um artigo de revisão, visto que não apresentam análise crítica da literatura. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, lista de referências, tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Relatos de caso. Artigos que representam dados descritivos de um ou mais casos, explorando um método ou problema através de exemplo(s). Os casos escolhidos devem ser de grande interesse, com doença ou evolução incomuns ou submetidos a tratamentos inusitados ou alternativos. Podem envolver humanos ou animais e devem apresentar as características do indivíduo estudado (sexo, idade, etc.). Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto (dividido nas seções Introdução, Descrição do caso e Discussão ou equivalentes), lista de referências, legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Cartas ao leitor. Cartas ao editor comentando, discutindo ou criticando os artigos publicados no JBRA Assisted Reproduction serão bem recebidas e publicadas desde que aceitas pelo Conselho Editorial. Devem ser compostas de: título, nome do autor, identificação da publicação que está sendo comentada e lista de referências (se houver). Recomenda-se um máximo de 500 palavras, incluindo referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada juntamente com a carta.

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

Utilize preferencialmente o processador de texto Microsoft Word®. Os trabalhos devem ser digitados em fonte Times New Roman tamanho 12, espaço simples, alinhados à esquerda, iniciando cada seção em página nova, na seguinte ordem: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, agradecimentos, lista de referências, tabelas, legendas de figuras e figuras. Todas as páginas devem ser numeradas.

Siglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; após a primeira ocorrência, somente a sigla deverá ser utilizada. No resumo, o uso de siglas deve ser evitado. Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses.

A apresentação de unidades de medida deve seguir o sistema internacional (SI).

Genes de animais devem ser apresentados em itálico com inicial maiúscula (exemplo: Sox2); genes de seres humanos também devem ser apresentados em itálico, porém com todas as letras maiúsculas (exemplo: SOX2). Proteínas devem seguir o mesmo padrão de maiúsculas/minúsculas, porém sem itálico.

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

- Título conciso e explicativo, representando o conteúdo do trabalho, em português e inglês
- Título resumido (máximo de 40 caracteres)
- Nomes dos autores
- Afiliação dos autores, indicando departamento/unidade, instituição e região geográfica
- Nome da instituição onde o trabalho foi executado
- Informações sobre auxílios recebidos sob a forma de financiamento, equipamentos ou medicamentos
- Congressos onde o estudo foi apresentado
- Nome, endereço, telefone, fax e email do autor correspondente

RESUMO E ABSTRACT

Todos os trabalhos devem apresentar um resumo em português e um abstract em inglês. Trabalhos escritos em espanhol devem apresentar, além do resumo no idioma original, também um resumo em português e um abstract em inglês. O conteúdo dos textos deve ser idêntico, e não deve ultrapassar 250 palavras. Para artigos originais, o resumo deve ser estruturado como segue: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Para relatos de caso, artigos de revisão e artigos de atualização, o resumo não deve ser estruturado. Deve-se evitar o uso de abreviações no resumo, e não devem ser citadas referências.

Logo após o resumo/abstract/resumen, deverão ser apresentadas de três a seis palavras-chave que sejam integrantes da lista de Descritores em Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br>).

AGRADECIMENTOS

Esta seção é dedicada a reconhecer o trabalho de pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica co-autoria, ou de pessoas ou instituições que tenham dado apoio material.

REFERÊNCIAS

No texto, as citações serão identificadas entre parênteses, pelo sobrenome do autor seguido do ano de publicação. Exemplos: um autor (Steptoe, 1978), dois autores (Edwards & Steptoe, 1980), mais de dois autores (Van Steirteghem et al., 1988).

A lista de referências deve ser apresentada em ordem alfabética (último sobrenome de cada autor seguido das duas primeiras iniciais), e não deve ser numerada. Trabalhos do mesmo autor devem ser ordenados cronologicamente; trabalhos de mesmo autor e ano devem ser identificados com letras após o ano (2000a, 2000b, etc.). A apresentação das referências seguirá os modelos propostos nos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (ver exemplos a seguir). Todas as referências citadas na lista devem ser mencionadas no texto e vice-versa.

1. Artigo de periódico

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:737-56.

2. Livro

Wolf DP, Quigley MM, eds. *Human in vitro fertilization and embryo transfer.* New York: Plenum Press; 1984.

3. Capítulo de livro

Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH, eds. *Genetic mechanisms of sexual development.* New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.

4. Artigo de revista eletrônica

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [revista eletrônica].* 2002 Jun [citado 2002 ago 12];102(6):[aproximadamente 3 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

5. Artigo publicado na Internet:

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res.* 2004;6(4):e40. Disponível em: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Acessado: 29/11/2004.

6. Site

OncoLink [site na Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [atualizado 2004 set 24; citado 2006 mar 14]. Disponível em: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

7. Software

Smallwaters Corporation. *Analysis of moment structures: AMOS [software].* Version 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

TABELAS E FIGURAS

Tabelas e figuras (gráficos, fotografias, etc.) devem ser numeradas em algarismos arábicos conforme a ordem de aparecimento no texto e devem ter legendas individuais, apresentadas ao final do trabalho. Cada tabela e figura deve ser submetida em folha separada.

Nas tabelas, deverão ser utilizadas apenas linhas horizontais, e cada dado deverá constar em uma célula independente. Explicações sobre itens das tabelas devem ser apresentadas em notas de rodapé identificadas pelos seguintes símbolos, nesta seqüência: *,†, ‡, §, ||,¶,**,††,‡‡.

Figuras em geral (gráficos, fotografias, etc.) serão publicadas em preto e branco. Despesas com a eventual reprodução de fotografias em cor serão de responsabilidade do autor.

Figuras podem ser submetidas eletronicamente, nas extensões .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi (para possibilitar uma impressão nítida), ou por correio (ver instruções de envio mais adiante). Todas as figuras enviadas pelo correio devem ser identificadas no verso com o uso de etiqueta colante contendo o nome do primeiro autor, o número da figura e uma seta indicando o lado para cima.

Fotografias escaneadas não serão aceitas; fotografias em papel devem ser encaminhadas pelo correio. Fotografias de pacientes não devem permitir sua identificação.

Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões. Figuras já publicadas e incluídas em artigos submetidos devem indicar a fonte original na legenda e devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos (editora ou revista).

ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Os artigos devem ser submetidos preferencialmente por email (jornalsbra@cmb.com.br). Texto e figuras devem ser enviadas como um anexo à mensagem. Figuras (exclusivamente gráficos e fotografias digitais) podem ser enviadas nas extensões .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi e tamanho máximo total (do conjunto de figuras) de 3 MB. Se a submissão por email não for possível, duas cópias do texto e figuras devem ser enviadas para o endereço a seguir:

Profa. Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
 Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida
 Centro Médico BarraShopping
 Av. das Américas, 4666, salas 312/313
 CEP 22649-900 – Rio de Janeiro, RJ
 Fone: (21) 2430.9060
 Fax: (21) 2430.9070
<http://www.sbra.com.br>

GENERAL INFORMATION

1. JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) is the official publication by both the Brazilian Society of Assisted Reproduction (SBRA - www.sbra.com.br) and the Latin America Network of Assisted Reproduction (www.redlara.com) destined to scientific-based and bimonthly issued papers. It is designated to specialists and researchers in the health area, in particular to gynecologists, andrologists, biologists, urologists and embryologists. Basic and clinical studies in the areas of assisted reproduction, infertility, reproductive genetics, reproductive immunology, andrology, reproductive microbiology, laboratory in assisted reproduction and gynecological endocrinology will be accepted for evaluation in the form of original articles, reviews, update articles and case reports (as detailed below). Articles may be submitted in Portuguese, Spanish or English. Authors interested in having their articles translated into English may request an estimate at J Bras Rep Assist.

2. Papers submitted to JBRA Assisted Reproduction must be original, that is, they cannot have been either published or submitted for analysis by other journals, partially or in the whole. In cases where the illustrations have been published previously, an authorization must be granted and the source cited. Once published, the copyright of the articles belongs to SBRA.

3. The Instructions for Authors by JBRA Assisted Reproduction is comprised of the recommendations given by the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. The complete version of the text is available at www.icmje.org. Manuscripts not in accordance with the instructions presented herein will be returned for modifications to be made before the Editorial Board has evaluated them.

4. Every article published in JBRA Assisted Reproduction undergoes a review process by specialists (peer review). Submitted articles are primarily sent to editors for an initial evaluation as to the scope of the work and the editorial demands of the journal. In case of a positive evaluation, the article is then sent to two reviewers specialized in the appropriate area. Every process is anonymous, that is, reviewers are not aware of author's identity and place of origin and vice versa. After the articles are evaluated by reviewers, they can be accepted without alterations, refused or returned to authors along with suggestions for modifications. Each article may return to its author several times for clarification and alteration, without necessarily meaning a future acceptance of the article.

5. The number of authors for each manuscript is limited to six. The co-authorship concept connotes substantial contribution in the creation and planning of the paper, analysis and interpretation of data not to mention the writing and critical revision of the text. Significant contributions given to the study which do not fit these criteria may be cited in the acknowledgements section.

6. Clinical trials articles should be registered in the Clinical Trials Registry validated by the criteria established by the World Health Organization and by the International Committee of Medical Journal Editors (for instance, www.actr.org.au, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm and www.trialregister.nl). The study identification number shall be presented at the end of the abstract.

7. For texts accepted for publication, a statement signed by all authors shall be sent to the journal, including the following information: a) the manuscript is original; b) the manuscript has not been previously published nor submitted to any other journal, and will not be published in case it is accepted by JBRA Assisted Reproduction; c) all authors have actively taken part in the preparation of the study and have approved of the final version of the text; d) situations on potential conflict of interests (either financial or of any other nature) are being informed; e) an approval of the study by the Ethics Committee of the institution to which the paper is linked was obtained (for articles reporting experimental research data; f) an informed consent by the patients included in the

study was obtained (when applicable) . All information on the approval of the study by the Ethics Committee and the possession of an informed consent should also be mentioned in the Methods section of the article.

8. Before the publication of accepted articles, the corresponding authors will receive the published article via e-mail attachment in a PDF archive for approval. At this point, corrections should be limited to typographic mistakes, without altering the content of the study. Authors should return approved papers by e-mail or fax 48 hours after receiving the message.

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

Original articles. Pieces of work resulting from scientific research presenting original data about experimental or observational aspects of medical, biological, biochemical and psychosocial character and including descriptive statistical analysis and/or inferences of own data. These articles have priority for publication. They must be composed of: title page, resumo e palavras-chave (in Portuguese)abstract and keywords, text (divided in Introduction, Methods, Results, Discussion or equivalent, Conclusion), acknowledgments (if applicable), references (40 at the most), tables (if available), figure legends (if available) and figures (if available).

Reviews. Papers whose aim is to summarize, analyze, evaluate or synthesize investigative papers already published in scientific journals. They must include a synthesis and critical analysis of the researched literature and cannot be confused with update articles. They must be composed of: title page, resumo e palavras-chave (in Portuguese), abstract and keywords, text, references, tables (if available) ,figure legends (if available) and figures (if available).

Update or opinion articles. Papers reporting usually current information on themes of interest to certain specialties (such as a new technique or method). They have different characteristics from reviews , since they do not display critical analysis of the literature. They must be composed of: title page, resumo e palavras-chave (in Portuguese), abstract and keywords, text, references, tables (if available) ,figure legends (if available) and figures (if available).

Case reports. Articles representing descriptive data of one or more cases, exploiting a method or problem through example(s). The selected cases should be of great interest, with unusual disease or evolution or submitted to unexpected or alternative treatments. They may involve humans or animals and should present the studied individual's characteristics (gender, age, etc.). They must be composed of: title page, resumo e palavras-chave (in Portuguese), abstract and keywords, text (divided in: Introduction, Case Description and Discussion or equivalent), references, figure legends (if available) and figures (if available).

Letters to the reader. Letters to the editor commenting, discussing or criticizing articles published in JBRA Assisted Reproduction will be welcome and published as long as they are accepted by the Editorial Board. They must be composed of: title, name of author, identification of the publication being commented on and references (if available). It is recommended to include 500 words at the most, references inclusive. Whenever possible, a reply by the authors will be published alongside with the letter.

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

Preferably use Microsoft Word® processor. Papers should be typed in Times New Roman font sized 12, single-spaced and aligned to the left. Every section should be started on a new page in the following order: title page, resumo e palavras-chave (in Portuguese), abstract and keywords, text, acknowledgements, references, tables, figure legends and figures. All of the pages should be numbered consecutively. Abbreviations should be spelled out in the first mention in the text; and after the first appearance, only the abbreviation should be used. In the abstract, the use of abbreviations should be avoided.

Chemicals should be presented by their generic name. If relevant, commercial name of the substance and the manufacturer's name may be informed in parentheses.

The presentation of units of measurements should follow the International System (IS).

Genes of animals should be presented in italics with capital letter initials (example: Sox2); genes of human beings should also be presented in italics; however, with all capital letters (example: SOX2). Proteins should follow the same pattern: capital/small, without italics, though.

TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

- Concise and comprehensive title, representing the content of the article, both in Portuguese and English
- Short running head (no more than 40 characters including letters and spaces)
- Authors' names
- Authors' institutional affiliation, showing department/unit, institution and geographic region
- Name of the institution where the work was carried
- Information about support given in the form of loan, equipment or drugs
- Congresses where the study was presented
- Name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author

RESUMO AND ABSTRACT

All articles should present an abstract both in Portuguese and in English. Papers written in Spanish should present, besides their abstracts in the original language, one abstract in Portuguese and another one in English. The content of both texts should be identical, and should not exceed 250 words. For original articles, the abstract should be structured as follows: Objective, Methods, Results and Conclusion. For case reports, reviews and update articles, the abstract should not be structured. The use of abbreviations should be avoided in the abstract, and references should not be cited.

Right after the resumo/abstract/resumen, three to six keywords belonging to the list of Health Sciences Descriptors (<http://decs.bvs.br>) should be presented.

ACKNOWLEDGEMENTS

This part is dedicated to acknowledging the work of those who have helped intellectually, but whose contribution does not justify co-authorship or those people or institutions who have given material support.

REFERENCES

In the text, the citations will be identified by the author's last name in parentheses followed by the publication year. Examples: one author (Steptoe, 1978), two authors (Edwards & Steptoe, 1980), and more than two authors (Van Steirteghem et al., 1988).

The references should be presented in alphabetical order (each author's surname followed by his/her first two initials), and should not be numbered. Papers by the same author should be chronologically organized; papers by the same author in the same year should be identified with letters after each year (2000a, 2000b, etc.). The presentation of references will follow the format proposed in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see examples below). All references cited in the list should be mentioned in the text and vice-versa.

1. Journal Article

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:737-56.

2. Book

Wolf DP, Quigley MM, eds. *Human in vitro fertilization and embryo transfer.* New York: Plenum Press; 1984.

3. Book Chapter

Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH,

eds. *Genetic mechanisms of sexual development.* New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.

4. Electronic Journal Article

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [electronic journal].* 2002 June [cited 2002 aug 12];102(6):[approximately 3 p.]. Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

5. Article published in the Internet:

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res.* 2004;6(4):e40. Available at: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Accessed: 29/11/2004.

6. Site

OncoLink [site in the Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [updated 2004 Sept 24; cited 2006 March 14]. Available at: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

7. Software

Smallwaters Corporation. Analysis of moment structures: AMOS [software]. Version 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

TABLES AND FIGURES

Tables and figures (graphs, photographs, etc.) should be numbered in Arabic numerals according to the order in which they appear in the text and should have individual legends, presented at the end of the paper. Each table and figure should be submitted on a separate sheet of paper.

In the tables, use horizontal lines only, and each piece of information should be in an independent cell. Explanations about items in the tables should be presented in footnotes identified by the following symbols, in this sequence: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Figures in general (graphs, photographs, etc.) will be published in black and white. Expenses due to the eventual reproduction of photographs in color will be the author's responsibility.

Figures may be submitted in electronic formats such as .jpg, .gif or .tif, with a minimum resolution of 300 dpi (in order to guarantee clear printing), or by mail (see further mailing instructions). All figures sent by mail should be identified on the back with an adherent sticker containing author's first name, number of the figure and an arrow indicating which side is up. Scanned photographs will not be accepted; photographs in paper must be sent by mail. Photographs of patients should not allow their identification.

Graphs should be two-dimensional only.

Figures previously published and included in submitted articles should include the original source in the legend and should be accompanied by a permission letter from the copyright's holder (publisher or journal).

MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

Articles should be submitted preferably by e-mail (journalsbra@cmb.com.br). Text and figures should be sent as attachments together with the message. Figures (graphs and digital photographs exclusively) may be sent in the formats .jpg, .gif ou .tif, with minimum resolution of 300 dpi and total maximum size of 3 MB (all figures).

If submission by e-mail is not possible, two copies of the text must be sent to the address below:

Profa. Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
 Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida
 Centro Médico Barra Shopping
 Av. das Américas, 4666, salas 312/313
 CEP 22649-900 – Rio de Janeiro, RJ
 Fone: (55)(21) 2430.9060
 Fax: (55)(21) 2430.9070
<http://www.sbra.com.br>

INFORMACIONES GENERALES

1. El JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) es una publicación oficial de la Sociedad Brasileña de Reproducción Asistida (SBRA – www.sbra.com.br) y de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (www.redlara.com) para contenidos científicos, con periodicidad bimestral. Es dirigido a especialistas e investigadores en salud, particularmente ginecólogos, andrólogos, biólogos, urólogos y embriólogos. Se recibe para evaluación estudios básicos y clínicos en los siguientes áreas: reproducción asistida, infertilidad, genética reproductiva, inmunología reproductiva, andrología, microbiología reproductiva, laboratorio en reproducción asistida y endocrinología ginecológica, bajo la forma de artículos originales, de revisión, de actualización y relatos de caso (conforme detallamos a continuación). Se reciben artículos en portugués, español o inglés. Autores interesados en traducir sus artículos al inglés pueden solicitar un presupuesto de traducción al J Bras Rep Assist.

2. Artículos sometidos al JBRA Assisted Reproduction deben ser inéditos, o sea, no deben haber sido publicados ni sometidos para análisis por otras revistas, en su totalidad o parcialmente. En casos de imágenes ya publicadas, se debe obtener autorización y nombrar la fuente. Una vez que su artículo(s) haya(n) sido publicado(s), pasa(n) a ser propiedad de la SBRA.

3. Las Instrucciones para Autores del JBRA Assisted Reproduction incorporan las recomendaciones de los *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. La versión completa del texto está disponible en www.icmje.org. Manuscritos que no estén conforme las instrucciones aquí presentadas serán devueltos para la incorporación de ajustes antes de la evaluación por el Consejo Editorial.

4. Todo artículo publicado en el JBRA Assisted Reproduction pasa por un proceso de revisión por especialistas (*peer review*). Los artículos sometidos son primeramente enviados a los editores para una evaluación inicial respecto al objetivo del trabajo y a las exigencias editoriales del JBRA. Si la evaluación es positiva, el artículo es enviado a dos revisores especialistas del área pertinente. Todo el proceso es anónimo, o sea, los revisores desconocen la identidad de los autores y su local de origen y viceversa. Después de la evaluación del artículo por los revisores, se puede: a-aceptar el artículo sin modificaciones, b-rechazar el artículo, c-devolverlo a los autores con sugerencias de modificaciones; en el último caso, un artículo puede regresar varias veces a sus autores para aclaraciones y modificaciones, sin que eso implique necesariamente la aceptación futura del trabajo.

5. Se limita a seis el número de autores de cada manuscrito. El concepto de coautoría implica contribución substancial en la concepción y planeamiento del trabajo, análisis e interpretación de los datos y redacción o revisión crítica del texto. Contribuciones significativas hechas al estudio, pero que no se cuadran en esos criterios, pueden ser descritas en la sección de agradecimientos.

6. Artículos de investigaciones clínicas (*clinical trials*) deben ser registrados en uno de los Registros de Ensayos Clínicos validados por los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud y por el International Committee of Medical Journal Editors (por ejemplo, www.actr.org.au, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm y www.trialregister.nl). El número de identificación del estudio deberá ser presentado al final del resumen.

7. Caso se acepte su trabajo para publicación, débese enviar al JBRA una declaración firmada por todos los autores, con la siguiente información: a) el manuscrito es original; b) el manuscrito no fue publicado ni sometido a otra revista, ni será, en el caso de su publicación por el JBRA Assisted Reproduction; c) todos los autores participaron activamente en la elaboración del estudio y aprobaron la versión final del texto; d) situaciones de potencial conflicto de interés (financiero o de otra naturaleza) serán informadas; e) se

obtuvo aprobación del estudio por el comité de ética de la institución a la cual el trabajo está vinculado (para artículos que relatan datos de pesquisa experimental); f) se obtuvo consentimiento informado de los pacientes incluidos en el estudio (cuando se aplica). Se debe informar en la sección Métodos del artículo los datos sobre la aprobación del estudio por el comité de ética y la obtención de consentimiento informado.

8. Antes de la publicación de los artículos aprobados, los autores correspondientes recibirán, por e-mail, en documento PDF, el artículo listo para publicación, para aprobación. En esta etapa, las correcciones deben limitarse a errores tipográficos, sin cambios de contenido del estudio. Los autores deberán devolver las pruebas aprobadas por e-mail o fax antes de 48 horas después de haberlo recibido.

TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

Artículos originales. Trabajos resultantes de pesquisa científica que presentan datos originales sobre aspectos experimentales u observacionales de carácter médico, biológico, bioquímico y psicosocial e incluyen análisis estadística descriptiva y/o inferencias de datos propios. Estos artículos tienen prioridad para publicación. Deben contener: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto (dividido en las secciones Introducción, Métodos, Resultados, Discusión o equivalentes, Conclusiones), agradecimientos (si se aplica), listado de referencias (máximo de 40), tablas (si hay), notas al pie de imágenes (si hay) e imágenes (si hay).

Artículos de revisión. Trabajos que tienen por objetivo resumir, analizar, evaluar o sintetizar trabajos de investigación ya publicados en revistas científicas. Deben incluir síntesis y análisis crítica de la literatura levantada y no ser confundidos con artículos de actualización. Deben contener: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto, listado de referencias, tablas (si hay), notas al pie de imágenes (si hay) e imágenes (si hay).

Artículos de actualización u opinión. Trabajos que reportan informaciones generalmente actuales sobre tema de interés para determinadas especialidades (por ejemplo, una nueva técnica o método). Tienen características diferentes de un artículo de revisión, pues no presenta análisis crítica de la literatura. Deben contener: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto, listado de referencias, tablas (si hay), notas al pie de imágenes (si hay) e imágenes (si hay).

Relatos de caso. Artículos que representan datos descriptivos de uno o más casos, explorando un método o problema a través de ejemplo(s). Los casos elegidos deben ser de gran interés, con enfermedad o evolución anormal o sometidos a tratamientos inusitados o alternativos. Pueden involucrar humanos o animales y deben presentar las características del individuo en estudio (sexo, edad, etc.). Deben contener: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto (dividido en las sesiones Introducción, Descripción del caso y Discusión o equivalentes), listado de referencias, notas al pie de imágenes (si hay) e imágenes (si hay).

Cartas al lector. Con gusto recibiremos cartas al editor comentando, discutiendo o criticando los artículos publicados en el JBRA Assisted Reproduction; estas serán publicadas desde que el Consejo Editorial las apruebe. Deben contener: título, nombre del autor, identificación de la publicación que se comenta y listado de referencias (si hay). Recomendase un máximo de 500 palabras, incluyendo referencias. Siempre que posible, se publicará una respuesta de los autores junto a la carta.

PREPARO DE LOS ORIGINALES

Utilice preferentemente Microsoft Word®. Los trabajos deben ser teclados en Times New Roman tamaño 12, espacio sencillo, alineados a la izquierda, iniciando cada sección en página nueva, en el siguiente orden: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto, agradecimientos, listado de referencias, tablas, notas al pie de imágenes e imágenes. Todas las páginas deben de ser numeradas. Siglas deben ser definidas por extenso en la primera ocurrencia en el texto; después de la primera ocurrencia, solamente la sigla deberá ser utilizada. En el resumen, el uso de siglas debe ser evitado.

Substancias deben ser presentadas utilizando su nombre genérico. Si es relevante, el nombre comercial de la substancia y el fabricante pueden ser informados entre paréntesis.

La presentación de unidades de medida debe seguir el sistema internacional (SI).

Genes de animales deben ser presentados en itálico con inicial mayúscula (ejemplo: *Sox2*); genes de seres humanos también deben ser presentados en itálico, pero con todas las letras mayúsculas (ejemplo: *SOX2*). Proteínas deben seguir el mismo patrón de mayúsculas / minúsculas, pero sin itálico.

HOJA FRONTAL

La hoja frontal debe contener:

- Título conciso y explicativo, representando el contenido del trabajo, en portugués e inglés. (no seria: portugués, inglés y español ¿)
- Título resumido (máximo de 40 caracteres).
- Nombres de los autores.
- Afiliación de los autores, indicando departamento/unidad, institución y región geográfica.
- Nombre de la institución donde el trabajo fue ejecutado.
- Informaciones sobre ayudas recibidas bajo la forma de financiamiento, equipamientos o medicamentos.
- Congresos donde el estudio fue presentado.
- Nombre, dirección, teléfono, fax y e-mail del autor correspondiente.

RESUMEN Y ABSTRACT

Todos los trabajos deben presentar un resumen en portugués y un *abstract* en inglés. Trabajos escritos en español deben presentar, además del resumen en su idioma original, también un resumen en portugués y un *abstract* en inglés. El contenido de los textos debe ser idéntico, y no debe sobrepasar 250 palabras. Para artículos originales, el resumen debe ser estructurado como detallamos a continuación: Objetivo, Métodos, Resultados y Conclusiones. Para relatos de caso, artículos de revisión y artículos de actualización, el resumen no debe ser estructurado. Débese evitar el uso de abreviaciones en el resumen, y no deben ser mencionadas referencias.

Luego después del *resumo/abstract/resumen*, deberán ser presentadas de tres a seis palabras-llave que sean integrantes de la lista de Descriptores en Ciencias de la Salud (<http://decs.bvs.br>).

AGRADECIMIENTOS

Esta sección es dedicada a reconocer el trabajo de personas que hayan colaborado intelectualmente, pero cuya contribución no justifica coautoría, o personas o instituciones que hayan dado apoyo material.

REFERENCIAS

En el texto, las citas serán identificadas entre paréntesis, por el apellido del autor seguido del año de publicación. Ejemplos: un autor (Stephoe, 1978), dos autores (Edwards & Steptoe, 1980), más de dos autores (Van Steirteghem et al., 1988).

El listado de referencias debe ser presentado en orden alfabético (último apellido de cada autor seguido de las dos primeras iniciales), y no debe ser numerada. Trabajos del mismo autor deben ser ordenados cronológicamente; trabajos del mismo autor y año deben ser identificados con letras después el año (2000a, 2000b, etc.). La presentación de las referencias seguirá los modelos propuestos en los *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (ver ejemplos a continuación). Todas las referencias citadas en la lista deben ser mencionadas en el texto y viceversa.

1. Artículo de periódico

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynaecol.* 1980;87:737-56.

2. Libro

Wolf DP, Quigley MM, eds. *Human in vitro fertilization and embryo transfer.* New York: Plenum Press; 1984.

3. Capítulo de libro

Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH, eds. *Genetic mechanisms of sexual development.* New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.

4. Artículo de revista electrónica

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [revista electrónica].* 2002 Jun [citado 2002 ago 12];102(6):[aproximadamente 3 p.]. Disponible en: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

5. Artículo publicado en Internet:

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res.* 2004;6(4):e40. Disponible en: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Acceso en: 29/11/2004.

6. Sitio web

OncoLink [sitio web en Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [actualizado 2004 set 24; citado 2006 mar 14]. Disponible en: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

7. Software

Smallwaters Corporation. *Analysis of moment structures: AMOS [software].* Versión 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

Tablas y figuras

Tablas y figuras (gráficos, fotografías, etc.) deben ser numeradas en arábigo conforme el orden que aparezca en el texto y deben tener explicaciones individuales, presentadas al final del trabajo. Cada tabla y figura debe ser sometida en hoja separada.

En las tablas, deben ser utilizadas solamente líneas horizontales, y cada dato deberá de tener una celda independiente. Explicaciones sobre ítems de las tablas deben ser presentadas en notas de rodapé identificadas por los siguientes símbolos, en esa secuencia: *, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡.

Figuras en general (gráficos, fotografías, etc.) serán publicadas en negro y blanco. Gastos con eventual reproducción de fotografías en color serán de responsabilidad del autor.

Figuras pueden ser sometidas electrónicamente, en las extensiones .jpg, .gif ou .tif, con resolución mínima de 300 dpi (para hacer posible una impresión nítida), o por correo (ver instrucciones de envío más adelante). Todas las figuras enviadas por correo deben ser identificadas en el anverso con el uso de etiqueta que contenga el nombre del primero autor, el número de la figura y una flecha que indique el lado para arriba.

No se aceptan fotografías escaneadas; fotografías en papel deben ser enviadas por correo. Fotografías de pacientes no deben permitir su identificación.

Gráficos deben ser presentados solamente en dos dimensiones. Figuras ya publicadas e incluidas en artículos sometidos deben indicar la fuente original en la explicación y deben venir con una carta de permiso del dueño de los derechos (editora o revista).

ENVÍO DE ARTÍCULOS

Los artículos deben ser sometidos preferentemente por e-mail (jornalsbra@cmb.com.br). Texto y figuras deben ser enviadas como un adjunto al mensaje. Figuras (exclusivamente gráficos y fotografías digitales) pueden ser enviadas en las extensiones .jpg, .gif ou .tif, con resolución mínima de 300 dpi y tamaño máximo total (del conjunto de figuras) de 3 MB. Si el envío por e-mail no es posible, dos copias del texto y figuras deben ser enviadas para la siguiente dirección:

Profa. Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
 Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida
 Centro Médico BarraShopping
 Av. das Américas, 4666, salas 312/313
 CEP 22649-900 • Rio de Janeiro, RJ
 Fone: (21) 2430.9060
 Fax: (21) 2430.9070
<http://www.sbra.com.br>

Editorial
Decisões importantes: Câncer e Planejamento familiar

Claudia Waymberg Goldman 227

Artigo Original**Frequência de fertilizações anormais e de embriões precoces em ciclos de IVF.**

Adriana Bos-Mikich, Mônica Martins da Silva, Gerta N. Frantz, Norma P. Oliveira, Nilo Frantz 228

First polar body genetic diagnosis (PbGD) as a selection tool of euploid oocytes before insemination

Cecilia Fabres, Emilio Fernández, Fernando Zegers-Hochschild, Antonio Mackenna, Javier A. Crosby 231

Incidência de malformações em fetos nas técnicas de reprodução assistida

Tatiane Kelen dos Santos Silva, Luis Candido Pinto da Silva, Paulo Franco Taitson 235

FIV convencional vs ICSI en pacientes con semen normal o con teratozoospermia leve: Estudio utilizando oocitos de la misma cohorte.

Claudio Ruhlmann, Carolina MM Baldi, Marcela Irigoyen, Rocío S Iaizzo, Lautaro Tessari, A. Gustavo Martínez 239

Artigo de Opinião**La encrucijada de la Fertilización In-Vitro en Costa Rica**

Carlos José Valerio Monge 243

Relato de Caso**Gestação clínica após transferência de embriões desvitrificados obtidos em ciclo de IVF.**

Marcos Höher, Adriana Bos-Mikich, Gerta N. Frantz, Norma P. Oliveira, Nilo Frantz 245

Live birth of a healthy baby from slow-freezing cryopreserved pronuclear stage embryos warmed using a standard devitrification protocol: Case report

Renata F. Erberelli, Renato M. Salgado, Francisco J. Lopes, Carlos G. Almodin, Paula M. Almodin, and Philip Wolff 247

Eventos

..... 250

Decisões importantes: Câncer e Planejamento familiar

Important decisions: Cancer and family planning

Ao longo da vida, todos tomamos decisões importantes. Em momentos de equilíbrio emocional essas decisões tendem a ser tomadas de maneira mais consciente e adequada. Uma dessas decisões refere-se ao planejamento familiar, a escolha entre ter ou não filhos, quando, quantos.

O adoecimento desestrutura o indivíduo e a família, e quando se trata de um câncer, a situação se agrava, pois apesar dos avanços da medicina, com chances de cura e aumento da sobrevivência, o câncer ainda está associado à ideia de morte e todo o processo de tratamento envolve intenso sofrimento físico e psíquico.

Uma série de decisões importantes precisam ser tomadas quando se descobre com câncer, como a escolha do médico, tipo de cirurgia, escolha de tratamento, clínica de preferência, entre outras. Essas decisões são permeadas por angústia e sofrimento. Nesse contexto, o planejamento familiar e outros projetos pessoais acabam ficando em segundo plano, dando lugar a um projeto maior, que é a luta pela própria vida.

Dentre os efeitos adversos do tratamento oncológico, a infertilidade é altamente prevalente, influenciada por fatores diversos, como a própria doença, tipo de medicação utilizada, local e dose de radiação, sexo e idade do paciente.

Estudos revelam que a preservação da fertilidade é considerada muito importante pelos pacientes em tratamento oncológico e a infertilidade decorrente do tratamento está associada a altos níveis de estresse. A preservação de gametas antes do tratamento é considerada por esses pacientes como um fator positivo para o enfrentamento do mesmo.

Apesar de já haver Guidelines estabelecidos pela ASCO e ASRM que determinam a obrigatoriedade da abordagem da infertilidade como possível efeito adverso do tratamento, bem como a necessidade de serem discutidas opções de preservação da fertilidade antes do início do tratamento, estudos apontam que 50% dos pacientes não recebem informações sobre o assunto. Devemos lembrar que é vedado ao médico, conforme o código de ética médica em seu artigo 34, deixar de informar ao paciente o diagnóstico, o prognóstico, os riscos e os objetivos do tratamento, salvo quando a comunicação direta possa lhe provocar dano, devendo, nesse caso, fazer a comunicação a seu representante legal".

Para que o paciente com câncer possa tomar decisões referentes ao planejamento familiar, nesse momento de desestruturação emocional e com pouco tempo para tomada de decisão, torna-se fundamental o estabelecimento de uma parceria médico-paciente em que o primeiro seja um facilitador e que através da escuta e do conhecimento do desejo do outro possa disponibilizar informações e esclarecer dúvidas que contribuam para a tomada de decisão.

Claudia Waymberg Goldman

Psicóloga do Instituto de Ginecologia da UFRJ e do CENTRON, Centro de Tratamento Oncológico –RJ, Brasil

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. , American Society of clinical oncology recommendations of fertility preservation in cancer patients, J Clin Oncol, 2006; 24:2917-31.

Ethics Committee of the American Society of Reproductive Medicine, Fertility preservation and reproduction in cancer patients, Fertil Steril, 2005; 83:1622-8.

Frequência de fertilizações anormais e de embriões precoces em ciclos de IVM.

Adriana Bos-Mikich¹, Mônica Martins da Silva², Gerta N. Frantz², Norma P. Oliveira², Nilo Frantz²

¹ Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

² Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz – Porto Alegre (RS), Brasil.

RESUMO

Objetivos: A maturação *in vitro* de oócitos humanos é uma tecnologia ascendente no tratamento da infertilidade conjugal, especialmente para pacientes portadoras de ovários policísticos ou tipo-policísticos. Assim, o conhecimento de características do desenvolvimento embrionário pós-IVM é de fundamental importância para o aprimoramento da metodologia e dos resultados alcançados. Nosso objetivo foi analisar a frequência de zigotos aneuploides e embriões precoces oriundos de oócitos maturados *in vitro*.

Métodos: Análise retrospectiva de 52 ciclos de IVM.

Resultados: Observamos que a frequência de zigotos aneuploides (1Pn ou 3Pn) de 20% é mais elevada pós-IVM, do que aquela relatada em ciclos estimulados. Por outro lado, a detecção de embriões precoces acarreta em uma taxa superior de gestações químicas e implantações nas pacientes que recebem pelo menos um embrião precoce no grupo de transferência.

Conclusões: Nossos dados mostram haver um índice aumentado de fertilizações anormais em ciclos de IVM, provavelmente resultado de uma maturação citoplasmática inadequada ou incompleta *ex-vivo*. Entretanto, como em ciclos estimulados, observa-se a ocorrência de embriões precoces e a sua transferência aumenta significativamente as taxas de implantação enfatizando a importância da sua detecção e seleção para transferência.

Palavras-chave: IVM, aneuploidias, embriões precoces

ABSTRACT

Objectives: Human oocyte *in vitro* maturation is a state of the art technology for infertility treatment, particularly for patients with polycystic ovary syndrome or polycystic-like ovaries. Thus, the knowledge of embryonic developmental parameters post-IVM is paramount for the improvement of the technology and its outcomes. Our aim was to analyze the frequency of aneuploid zygotes and early cleavage embryos generated from *in vitro* matured oocytes.

Methods: Retrospective data analysis of 52 IVM cycles.

Results: We observed that the frequency of aneuploid zygotes (1Pn or 3 Pn) of 20% is higher than that reported for stimulated cycles. On the other hand, detection of early cleavage embryos leads to higher chemical pregnancy and implantation rates in patients that received at least one early-cleavage embryo in the transfer cohort.

Conclusions: Our data show that there is an increased rate of abnormal fertilization in IVM cycles, possibly due to an inadequate or incomplete cytoplasmic maturation *ex-vivo*. However, as in stimulated cycles, we observed the occurrence of early cleavage embryos and their transfer significantly increases implantation rates emphasizing the importance of detection and selection of these embryos for transfer.

Keywords: IVM, aneuploidies, early cleavage embryos.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de coletar oócitos imaturos de uma paciente que não recebeu gonadotrofinas exógenas para estimulação ovariana fez da maturação *in vitro* de oócitos (IVM) uma alternativa de tratamento de fertilidade reconhecida e aplicada em clínicas de reprodução assistida (RA) em todo o mundo. Esta tecnologia, inicialmente voltada para pacientes com risco de desenvolverem a hiperestimulação ovariana (OHS) está ganhando novas indicações como, por exemplo, para mulheres más respondedoras à estimulação hormonal e em casos especiais, como uma opção de tratamento para a preservação da fertilidade de pacientes jovens e adultas em idade reprodutiva acometidas por alguma forma de câncer.

Como em qualquer nova tecnologia em RA, inicialmente as taxas de sucesso pós-IVM eram bastante modestas e variáveis de centro para centro. Trabalhos mais recentes demonstram que a frequências de gestações clínicas e nascimentos são semelhantes e se equiparam com as obtidas em tratamentos clássicos para pacientes portadoras de ovários tipo-policísticos (PCO) ou síndrome dos ovários policísticos (SOP) o grupo de mulheres mais propenso a desenvolver a hiperestimulação ovariana (OHS). Entretanto, pouca informação é reportada sobre as taxas de fertilizações anômalas e sobre a qualidade e a dinâmica do desenvolvimento embrionário. Estas informações são particularmente importantes para uma melhor seleção embrionária, especialmente tendo em vista uma possível frequência aumentada de abortos clínicos em ciclos de IVM em comparação aos ciclos clássicos de FIV ou ICSI (Bucket et al., 2008).

A ocorrência de cerca 1 a 8.1% de zigotos 3Pn e 2,7% a 9% de zigotos 1Pn é uma taxa de anomalias da fertilização aceitável pós-FIV e ICSI, em ciclos convencionais com estimulação ovariana (Kola et al., 1987; Plachot & Crozet, 1992; Balakier et al., 1993; Macas et al., 1996; Porter et al., 2003). Por outro lado, a característica de precocidade embrionária (P) é um importante fator para seleção de embriões com maior potencial de gestação e nascimento. A transferência de embriões P reflete diretamente nas taxas de implantação e gestações a termo (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Bos-Mikich et al., 2001). O objetivo deste estudo foi analisar a frequência de fertilizações anômalas, de embriões precoces e sua qualidade morfológica no dia da transferência.

MATERIAL & MÉTODOS

Estudo retrospectivo de 52 ciclos de IVM, onde foram investigadas as frequências de zigotos 3Pn e 1PN após ICSI (49 ciclos) e IMSI (3 ciclos). Analisamos sempre que registrado, devido ao horário das observações, a incidência de embriões P e a sua relação com as taxas de gravidez pós-transferência (TE). Em seis ciclos não houve TE: um

por falha da fertilização, em dois casos os embriões tiveram de ser vitrificados por endométrio inadequado para transferência no dia três e em três casos por motivos pessoais. Por fim, foi analisada a qualidade embrionária no dia da transferência (D-3) segundo critérios clássicos de Veeck (1999).

RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi de 28,9 anos. Do total de 52 ciclos de IVM analisados, 48 envolveram pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos e um caso de ovários policísticos-like (PCO). Três ciclos representaram tratamento por fator masculino que também tinham um componente de ovários policísticos.

Nossos dados revelam que a frequência total de fertilizações normais (2Pn) foi de 61.5%. Trinta e oito (73%) ciclos apresentaram fertilizações anômalas. As frequências de embriões 3Pn e 1Pn foram de 12% e 8%, respectivamente, dentre os 463 zigotos analisados. Obtivemos sete gestações químicas que não evoluíram para gestação clínicas, todas de pacientes SOP. As gestações clínicas perfizeram um total de 13 pacientes com SOP e uma de PCO. Houve um único caso de gestação clínica que terminou em aborto, de uma paciente portadora de SOP. Em média foram transferidos 3,2 embriões por paciente

Quanto à transferência de embriões P, 14 pacientes receberam 45 embriões, dentre os quais pelo menos um era embrião P no grupo de transferência. Destas mulheres, oito tiveram gestações químicas (57%) e quatro delas mantiveram gestações clínicas (29%) sendo que uma terminou em aborto. A taxa de implantação foi de 28%. Nos demais ciclos (n=38), nos quais foram transferidos 120 embriões sem serem classificados como P, obtivemos 16 (42%) gestações, das quais seis foram químicas e 10 (26%) evoluíram para gestações clínicas, com uma taxa de implantação de 8%.

Referente à morfologia embrionária, nos ciclos em que houve pelo menos um embrião P, os embriões foram classificados como 9,5%G1, 33%G2, 52.5%G3 e 5%G4. Em contra partida, nos demais ciclos os embriões foram classificados como 8% G1, 16%G2, 60%G3 e 16%G4-5. Considerando-se que classicamente, os melhores embriões selecionados para transferência são aqueles classificados como G1 ou G2, observamos que nos ciclos com embriões P houve uma taxa significativamente superior de embriões de melhor qualidade morfológica (42,5%; $P > 0.001$), do que no grupo de pacientes que não apresentou qualquer embrião P (24%).

DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem haver uma frequência aumentada de fertilizações anômalas nos ciclos de IVM, em comparação aos dados reportados na literatura obtidos a partir de ciclos estimulados, clássicos (Kola et al., 1987; Plachot & Crozet, 1992; Balakier et al., 1993; Macas et al., 1996; Spandorfer et al., 1998). A frequência de zigotos anormais detectada neste estudo (20%) corrobora nossas observações anteriores, em que foi detectada uma média de 1,7 embriões anormais por ciclo e uma frequência total de anomalias da fertilização de 21% (Bos-Mikich et al., 2011). Por outro lado, a taxa de fertilizações normais de 61.5% de embriões 2Pn, também reforça nossos resultados anteriores (Frantz et al., 2010) estando abaixo dos dados de fertilização apresentados por outros estudos (Child et al., 2001; Son et al., 2005; Ge et al., 2008; Son et al., 2008; Zhao et al., 2009). Entretanto, este dado representa um novo e importante referencial, quanto aos parâmetros do desenvolvimen-

to embrionário em ciclos de IVM, visto que os demais trabalhos não estratificaram nas taxas de fertilização, os zigotos 2Pn, daqueles com ploídia alterada. A frequência aumentada de zigotos aneuploides em ciclos de IVM pode ser explicada pela condição de maturação *ex-vivo* do gameta feminino. Já está bem estabelecida, em estudos com roedores, a ligação entre a imaturidade citoplasmática oocitária, potencialmente devido às condições de maturação *in vitro* e a incapacidade de descondensação da cabeça do espermatozóide, liberação dos corpúsculos corticais e expulsão do segundo corpúsculo polar (Plachot & Crozet, 1992; Lachan-Kaplan & Trouson, 2008). Interessante notar que, um estudo recente utilizando a técnica de FISH para oito cromossomos (13,15, 16, 18 21, 22, X e Y) visando detectar a incidência de anomalias cromossômicas em embriões em estádios de clivagem gerados a partir de oócitos provenientes de ciclos de IVM ou FIV/ICSI clássicos demonstrou uma frequência semelhante de anomalias em ambos os grupos de embriões (58,7% e 57,4%, respectivamente) (Zhang et al., 2010). Podemos supor que os embriões de IVM, após a fertilização se comportam de forma semelhante aos obtidos em ciclos estimulados durante as clivagens iniciais, sugestão esta que seria corroborada pelas nossas observações da ocorrência de embriões precoces discutida a seguir.

Confirmando nossos resultados anteriores (Frantz et al., 2010), a frequência de fertilizações pós-IVM manteve-se a mesma e o índice de gestações clínicas ficou bastante semelhante aos dados anteriores (32%). A taxa total de implantações foi significativamente superior no atual trabalho, no grupo de pacientes que transferiu pelo menos um embrião P e bastante inferior ao estudo anterior, no grupo de pacientes que não teve pelo menos um embrião P detectado e selecionado para transferência.

A detecção de embriões P gerados em ciclos de IVM é um dado inédito na literatura envolvendo esta tecnologia, visto que nenhum outro trabalho dedicou atenção à possibilidade da ocorrência destes embriões em ciclos não estimulados. A importância de sua observação e seleção para transferência é inquestionável, pelo marcante aumento nas taxas de gestação e implantação que estes embriões proporcionam em ciclos estimulados (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Bos-Mikich et al., 2001). Os dados do presente estudo revelam que as gestações químicas foram superiores no grupo que recebeu pelo menos um embrião P, em relação aos que não tiveram qualquer embrião P transferido. As taxas de gestações clínicas foram semelhantes nos dois grupos, mas a taxa de implantação foi quase três vezes maior, no primeiro grupo de pacientes. Este resultado corrobora os dados da literatura sobre a importância da seleção e transferência de embriões que clivam entre 25 e 27 hrs pós-inseminação, em ciclos estimulados de FIV/ICSI. Assim, nossos resultados demonstram que, também nos ciclos de IVM, a detecção de embriões com clivagem precoce, cerca de 27 horas pós-inseminação e sua seleção para transferência é um fator de grande relevância para o sucesso do tratamento em termos de gestações e implantações. Infelizmente, no presente estudo não foi possível analisar o efeito da idade materna na ocorrência de embriões P, como foi demonstrado anteriormente (Bos-Mikich et al., 2001), pois que houveram muitos ciclos em que não foi feita a observação da clivagem precoce. Entretanto, a média de idade de todas as pacientes em programas de IVM é em geral baixa, neste estudo 28,9 anos, o que explicaria a ocorrência de embriões P com uma certa frequência, a qual só não é maior provavelmente pelo fato destes embriões serem produto de oócitos com graus variados de maturação

citoplasmática *ex-vivo*, o que pode acarretar em alterações no citoplasma e de desenvolvimento embrionário pós-fertilização conforme citado anteriormente.

Considerando-se a qualidade embrionária em termos morfológicos, no Dia-3 do desenvolvimento pós-IVM, o total de embriões G1 e G2 manteve uma frequência significativamente inferior do que dos grupos G3, G4-5. Novamente, consideramos que esta baixa classificação dos embriões de IVM deve-se mais ao fato de eles apresentarem atraso no desenvolvimento em relação ao esperado para embriões de dia-3 (Frantz et al., 2010; Bos-Mikich et al., 2011) e não devido a uma má qualidade intrínseca do embrião, visto que as taxas de gestação e implantação são bastante aceitáveis, quando comparadas àquelas de ciclos estimulados clássicos. Cabe ressaltar, entretanto, que nos ciclos em que foram detectados embriões P, a classificação dos embriões G1 e G2 foi significativamente superior do que naqueles ciclos sem embriões P sugerindo haver uma forte correlação entre estes dois parâmetros de desenvolvimento embrionário.

Em conclusão, acreditamos que a frequência de cerca de 20% de zigotos aneuploides em ciclos de IVM é um dado relevante sobre o comportamento dos oócitos maturados *in vitro* frente à fertilização. Este dado tem grande importância dentro da metodologia de IVM, visto que, a observação criteriosa e precisa dos produtos da fertilização de oócitos pós-IVM determinará o sucesso de cada ciclo empregando a tecnologia. A mesma observação se aplica à detecção dos embriões de clivagem precoce, os quais quando detectados devem ser preferencialmente acrescidos ao grupo de transferência, de maneira a aumentar significativamente as chances de gestação e implantação embrionária.

Correspondência:

Adriana Bos-Mikich

Departamento de Ciências Morfológicas - Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Sarmiento Leite 500 -Porto Alegre, RS - CEP: 90.050-170

adriana.bosmikich@gmail.com

REFERÊNCIAS

Balakier H, Squire J, Casper RF: Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1993;8:402-408

Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2658-2661

Bos-Mikich A, Ferreira M, Höher M, Frantz G, Oliveira N, Dutra CG, Frantz N. Fertilization outcome, embryo development and birth after unstimulated IVM. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:107-110.

Buckett WM, Chian R-C, Dean NL, Sylvestre C, Holzer HEG, Tan SL. Pregnancy loss in pregnancies conceived after in vitro oocyte maturation, conventional in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008; 90:546-550.

Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertile Steril* 2001;76: 936-942.

Ge H-S, Huang X-F, Zhang W, Zhao J-Z, Lin J-J, Zhou W. Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008; 89: 98-103.

Frantz N., Bos-Mikich A, Frantz G, Höher M, Oliveira N, Ferreira M. Maturação *in vitro* de oócitos em ciclos não estimulados para pacientes portadoras de ovários policísticos ou síndrome dos ovários policísticos. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*. 2010; 14: 24-6.

Kola I, Trounson A, Dawson G, Roger P: Tripronucleate human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol Reprod* 1987;37:395-401

Lacham-Kaplan O & Trounson A. Reduced developmental competence of immature, in-vitro matured and postovulatory aged mouse oocytes following IVF and ICSI. *Reprod Biol End* 2008, 6:58-71.

Macas E, Imthurn B, Roselli M, Keller PJ: Chromosome analysis of single- and multipronucleated human zygotes produced after the intracytoplasmic sperm injection procedure. *J Assist Reprod Genet* 1996;13: 345-350.

Plachot M, Crozet N: Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992;7(suppl 1):89-94

Porter R, Han T, Tucker MJ, Graham J, Liebermann J, Sill ES. Estimation of Second Polar Body Retention Rate After Conventional Insemination and Intracytoplasmic Sperm Injection: In Vitro Observations From more than 5000 Human Oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 371-376.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 1:182-7.

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12:1531-1536.

Son W-Y, Lee S-Y, Lim J-H. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles. *Hum Reprod* 2005; 20: 3204-3207.

Son W-Y, Chung J-T, Demirtas E, Holzer H, Sylvestre C, Buckett W, Chian R-C, Tan SL. Comparison of in-vitro maturation cycles with and without in-vivo matured oocytes retrieved. *RBMO Online* 2008;17: 59-67.

Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z: Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:334-338

Veeck, L Atlas of the Human oocyte and early conceptus. Vol.2 Williams & Wilkins, Baltimore, USA; 1999

Zhang XY, Ata B, Son WY, Bucket WM, Tan SL, Ao A. Chromosome abnormality rates in human embryos obtained from in-vitro maturation and IVF treatment cycles. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 552-559.

Zhao J-Z, Zhou W, Zhang W, Ge H-S In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*.2009; 91: 2568-2571.

First polar body genetic diagnosis (PbGD) as a selection tool of euploid oocytes before insemination.

Diagnóstico Genético del Primer Corpúsculo Polar (PbGD): herramienta de selección de ovocitos euploides antes de la fecundación.

O diagnóstico do primeiro corpúsculo polar (PbGD) na seleção de oócitos haploides, antes da inseminação

Cecilia Fabres^{1,2}, Emilio Fernández¹, Fernando Zegers-Hochschild¹, Antonio Mackenna¹, Javier A. Crosby¹

¹Unidad de Medicina Reproductiva, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

²Corresponding author: Cecilia Fabres, M.D. - Unidad de Medicina Reproductiva - Clínica Las Condes - Lo Fontecilla 441, Las Condes - Santiago, Chile - Email: cfabres@clc.cl - Telephone: (562) 2610-5390

ABSTRACT

Objective: This study presents the results of polar body genetic diagnosis (PbGD) used as selection tool of euploid oocytes, before their insemination by ICSI. This technique identifies five pairs of chromosomes [13, 16, 18, 21 & 22], in the first polar body of mature oocytes, obtained during an assisted reproductive technology (ART) procedure. **Design and Setting:** Infertile patients who consulted our Unit due to: recurrent miscarriage, more than two implantation failures or more than 38 years of age, between the years 2000 and 2011. Polar bodies were mechanically removed from mature oocytes, fixed and hybridized with a fluorescent probe and evaluated under epi-fluorescent microscope, identifying the five pairs of chromosomes.

Results and Discussion: Overall, 79% of mature oocytes of women of all ages were evaluated. The global clinical pregnancy rate in the study group was 35.9%. Historically, most women in this group had experienced either spontaneous abortions or implantation failures. When compared with age matched women having regular ART, pregnancy and abortion rates are not significantly different. Nevertheless, when compared to their previous cycles without PbGD, the results are significantly better. This methodology helps in the selection of oocytes before they are inseminated, which improves reproductive performance in selected patients.

Keywords: Polar body biopsy, Genetic screening, PGD, euploid/aneuploid oocytes.

RESUMO

Objetivo: Este estudo apresenta os resultados do diagnóstico genético do corpúsculo polar (PbGD), utilizado como ferramenta de seleção de oócitos euploides, antes da inseminação por ICSI. Esta técnica identifica cinco pares de cromossomas [13, 16, 18, 21 e 22], no primeiro corpúsculo polar de oócitos maduros, obtidos durante um procedimento de reprodução assistida (RA).

Materiais e métodos: Pacientes inférteis atendidos em nossa Unidade por : abortos recorrentes, duas ou mais falhas de implantação ou mais de 38 anos de idade, entre os anos de 2000 e 2011. Os corpúsculos polares foram removidos mecanicamente a partir de oócitos maduros, fixados e hibridizados com uma sonda fluorescente e avaliados sob microscópio epi-fluorescente, com identificação de 5 pares de cromossomas.

Resultados e Discussão: No geral, 79 de oócitos maduros de mulheres de todas as idades foram avaliados. A taxa de gestação clínica no grupo de estudo foi de 35,9%.

Historicamente, a maioria das mulheres neste grupo tinha experimentado abortos espontâneos ou falhas de implantação. Quando comparado com mulheres com gravidez por RA nas mesmas faixa etárias, as taxas de gravidez e aborto não são significativamente diferentes. No entanto, quando comparados aos seus ciclos anteriores, sem PbGD, os resultados são significativamente melhores. Esta metodologia ajuda na seleção de oócitos antes de serem inseminados, o que melhora o desempenho reprodutivo em pacientes selecionadas.

Palavras-chave: corpúsculo polar, rastreamento genético, PGD, oócitos euploides- aneuploides.

RESUMEN

Objetivo: presentar los resultados del diagnóstico genético en primer corpúsculo polar (PbGD) usado como herramienta de selección de ovocitos euploides, antes de su inseminación por ICSI. Esta técnica identifica 5 pares de cromosomas [13, 16, 18, 21 & 22], en el primer corpúsculo polar de ovocitos maduros, obtenidos durante procedimientos de reproducción asistida (ART).

Diseño: Pacientes infértiles atendidas en nuestra Unidad entre los años 2000 y 2011, por alguna de las siguientes condiciones: aborto recorrente, más de dos ciclos de ICSI con falla de implantación o más de 38 años de edad. Los corpúsculos polares fueron removidos mecánicamente, fijados e hibridizados con una sonda fluorescente, que marca 5 diferentes colores, uno para cada uno de los 5 pares en estudio. El análisis se realizó bajo un microscopio de epifluorescencia identificando los 5 pares de cromosomas.

Resultados y Discusión: En general, el 79% de los ovocitos maduros obtenidos en este grupo pudo ser evaluado. La tasa global de embarazo en el grupo de estudio fue de 35.9%. Históricamente, las mujeres que participaron de este estudio, habían experimentado abortos espontáneos, fallas de implantación, o no embarazo. Al compararlas con mujeres control pareadas por grupo etáreo, tanto la tasa de embarazo como la tasa de aborto no fueron significativamente distintas. Sin embargo, al compararse con ellas mismas en ciclos previos sin PbGD, los resultados fueron significativamente mejores. Esta metodología ayuda en la selección de ovocitos antes de la inseminación por ICSI y mejora los resultados reproductivos en mujeres con aborto recorrente, falla repetida de implantación o mayores a 38 años.

Palabras claves: Biopsia del corpúsculo polar, selección genética, PbGD, ovocitos euploides/aneuploides.

INTRODUCTION

In the last years in Chile, there has been a trend toward a delay in the age of women who want to get pregnant for the first time (Fuentes et al., 2010). This is a sociological phenomenon that is occurring all around the world and has led to an increase in spontaneous abortion rate, from 5.7 % to 8.9 % in the year 2007 (Instituto Nacional de Estadísticas de Chile; available at: <http://www.inec.cl>). Most of these pregnancy losses are attributed to chromosomal abnormalities (Be et al., 1997). In general, it is accepted that oocyte quality decreases with age and several publications have established a positive correlation between abnormalities in the number of chromosomes and increased maternal age (Munne et al., 1995; Verlinsky et al., 1996; Grifo et al., 1997).

Studying the karyotype of tissues obtained after dilation and curettage of first trimester spontaneous abortions it has been demonstrated that the most frequently compromised pairs of chromosomes are: 13, 16, 18, 21 and 22 (Be et al., 1997). Moreover, abnormalities in these chromosomes may also produce a miscarriage in the second trimester of pregnancy or the birth of an affected newborn. In order to determine the normality of the oocytes prior to insemination, we developed a technique named polar body genetic diagnosis (PbGD), which is performed in the first polar body of a mature oocyte (MII), using fluorescent in situ hybridization (FISH; Munne et al., 2000). The method uses only 5 colors or fluorescent markers, each color will identify one of the five pairs of chromosomes that are being studied. The increased or reduced number of fluorescent signals on each color determines if the oocyte is normal or aneuploid. (Munne et al., 1994). This technique is considered a non invasive method, since the first polar body is a sub product of the meiotic division that is neither required for the fertilization process, or the subsequent embryo development (Kaplan et al., 1995). It has also been demonstrated that its extraction does not affect the fertilization rate, cleavage or embryo development until the blastocyst stage (Verlinsky et al., 1996; Munne et al., 2000). The first polar body is a haploid cell but with double amount of DNA (1n2c), containing the two twin chromatides of the 23 pairs of chromosomes. The second polar body is the result of the meiosis II, which occurs after fertilization and corresponds also to a haploid cell (1n1c) with only one of the two twin chromatides of the 23 pairs of chromosomes.

The objective of this technique is to select normal oocytes before they are inseminated by ICSI, in the understanding that the number of chromosomes that are present in the first polar body represents the mirror image of the chromosomes that remain in the nucleus of the oocyte.

Indeed, the information obtained by the study of the first polar body provides less information when compared to that obtained studying the embryo itself, however, for some countries, it is not possible to discard abnormal embryos and therefore, pre-implantation genetic screening (PGS) is not an alternative.

However, one advantage is that 80% of the autosomic aneuploidies occur in the oocyte's first meiotic division (Munne et al., 2000; Verlinsky et al., 1998). Another advantage, is that the study of the first polar body allows the diagnosis before oocytes are inseminated, which has ethical implications for some couples who don't agree with the idea of discarding abnormal embryos.

We report the results obtained in a group of patients who underwent an ICSI cycle with PbGD between the years 2000 and 2011, for at least one of the following reasons: women older than 38 years or with recurrent miscarriage, and/or with more than one failed implantation IVF/ICSI cycles. The main objectives of this communication is to report on the results of applying this technique to the referred population, and to re-assess the value of applying PbGD in a selected group of patients.

METHODS

The study group consisted in infertile patients who consulted our Unit due to: recurrent miscarriage, more than two implantation failures or more than 38 years of age, between the years 2000 and 2011. This is a retrospective study with a control group that included 916 cycles of patients who had regular IVF/ICSI procedures during the same period, matched by age. Also 53 patients in the study were their own control comparing the results with their previous cycles with-out PbGD, the lapse time between previous failed cycle and PbGD ranged between 1 to 4 years. The latter group included 70 cycles with a previous pregnancy rate of 21.4 % and abortion rate of 67.1 %.

All patients underwent a treatment with Assisted Reproductive Techniques (ART; see glossary of terminology: Zegers et al., 2009) after they signed an informed consent for the procedure and study. A controlled ovarian stimulation (COS) with recFSH at different doses depending on the age and diagnosis of each patient was performed. As it was a heterogeneous group, there was no unique stimulation protocol, but to eliminate this variable from the study, in patients who had previous cycles, the protocol used for this study was the same she had previously used in those cycles without PbGD. Some patients used GnRH agonist and others GnRH antagonist. All women received ultra purified human Chorionic Gonadotrophin (hCG) 10.000 IU, when at least 2 follicles were ≥ 18 mm in diameter. Ovum pick-up was performed 36 hour after the hCG injection. Once oocytes were collected they were chemically and mechanically denudated from the cumulus cells and classified according to their maturity. Only MII oocytes were used for the study.

The polar body was mechanically removed (Handyside, 1991; Tarin & Handyside, 1993), under an invert microscope (Olympus IX-70) using micromanipulators with three micropipettes. One holds and stabilizes the oocyte, the second one opens a sleeve on the zona pellucida and the third one enters across the zona pellucida to extract the first polar body (Figure 1).

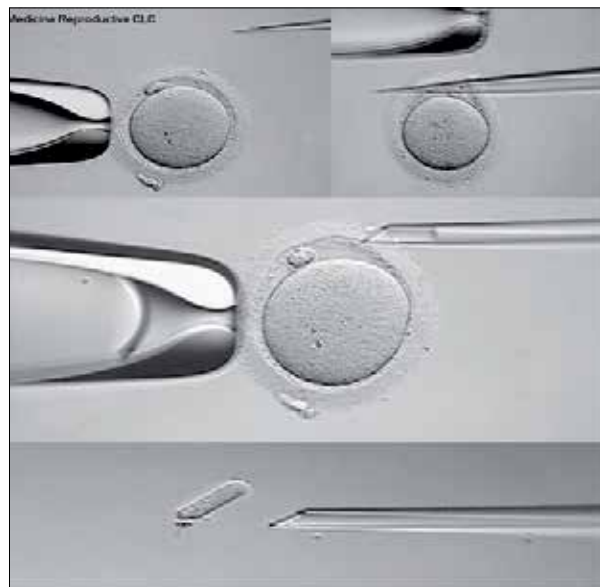


Figura 1. Polar Body Genetic Diagnosis (PbGD), mechanical biopsy.

Polar bodies were fixed over a slide with Carnoy solution (Methanol: Acetic acid, 3:1), denatured by incubation at 68° C, then, hybridized with the Multivision PB@% probe (Vysis, Abbott) that marks chromosomes 13, 16, 18, 21 and 22, during one hour at 42° C, followed by 3 hours of incubation at 37° C. Finally the excess of probe was washed out and the marked chromosomes were evaluated during the first 6-8 hours under the vision of an epifluorescent microscope (Olympus BX 51).

After 6 to 8 hours, ICSI was performed in normal oocytes and embryo transfer was performed two to five days later. All patients received luteal supplementation with a vaginal ring releasing progesterone, starting the day of follicular aspiration. Thirteen days after ovum pick-up, beta subunit hCG was determined and if positive, further controls depended on its progression. Clinical pregnancy was established when a gestational sac was identified with trans-vaginal ultrasound. If negative, progesterone vaginal ring was removed to allow menstruation.

Statistical analysis: To compare proportions a two-sided Yate's correction for continuity Chi-square Test was applied.

RESULTS

One hundred and thirty nine patients in 157 aspiration cycles, were included in the study (mean age: 39.2 ± 4.6 years; age range: 24-47 years; median age: 41 years). One thousand five hundred thirty one oocytes were collected, of which 1304 were MII (85.2%). The first polar body biopsy was performed on 1114 oocytes, and in 945 (86.3%) of them, the polar body was biopsied satisfactorily and chromosomal analysis was possible. In some patients in whom a large number of oocytes were recovered, not all the MII oocytes were biopsied. This explains the difference between the number of mature oocytes and the biopsied oocytes. One hundred ninety PB could not be evaluated (17.1 %) and less than 1% of oocytes were damaged and could not be injected after knowing the result of the study.

Overall, 52.6% of the 945 oocytes studied were aneuploid. In 66 cycles (42%) only aneuploid oocytes were obtained, and therefore, there was no embryo transfer.

The other 448 oocytes identified as normal, were injected by ICSI. The fertilization rate was 72.2%, but in 11 cycles (7%) even if one or two normal oocytes were found, they didn't fertilize. Embryo transfer was performed in only 78 (49.7%) of the 157 cycles (in 139 patients that had ovum pick-up). In two patients all embryos were cryopreserved in order to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. One of them became pregnant after the transfer of frozen/thawed embryos. There were 28 clinical pregnancies out of 78 transfers. The mean number of embryo transferred was 2.38. This gives a global clinical pregnancy rate of 35.8% and a 19.4% implantation rate. Six of these 28 pregnancies (21.4 %) ended in a spontaneous miscarriage.

Table 1. Global Pregnancy results between PbGD group and control group.

	PbGD	Control
Retrieval cycles	157	916
Mean age	39.2	35.4
Range	24 - 47	21 - 47
Median of the age	41	35
Retrieved matured oocytes	1304	7006
Fertilization rate	72.2 %	72.8 %
Number of embryo transfers	78	850
Mean embryo transferred	2.38	2.30
Pregnancies	28	374
Pregnancy Rate per transfer	35.8 %	44.0 %
Implantation rate	19.4 %	25.5 %
Abortions	6	42
Abortion Rate	21.4%	11.2 %

Global pregnancy results of the PbGD patients and the control group are shown in Figure 1. Pregnancy rate (35.8 vs. 44.0; $p = 0.2$) and abortion rate (21.4 vs. 11.2; $p = 0.194$) were not significantly different. Figure 2 shows these data on the same group of patients but comparing them with their previous cycle without PbGD. Pregnancy rate increased from 21 % to 36 % (p

$= 0.0443$) with the use of PbGD, and abortion rate was significantly reduced compared to the previous cycle (67% vs. 21 %; $p > 0.0001$).

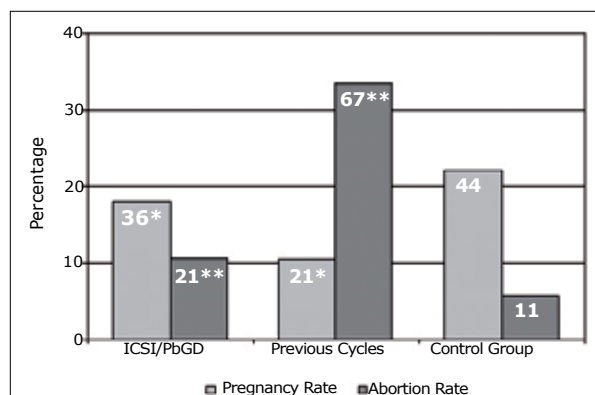


Figure 2. Pregnancy and Abortion Rate in 139 patients with PbGD analysis. 70 previous cycles of the same patients and in 916 control cycles (* $p = 0.0443$) (** $p < 0.001$).

For the analysis of the prognostic value of the test in women of different ages, patients were divided as follows: < 35 years (28 cycles in 27 patients); 35-39 years (32 cycles in 30 patients); 40-43 years (78 cycles in 68 patients) and 44-47 years (19 cycles in 14 patients). Results by age are presented in Table 2.

Table 2. Results presented by age categories.

Age (years)	24 to 34	35 to 39	40 to 43	44 to 47
Patients	27	30	68	14
Retrieval cycles	28	32	78	19
Retrieved matured oocytes	341	338	541	84
Biopsied oocytes	291	291	541	76
Evaluated Polar Bodies (Pb)	246 (85%)	256 (88%)	383 (84%)	60 (79%)
Aneuploid Pb	51 (21%)	111 (43%)	276 (72%)	58 (97%)
Embryo transfers	27 (96%)	23 (72%)	27 (35%)	1 (5%)
Pregnancies	11	9	8	0
Pregnancy Rate per transfer	40.70%	39.10%	10.30%	0.00%
Mean embryo transferred	2.59	2.43	2.19	1
Abortions	3	1	2	0
Abortion Rate	27,30%	11,10%	25,00%	0,00%

Based on this table we can establish the following: 1) older patients had higher frequency of aneuploid oocytes; 2) younger patients had higher probability of having normal oocytes and embryo transfer procedures; 3) even though this is a group of patients with bad obstetric history, younger patients had higher pregnancy rate, reaching as high as 40%. There are too few abortions to have a conclusion about this.

Figure 3 shows that abortion rate in patients who had PbGD was similar to the general population, in every age category.

DISCUSSION

The overall possibility of evaluating the chromosomes in the first polar body of mature oocytes was 79%, considering all age groups.

In 78 cycles in which the treatment was completed until the transfer of embryos, 28 of them (35.9 %) ended up in a clinical pregnancy, even though in previous cycles, these women had only miscarriages or implantation failure.

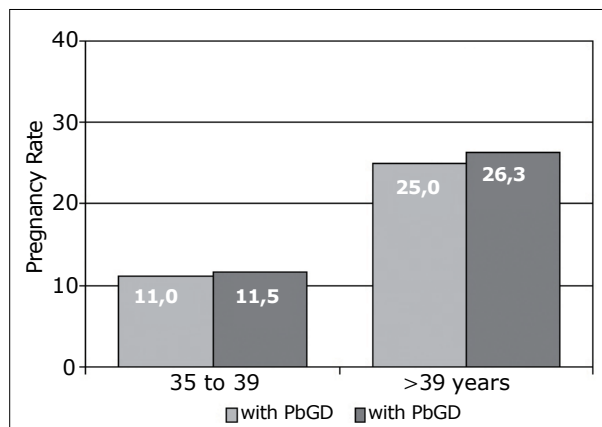


Figura 3. Abortion rate according to age of the patients with or without PbGD.

Pregnancy rate falls rapidly in women of 40-43 years, compared to women less than 40 years, even when oocyte selection was performed by PbGD and the mean number of embryos transferred was not different between the groups. If this group of patients is compared with women of the general population matched by age, the pregnancy and abortion rates are not significantly different. But comparing to themselves in their previous cycles without the selection of oocytes by PbGD, the results are statistically better.

The 77 cycles in which the transfer of embryos was not possible (cases with all abnormal oocytes or fertilization failure) corresponded to older women (42.1 ± 2.3 years) who also had a low number of oocytes analyzed (4.7 ± 2.7 oocytes). Indeed 89.6 % were women older than 40 years with less than 5 oocytes analyzed.

As it has been published (Munne et al., 1995; Verlinsky et al., 1996; Grifo et al., 1997) the aneuploid rate increases clearly with advanced age, reaching 97 % in women over 43 years. Inversely the number of normal embryos to be transferred diminishes, becoming critical over 43 years. For the purpose of counseling women, it is important to mention that in this age category, only 5% of cycles could have a transfer procedure, and no pregnancy occurred.

This methodology helps to select oocytes before they are fertilized, improve the reproductive efficacy and the results in certain patients.

However two patients who used this technique to select oocytes before insemination, had their pregnancies with a fetus chromosomally affected (one corresponded to a trisomy of the chromosome 18, and the other one a trisomy of chromosome 21). This is the main limitation of the study of the first polar body, as it has been mentioned in the introduction, since the aneuploidy could have been generated in the embryo during the 2nd meiotic division after fertilization or due to sperm abnormality.

In the absence of PGS, this technique represents a useful tool in women who had experienced repeated miscarriages or implantation failures because a high percentage of their oocytes have chromosomal aneuploidies that cannot be discarded by other means.

In younger patients (< 35 years) with repeated miscarriages, aneuploidy rate was 21 %, which is similar to what has been published in donated oocytes (Battaglia et al., 1996; Sandalinas et al., 2002). On the other hand, according to our results, patients over 43 years of age had 97% of aneuploid oocytes. For this reason we can counsel them to go straight to an alternative treatment such as egg donation, without passing through all the emotional stress and the cost of a PbGD cycle.

Figure 3 shows the abortion rate of patients who were pregnant after PbGD compared with the rest of patients, who were pregnant after regular ART. When comparing women under and above 40 years. PbGD does not reduce significantly the abortion rate; however, there is a substantial reduc-

tion in the abortion rate when women are compared to their previous cycles, reaching 65 % without PbGD. At present it is not possible to perform a statistical analysis of these data due to the reduce number of cycles.

It has to be mentioned that the technique itself has an error or the impossibility to make a diagnosis in about 10% of the oocytes being studied; it may be due to fragility of the oocyte or the first polar body. For this reasons it is recommended to have a minimum of 6 MII oocytes to perform the analysis. Considering that PbGD has a confidence of 90% (Van Steirteghem et al., 1997; Munne et al., 1993; Geraedts et al., 1999) for the chromosomes studied, there could still exist aneuploidy in one of the other eighteen pairs of chromosomes that are not studied with this methodology.

Acknowledgements

We want to acknowledge all clinicians of our Unit, for providing their patients to be studied, as well as all embryologists in the IVF Laboratory.

REFERENCES

- Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR: Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 1996, 11(10): 2217-2222.
- Be C, Velásquez P, Youlton R: Spontaneous abortion: cytogenetic study of 609 cases. *Rev Med Chile* 1997, 125(3):317-322.
- Fuentes A, Jesam C, Devoto L, Angarita B, Galeguillos A, Torres A, Mackenna A: Postergación de la maternidad en Chile: una realidad oculta. *Rev Med Chile* 2010, 138:1240-1245.
- Geraedts J, Handyside A, Harper J, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, Thornhill A, Vanderfaillie A, Viville S: ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 1999, 14(12):3138-3148.
- Grifo JA, Tang YX, Krey L: Update in preimplantation genetic diagnosis. Age, genetics, and infertility. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 828:162-165.
- Handyside AH: Biopsy of Cleavage Stage Embryos and Sexing by DNA Amplification. In *Preimplantation Genetics*. Edited by Verlinsky Y, Strom C. New York: Plenum; 1991:75-83.
- Kaplan B, Wolf G, Kovalinskaya L, Verlinsky Y: Viability of embryos following second polar body removal in a mouse model. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12(10):747-749.
- Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J: Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993, 8:2185-2191.
- Munne S, Grifo J, Cohen J, Weier HU: Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994, 55:150-159.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J: Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995, 64:382-391.
- Munne S, Sepulveda S, Balmaceda J, Fernandez E, Fabres C, Mackenna A, Lopez T, Crosby JA, Zegers-Hochschild F: Selection of the most common chromosome abnormalities in oocytes prior to ICSI. *Prenat Diagn* 2000, 20(7):582-586.
- Sandalinas M, Marquez C, Munne S: Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002, 8(6):580-585.
- Tarin JJ, Handyside AH: Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fert Steril* 1993, 59:943-952.
- Van Steirteghem A, Liu J, Van den Abbeel E, Liebaers I, Devroey P: Vitro Fertilization and Preimplantation Diagnosis. In *Preimplantation Genetics*. Edited by Verlinsky Y, Kuliev A. New York, Plenum Press; 1991:155-164.
- Verlinsky Y, Kuliev A: Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age. *Hum Reprod* 1996, 11(10):2076-2077.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A: Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 1998, 15:285-289.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S for ICMART and WHO: 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fert Steril* 2009, 92(5):1520-1524.

Incidência de malformações em fetos nas técnicas de reprodução assistida

Incidence of birth defects in assisted reproduction techniques

Tatiane Kelen dos Santos Silva¹, Luis Candido Pinto da Silva², Paulo Franco Taitson³

¹ Enfermeira graduada pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

² Professor Assistente e Coordenador da disciplina de Odontopediatria, Coordenador da Especialização em Odontologia para Paciente com Necessidades Especiais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

³ Professor Adjunto Doutor de Anatomia Humana e Responsável pela Disciplina de Reprodução Humana na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

RESUMO

O objetivo do estudo foi observar o aumento ou não da incidência de malformações de fetos oriundos de tecnologia de reprodução assistida. Para tal, foi realizada um levantamento na bases de dados bibliográficos **MEDLINE®** com os seguintes descritores: *fetus malformation and assisted reproduction* sendo encontrado um total de 65 artigos. Foram excluídos do estudo 46 trabalhos por não se adequarem ao tema ou por não estarem completos. 19 estudos preencheram o critério predeterminado e a limitação temporal do período de seleção de publicação de 1995 a 2011. Os resultados mostraram a somatória de 620 malformações. As malformações cardíacas estiveram presentes em 40,2% dos casos levantados. As alterações na parede abdominal e/ou do trato digestório em 22,3% dos casos. Os defeitos de formação óssea 13,2%, seguido das alterações do sistema nervoso central 7,7% e do trato genitourinário com 7,0%. Outras malformações isoladas ou cumulativas atingiram 9,7% dos casos. Não se observou um aumento considerável das malformações entre todos os nascimentos vivos, quando se comparado com a incidência de malformações em fetos não oriundos de técnicas de reprodução assistida. Aparentemente conclui-se que possa existir um risco aumentado de malformações em crianças nascidas por FIV, quando não se fez uma investigação genética do casal. De qualquer forma, mais estudos são necessários para poder elucidar estes aspectos da reprodução humana, principalmente no que diz respeito a uma normatização mais adequada de quando e que exames genéticos seriam necessários.

Palavras-chave: malformação em fetos, morfologia humana, reprodução assistida.

ABSTRACT

The aim of this study was to observe whether or not the increase in the incidence of malformations in fetuses resulting from assisted reproductive technology. To this end, a survey was conducted in the bibliographic databases MEDLINE® with the following keywords: *fetus malformations and assisted reproduction*. We found a total of 65 articles. The study excluded 46 studies because they do not suit the subject or are not complete. 19 studies met the predetermined criteria and the limit on the selection period of publication from 1995 to 2011. The results showed the sum of 620 malformations. The cardiac malformations were present in 40.2% of the surveyed cases. Changes in the abdo-

minal wall and / or digestive tract in 22.3% of cases. The defects of bone formation by 13.2%, followed by the central nervous system disorders 7.7% and 7.0% with the genitourinary tract. Other isolated malformations or cumulative reached 9.7% of cases. We did not observe a significant increase in malformations among all live births, when compared with the incidence of malformations in the fetus not resulting from assisted reproduction techniques. Apparently it is concluded that there may be an increased risk of malformations in children born by IVF, when it was not provided a genetic investigation of the couple. Anyway, more studies are needed in order to clarify these aspects of human reproduction, particularly as regards to more appropriate rules to genetic testing.

Keywords: *fetus malformations, human morphology, assisted reproduction.*

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a infertilidade é um problema vivido por 8% a 15% dos casais. No Brasil, estima-se que mais de 278 mil casais tenham dificuldade para gerar um filho em algum momento de sua idade fértil. Ressalta-se ainda que a esterilidade e a infertilidade são doenças devidamente registradas na Classificação Internacional de Doenças – CID 10 e, como tal, podem ser tratadas em muitos casos (WHO, 2010; Taitson et al., 2012). Entre as técnicas de baixa complexidade podemos incluir o coito programado e a inseminação intra-uterina (IIU) que apresentam menores custos. Entre as técnicas de alta complexidade incluímos a fertilização *in vitro* (FIV) convencional e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Casais que desejam ter filhos e que por algum motivo não os pode ter de maneira natural, recorrem a tais tecnologias disponíveis, na expectativa de poderem realizar o sonho de ter um filho. Entretanto, o casal deve ser informado dos riscos existentes tanto para a mãe quanto para o feto após a realização destes procedimentos (Lancaster, 1987; Bergh et al., 1999; Bonduelle et al., 2002).

No Brasil, como na maioria dos países, existem poucos estudos sobre a evolução dessas crianças, fato de extrema importância para a complementação e continuidade da assistência prestada, desde o início do tratamento da infertilidade à mãe até o nascimento de seu filho. Diante dessa realidade, é imprescindível que estudos sejam

feitos para identificar quais são esses riscos e qual a prevalência com que eles ocorrem em fetos oriundos de técnicas de reprodução assistida (Amso, 1995; Maymon Ron et al. 2005; Freitas et al., 2008b).

Araújo Filho e colaboradores em estudo publicado em 2006 analisaram um total de 680 crianças nascidas vivas de 511 casais submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Observou-se que a incidência de malformações congênitas foi de 2,9% e que este valor está próximo ao obtido na incidência de malformações congênitas para a população em geral não submetida a procedimentos de reprodução assistida (2,6%). Entretanto os autores destacam que para se estabelecer com precisão estes riscos é necessária continuidade na avaliação das crianças concebidas por ICSI. Considerando o aumento de casais que buscam atendimento especializado em clínicas de reprodução humana e, conseqüentemente, o aparecimento de malformações em embriões, o presente estudo mostra sua importância e validade no momento atual. Este trabalho justifica-se pela necessidade de identificar a incidência e as principais causas de malformação fetal decorrentes da reprodução assistida em relação às gestações espontâneas. Considerando que as técnicas de reprodução assistida vêm sendo utilizadas com frequência, e geram diversas discussões do ponto de vista ético e científico, é de fundamental importância analisar os dados existentes. Assim, procura-se observar o aumento ou não da incidência de má-formação em fetos oriundos de tecnologia de reprodução assistida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada pesquisa na base de dados do *Medline*® através de estudos publicados de 1995 a 2011. Este método possibilitou sumarizar as pesquisas já concluídas e obter conclusões a partir de um tema de interesse. Uma revisão integrativa bem realizada exige os mesmos padrões de rigor, clareza e replicação utilizada nos estudos primários. A pesquisa na base de dados *Medline*®, além de proporcionar a síntese de conhecimento produzido sobre um determinado tema, permite também a visualização de lacunas de evidências na prática profissional e viabiliza a contextualização do pesquisador em determinada temática. Para tal, foi realizado um levantamento no site da PUBMED, com os seguintes descritores: *fetus malformation and assisted reproduction*. Um total de 65 artigos foram encontrados. Durante a análise dos títulos foram excluídos 46 artigos por não se adequarem ao tema ou por não estarem completos na definição dos obje-

tivos do estudo. Os 19 artigos que foram selecionados descreviam as principais malformações decorrentes das técnicas de reprodução assistida e os principais riscos decorrentes e a limitação temporal do período de seleção de publicação de 1995 a 2011.

RESULTADOS

Os resultados mostraram a somatória de 620 malformações congênitas encontradas nestes 19 artigos (Cardíacas 249; abdominais 138; ósseo 82, aqui incluídas as 12 malformações cranianas; SNC 48; genitourinárias 43 e outras: cumulativas ou não, 60.) em casais submetidos a técnicas de reprodução assistida. As malformações cardíacas estiveram presentes em 40,2% dos casos levantados. As alterações parede abdominal e/ou do trato digestório em 22,3% dos casos. Os defeitos de formação óssea, 13,2% seguido das alterações do sistema nervoso central 7,7% e do trato genitourinário com 7,0%. Outras malformações isoladas ou cumulativas atingiram 9,7% dos casos, gráfico 1. As malformações cardíacas levantadas foram: defeito do septo interventricular: 33 casos (13,2%); comunicação interatrial (CIA) 31 casos (12,5%), coarctação da aorta: 23 casos (9,2%) e outras: 162 casos (65,1%), gráfico 2. O gráfico 3 mostra os tipos de malformações da parede abdominal/sistema digestório: defeitos da parede abdominal: 96 casos (69,6%) e defeitos nos órgãos do sistema digestório: 42 casos (30,4%). Na Inglaterra, desde 1990 existe uma norma estabelecida pelo parlamento para regular e vigiar os procedimentos de reprodução assistida. Também, em muitos outros países existem instituições ou regulamentos similares, que obrigam, na maioria dos casos, a estabelecer registros cuidadosos de todos os casos realizados e comunicar os mesmos, assim como seus resultados, à autoridade sanitária. Esta preocupação tem possibilitado conhecimento mais amplo sobre o verdadeiro impacto destas técnicas sobre a saúde da mulher, do feto e do recém-nascido. Nestes países, as clínicas devem possuir uma licença oficial de funcionamento, são visitadas pelo menos uma vez por ano por fiscais sanitários, e onde todos os registros de pacientes devem ser acessíveis e abertos para inspeção, o que tem sido motivo de críticas por parte dos diretores das clínicas (Human Fertilisation and Embriology Authority, 2005; Ola & Ledger, 2005; BRASIL, 2011). No Brasil, infelizmente, as autoridades de saúde somente recentemente têm implementado sistemas similares. Podemos assistir na mídia, de maneira geral, a profissionais médicos informando a realização de práticas muitas vezes proibidas pelos Conselhos de Medicina, nem sempre fundamentadas em verdades cientificamente comprovadas, sem que seja conhecido qualquer tipo de sanção. Da mesma forma, em diversos países, não existem registros nacionais destas técnicas conscientemente organizados, e a pouca bibliografia existente limita-se a informes de casos sem valor estatístico. O Registro Latino-Americano de Reprodução Assistida exerce uma função primordial de preencher estas lacunas, mas não exclui a atuação dos serviços públicos de vigilância sanitária (Senoz et al., 1997; CFM, 2010; Hochschild et al., 2010). A tecnologia em reprodução assistida (ART) é definida como uma abordagem para os casos de infertilidade em que ambos os óvulos e os espermatozoides são preparados fora do corpo, como a fertilização *in vitro* convencional (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Nos EUA, em 2005, mais de 134.000 procedimentos foram realizados com ART e mais de 52.000 crianças foram nascidos vivos, como resultado desses procedimentos, o que representa > 1% de todos os nascimentos nos EUA (Conray et., 2011).

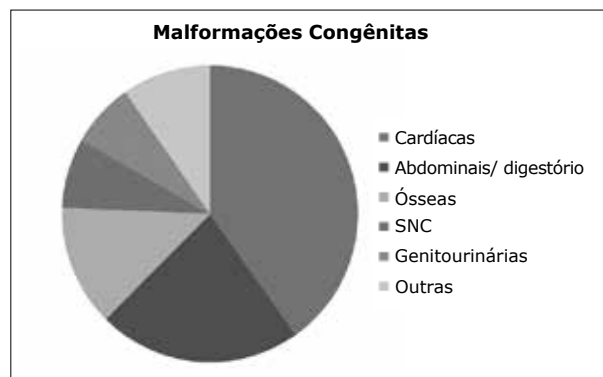
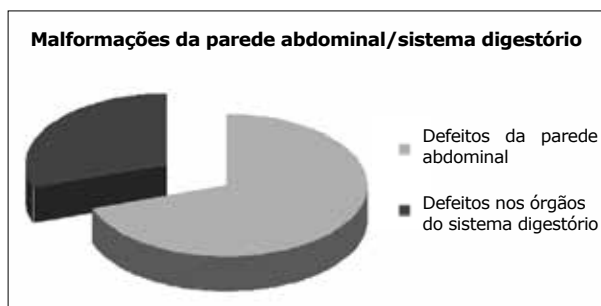


Figura 1. Tipos de malformação congênita e sua incidência.

Tabela 1. Tipos de malformações cardíacas

	Tipos de Malformações Cardíacas
Defeito do septo interventricular	13,2
CIA	12,5
Coartação da aorta	9,2

Atualmente a ART se constitui em um método bem estabelecido e amplamente praticado em quase todos os países do mundo, na América Latina a única exceção se faz na Costa Rica. Entretanto, apesar dos avanços relacionados a ART, existem poucos estudos em relação a sua segurança e aos potenciais riscos envolvidos nessas técnicas entre elas as malformações fetais, o que inviabiliza uma discussão mais ampla a cerca do tema. Com o intuito de identificar as malformações fetais que mais acometeram os fetos oriundos da reprodução assistida realizou-se uma revisão sistematizada da literatura, onde analisou-se os dados encontrado por diversos autores (Lancaster, 1987; FIVNAT, 1995; Olivennes et al., 1997; Freitas et al., 2008a; Freitas et al., 2008b). A cada década tem sido observado um aumento da utilização das técnicas de ART. Para citar alguns exemplos, em 1997 na América Latina 78 centros realizaram 11.530 procedimentos, dos quais 5.185 no Brasil. Dentre os procedimentos realizados, 3.789 foram ICSI. Em 1995, dentre os 5.179 procedimentos realizados, 1.549 foram ICSI e em 1996 entre os 8.270, foram ICSI 3.282. Entre os anos de 2000 e 2004 foram realizados na América Latina 58.104 procedimentos de reprodução assistida, dos quais 74,3% foram ICSI. A taxa de má formação tem oscilado entre 1% e 2%, o que não difere de qualquer outro procedimento (Senoz et al., 1997; Hochschild, 2010; Conray et al., 2011). Diversos autores têm destacado que a gestação múltipla seria um forte fator de risco para vários tipos de defeitos congênitos (Puhó et al, 2008; Skora & Frankfurter, 2012). Assim a ART poderia contribuir para o risco de defeitos congênitos importantes. No Brasil, em resolução normativa do Conselho Federal de medicina de dezembro de 2010, limitou-se ainda mais o número de embriões que podem ser transferidos por técnica (Freitas et al., 2009; CFM, 2010). Reefhuis e colaboradores em 2009 analisaram dados do Estudo Nacional de Prevenção de Defeitos de Nascimento, de base populacional, multicêntrico, estudo caso-controle de defeitos de nascimento durante o período de Outubro de 1997 a dezembro de 2003 em 10 estados americanos: (Arkansas, Califórnia, Georgia, Iowa, Massachusetts, New Jersey, New York, Carolina do Norte, Utah e Texas), utilizando método comparativo entre as mães que relataram uso ART (FIV ou ICSI) para engravidar, com aquelas que tiveram concepções espontâneas e ainda levando em consideração

**Figura 2.** Tipos de malformações da parede abdominal/sistema digestório

algumas características e comportamentos tais como: raça materna / etnia, idade materna, tabagismo e paridade, verificou-se neste estudo que em uma total de 9.584 casos e 4.792 mães controle, o uso da ART foi relatado por 51 (1,1%) mães de controle e 230 (2,4%) mães caso. Vinte e uma mães relataram ICSI (16 casos e 5 mães de controle), 36 mães (27 casos e 9 mães controle) relataram o uso de um óvulo doador, esperma ou embriões, como parte da ART e 45 mães de casos e controle de 10 mães relataram o uso de uma óvulo congelado esperma ou embriões. Woldringh e colaboradores em 2010 destacaram que homens com azoospermia podem, muitas vezes, adquirir sua prole através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), podendo serem utilizados espermatozoides oriundos do epidídimo ou dos testículos. Sendo assim, realizaram investigação em relação a possíveis alterações nos cariótipos dos fetos e anomalias congênitas correlacionadas a origem do espermatozoide. Os resultados mostraram em dois de oito cariótipos anormais, cinco relatos de malformações e um relato de acompanhamento das crianças após ICSI. Não se pode negar que o índice de nascidos a partir da ART nos últimos 25 anos, mesmo que seja substancial e em crescimento, é ainda muito pequeno em relação aos nascidos sem assistência reprodutiva e, conseqüentemente, é necessário acompanhar o seguimento deste tipo de nascimentos para apurar conclusões. Porém, se deve ter em conta que a associação observada de procedimentos de reprodução assistida e aumento das malformações não significa relação causal. Sobretudo será necessário esperar a chegada das crianças de hoje à idade reprodutiva, especialmente aquelas nascidas por ICSI, para conhecer melhor se há problemas reprodutivos entre elas. Entretanto, não há evidências em relação a um aumento do número de casos de câncer entre as crianças nascidas por procedimentos de reprodução assistida. Novos equipamentos de ultra-sonografia seguramente vão trazer maiores dados no seguimento pre-natal destas crianças, mas novamente deverão ser correlacionados aos dados das gestações espontâneas (Lerner-Geva et al., 2000; Klip et al., 2001; Graner & Barros, 2009). Um dos problemas para comparar séries de casos, ou estudos de corte com estes procedimentos, é a disparidade de definições entre os trabalhos, assim como os grupos utilizados como controles. Apesar de que alguns estudos tenham estratificado os casos e controles por idade e paridade, outros ignoram esta necessidade. Também em alguns trabalhos são eliminados os casos de aborto e de morte fetal intra-útero, muitos dos quais poderiam corresponder a casos de malformação. Em outros que tiveram esta preocupação, a idade gestacional não permitiu analisar estes aspectos. Aparentemente conclui-se que possa existir um risco aumentado de malformações em crianças nascidas por FIV, onde não se faça uma investigação genética do casal particularmente nos homens com azoospermia não obstrutiva (Ericson & Kallen, 2001; Fleisch & Hoehn, 2008). Como o número de gravidezes múltiplas em ART é mais alto que na população geral, levando a taxas maiores de prematuridade, isto tem levado a maiores custos, alguns inerentes ao procedimento em si, a internações das mulheres mais longas e mais freqüentes e, a isto, se devem somar os gastos com unidades de cuidado intensivo destas crianças. De qualquer forma, mais estudos serão necessários para poder elucidar estes aspectos da reprodução humana, principalmente no que diz respeito a uma normatização mais adequada de quando e que exames genéticos seriam necessários.

Correspondência:

Rua Rodrigues Caldas, 600/18
30190-120 Belo Horizonte/MG.
E-mail: pftaitson@bol.com.br

REFERÊNCIAS

1. Amso NN. Potential health hazards of assisted human reproduction: problems facing the clinician. *Hum Reprod*. 1995; 10:1628-30.
2. Araújo Filho E, Carillo SV, Silva PG, Martinhago CD, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Franco Jr JG. Incidência de malformações congênitas em crianças concebidas através de injeção intracitoplasmática de espermatozoides. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006; 28: 81-90.
3. Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, Nygren KG, Wennerholm UB. Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet* 1999; 354:1579-85.
4. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod*. 2002; 17:671-94.
5. BRASIL. Resolução RDC nº 23, 27 de maio de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos e dá outras providências. Diário Oficial da União; Brasília, 30 de maio de 2011.
6. Conselho Federal de Medicina. Resolução 1.957, de 15 de dezembro de 2010. Dispõe sobre reprodução humana artificial e adota as normas éticas para a utilização das técnicas de reprodução assistida. Brasília: CFM; 2010.
7. Conway DA, Patel SS, Liem J, Fan KJ, Jalian R, Williams J 3rd, Pisarska MD. The risk of cytogenetic abnormalities in the late first trimester of pregnancies conceived through assisted reproduction. *Fertil Steril*, 2011; 95:503-6.
8. Ericson A, Kallen B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Hum Reprod*, 2001; 16:504-9.
9. FIVNAT (French In Vitro National). Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. *Fertil Steril*, 1995; 64:746-56.
10. Fleisch MC, Hoehn T. Intrauterine fetal death after multiple umbilical cord torsion - complication of a twin pregnancy following assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet*, 2008; 25: 277-9.
11. Freitas M, Siqueira AAF, Segre CAM. Avanços em Reprodução Assistida. *Rev Bras Crescimento Desenvol Hum*, 2008a; 18:93-7.
12. Freitas M, Siqueira AGF, Segre CAM. Crianças nascidas após emprego de técnica de fertilização assistida. *Rev Bras Crescimento Desenvol Hum*, 2008b; 18:218-28.
13. Freitas M, Siqueira AGF, Segre CAM. Malformações do aparelho geniturinário em recém nascidos concebidos por técnicas de reprodução humana assistida. *Revista Einstein*, 2009; 7:480-4.
14. Graner VR, Barros SMO. Complicações maternas e ocorrências neonatais associadas às gestações múltiplas resultantes de técnicas de reprodução assistida. *Revista Escola de Enfermagem da USP*, 2009; 43:103-9.
15. Hochschild FZ et al. Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS). *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 2010; 14:14-8.
16. Human Fertilisation and Embryology Authority. Guide to infertility and directory of clinics. London: HFEA; 2005.
17. Klip H, Burger CW, de Kraker J, van Leeuwen FE. OMEGA-project group. Risk of cancer in the offspring of women who underwent ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod*, 2001; 16:2451-8.
18. Lancaster PA. Congenital malformations after in-vitro fertilisation. *Lancet*, 1987; 344:1392-3.
19. Lerner-Geva, L, Toren A, Chetrit A, Modan B, Mandel M, Rechavi G. et al. The risk for cancer among children of women who underwent in vitro fertilization. *Cancer*, 2000; 88:2845-7.
20. Maymon Ron et al. Current concepts of Down syndrome screening tests in assisted reproduction twin pregnancies: another double trouble. *Prenatal Diagnosis*, 2005; 25:746-50.
21. Ola B, Ledger WL. In vitro fertilisation. *Curr Obstet Gynaecol*, 2005; 15:314-23.
22. Olivennes F, Kerbrat V, Rufat P, Blanchet V, Fanchin R, Hazout A et al. Follow-up of a cohort of 422 children aged from 6 to 13 and conceived by in vitro fertilization. *Contracept Fertil Sex*, 1997; 25:13-8.
23. Puhó EH, Czeizel AE, Acs N, Bánhidly F. Birth outcomes of cases with unclassified multiple congenital abnormalities and pregnancy complications in their mothers depending on the number of component defects. Population-based case-control study. *Congenit Anom*, 2008; 48:126-36.
24. Reefhuis J et al. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Human Reprod*, 2009; 24:360-6.
25. Samrslá M, Nunes JC, Kalume C, Cunha ACR, Garrafa V. Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em Hospital Público do DF – Estudo Bioético. *Rev Assoc Med Bras*, 2007; 53:47-52.
26. Schenker JG, Ezra Y. Complications of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*, 1994; 61:411-22.
27. Skora D, Frankfurter D. Adverse perinatal events associated with ART. *Semin Reprod Med*, 2012; 30:84-91.
28. Senoz S, Bem-Chetrit A, Casper RF. An IVF Fallacy: multiple pregnancy risk is lower for older women. *J Assist Reprod Genet*, 1997; 14:192-8.
29. Taitson PF, Melo CSB, Mancebo ACA, Melo UB, Souza MCB. Pregnancy after percutaneous epididymal sperm aspiration in men 81 years old with obstructive azoospermia. *Andrologia*, 2012; 44:355-7.
30. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
31. Woldringh GH et al. Karyotyping, congenital anomalies and follow-up of children after intracytoplasmic sperm injection with non-ejaculated sperm: a systematic review. *Human Reprod*, 2010; 16:12-9.

FIV convencional vs ICSI em pacientes com amostras de semen normal e com teratozoospermia leve: Estudo com oócitos de mesma coorte.

FIV convencional vs ICSI en pacientes con semen normal o con teratozoospermia leve: Estudio utilizando oocitos de la misma cohorte.

Conventional IVF vs ICSI in patients with normal or mild teratozoospermic semen samples: A study with sibling oocytes.

- FIV VS ICSI EM TERATOZOOSPERMIA LEVE
- FIV VS ICSI EN TERATOZOOSPERMIA LEVE
- IVF VS ICSI IN MILD TERATOZOOSPERMIC

Claudio Ruhlmann¹, Carolina MM Baldi¹, Marcela Irigoyen¹, Rocío S Iazzo¹, Lautaro Tessari¹, A. Gustavo Martínez¹

¹Fertilidad San Isidro, San Isidro, Buenos Aires, Argentina

RESUMO

Objetivo: Comparar as taxas de fertilização em FIV e ICSI em pacientes normozoospermicos e teratozoospermicos leves.

Métodos: Foram estudados 81 casos de pacientes que fizeram o primeiro tratamento de fertilização in vitro. Se incluíram mulheres ≤ 43 anos com ≥ 4 oócitos maduros e homens < 51 anos. As amostras de semen foram avaliadas segundo a OMS 1999. Estas deviam apresentar uma concentração $> 20 \times 10^6$ spz/ml, mobilidade $A \geq 25\%$ e mobilidade $A+B \geq 40\%$. Foi considerado teratozoospermia leve os valores de Kruger entre 10 e 13 e normal Kruger ≥ 14 , os casos foram separados em dois grupos: Grupo 1: $K=10-13$ e Grupo 2: $K \geq 14$. Para evitar possíveis falhas de fertilização por FIV, os oócitos foram divididos em dois grupos, um deles foi inseminado por FIV e o outro por ICSI.

Resultados: Nenhuma diferença na taxa de fertilização entre G1 e G2 foi encontrada ($66,1 \pm 38,4$ vs $71,6 \pm 33,3$) na FIV convencional. Também não foram encontradas diferenças nos casos em que houve falha total de fertilização ($17,2\%$ vs $7,7\%$) e em que houve fecundação $\geq 67\%$ ($69,0\%$ vs $67,3\%$). Avaliando-se G1 e G2 juntos, se comparou FIV vs ICSI, observando-se que a ICSI obteve uma diferença maior para taxa de fertilização ($69,6 \pm 35,1$ vs $84,5 \pm 18,5$) e nos casos em que havia mais de 67% fertilização ($67,9\%$ vs $88,9\%$). A FIV apresentou um número maior de casos com falha total de fertilização (FIV $11,1\%$ vs ICSI 0%).

Conclusão: Nosso trabalho mostra a vantagem de realizar FIV+ICSI naqueles pacientes com indicação de FIV convencional que realizam tratamento de alta complexidade pela primeira vez.

Palavras chaves: Taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário, Kruger.

RESUMEN

Objetivo: Comparar las tasas de fecundación de FIV e ICSI en pacientes normozoospermicos o teratozoospermicos leves.

Métodos: Se estudiaron 81 casos con indicación de FIV, que realizaban el primer tratamiento. Se incluyeron mujeres ≤ 43 años con ≥ 4 oocitos maduros y hombres < 51 años. Las muestras de semen fueron evaluadas según OMS1999. Se incluyeron muestras con concentración $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/ml, movilidad Grado A $\geq 25\%$ y movilidad Grado A+B $\geq 40\%$.

Se consideró teratozoospermia leve, a valores de Kruger entre 10 y 13 y normal Kruger ≥ 14 , se separaron dos grupos: G1: $K=10-13$ y G2: $K \geq 14$.

Para prevenir posibles fallas de FIV, los oocitos fueron divididos en dos grupos, uno de ellos fue inseminado por FIV y el otro por ICSI.

Resultados: No se observaron diferencias entre G1 y G2 en la tasa de fecundación por FIV convencional ($66,1 \pm 38,4$ vs $71,6 \pm 33,3$). Tampoco se encontraron diferencias en los casos en que hubo falla total de fecundación ($17,2\%$ vs $7,7\%$) ni en los que hubo fecundación $\geq 67\%$ ($69,0\%$ vs $67,3\%$). Sumando G1 y G2 se comparó FIV vs ICSI, se observó que el ICSI tuvo una diferencia mayor en la tasa de fecundación ($69,6 \pm 35,1$ vs $84,5 \pm 18,5$) y en aquellos casos donde hubo fecundación $\geq 67\%$ ($67,9\%$ vs $88,9\%$). El FIV presentó un número mayor de casos con falla total de fecundación (FIV $11,1\%$ vs ICSI 0%).

Conclusión: Nuestros resultados muestran la ventaja de realizar FIV+ICSI en aquellos pacientes con indicación de FIV convencional que realizan tratamiento de fertilización asistida de alta complejidad por primera vez.

Palabras claves: Tasa de fecundación, desarrollo embrionario, Kruger.

ABSTRACT

Objective: To compare IVF and ICSI fertilization rates in normospermic or mild teratozoospermic patients.

Material and methods: Eighty-one couples, performing their first IVF cycle were included. Cases with male age > 50 , a women's age > 43 years or with less than 4 mature oocytes were excluded. Semen samples were evaluated using WHO 1999 criteria. Only were included those which have a concentration number $\geq 20 \times 10^6$ spermatozooids/ml, motility A $\geq 25\%$ and motility A+B $\geq 40\%$.

We considered mild teratozoospermia Kruger values between 10-13 and normal Kruger ≥ 14 , and patients there were divided in two groups: G1: $K=10-13$ and G2: $K \geq 14$. In every IVF cycle, sibling oocytes were divided in two groups, assigned to IVF or ICSI treatment.

Results: No significant differences were evident when comparing IVF fertilization rate (66.1 ± 38.4 vs. 71.6 ± 33.3); complete IVF fertilization failure (17.2% vs. 7.7%) or cycles with $\geq 67\%$ IVF fertilization rate (69.0% vs. 67.3%), respec-

tively for groups 1 and 2. To compare IVF vs ICSI, all patients were included. ICSI fertilization rate was higher (69.6 ± 35.1 vs 84.5 ± 18.5). There was no case with complete fertilization failure with ICSI vs. 9/81 (11%) with IVF.

Conclusion: Our results show the advantage of performing FIV+ICSI to those patients with IVF indication that undergo an artificial reproduction treatment for the first time.

Keywords: Fertilization rate, embryos development, Kruger.

INTRODUCCIÓN

Desde los comienzos de la fecundación asistida en humanos se han realizado numerosos esfuerzos para definir el porcentaje de espermatozoides normales en un eyaculado que pueda predecir la tasa de fecundación en una fertilización *in vitro* (FIV) convencional (Tournaye, 2012).

Desde la llegada de la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI) en el año 1992 (Palermo et al., 1992), la FIV convencional comenzó a perder terreno con respecto a ésta, llegando a la actualidad donde numerosos trabajos muestran que el ICSI está sobre indicado (Luna et al., 2011).

Los trabajos de Kruger (Kruger et al., 1987) definieron como normal aquellas muestras cuyos valores sean iguales o superiores al 15% de espermatozoides con morfología normal (considerando anormal a los espermatozoides con anomalías en la cabeza y/o la pieza intermedia y/o la cola). Estas serían las muestras indicadas para realizar una FIV convencional. Pese a ello el grado de teratozoospermia aceptable para realizar esta técnica continúa aún en discusión (Sun et al., 2012).

El manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 1999 (World Health Organization, 1999) define como muestras indicadas para realizar una FIV convencional a aquellas con valores iguales o superiores al 14% de morfología normal pero en la reciente revisión de dicho manual en el año 2010 (World Health Organization, 2010) cambia este valor proponiendo como umbral al 4 % de formas normales. Ante la hipótesis de que muestras con valores de morfología estricta de Kruger (K) $< 14\%$ pudieran tener valores de FIV convencional iguales a aquellos casos que utilizaron muestras con valores más elevados, el presente trabajo planteó como objetivo comparar las tasas de fecundación de FIV e ICSI en pacientes normozoospermicos y con teratozoospermia leve. Adicionalmente se compararon las tasas de éxito de FIV e ICSI de estos pacientes.

MÉTODOS

Se estudiaron en forma retrospectiva 81 casos de parejas con indicación de FIV que realizaron el primer tratamiento en nuestro instituto, durante el periodo comprendido entre febrero de 2009 a diciembre de 2011.

Los criterios de inclusión fueron: edad de la mujer ≤ 43 años, edad del varón < 51 años, primer tratamiento en nuestro instituto y obtener ≥ 4 oocitos maduros en la aspiración, luego de la hiperestimulación ovárica controlada (HOC). Por otra parte, empleando los criterios de OMS de 1999, se evaluaron las muestras de semen, las cuales debían presentar una concentración $\geq 20 \times 10^6$ spz/ml, movilidad Grado A $\geq 25\%$ y movilidad Grado A+B $\geq 40\%$.

Los casos fueron separados en dos grupos según su valor de morfología espermática estricta (Kruger): Grupo 1 (G1): K=10-13 (teratozoospermia leve) y Grupo 2(G2): K ≥ 14 (normal).

Todas las pacientes fueron estimuladas bajo supresión ovárica con agonistas de Gn-RH. (Lupron, laboratorios Abbot, Chicago, IL, EUA) o con esquema flexible de antagonistas (Cetrotide, Ares Sero laboratorios; o Orgalutran, NV Organon, Oss, Holanda). Se empleó FSHr solo (Gonal-F, Ares Sero laboratorios, Suiza; o Puregon, NV Organon, Oss, Holanda) o combinado con HMG (Menopur, Ferring). Se

mantuvo una dosis de gonadotrofina inicial de 225 a 300 IU durante 5 días y ajustada de acuerdo a la respuesta ovárica. Una sola dosis de HCG de 10000 IU (Pregnyl, NV Organon, Holanda) fue administrada 34-36 hs. antes de la recuperación de los oocitos. Para soporte de la fase lútea se utilizaron 800 mg diarios de progesterona micronizada intravaginal. Dado que el tratamiento en estudio fue el primero en nuestro instituto y con el objetivo de prevenir posibles fallas de fecundación por FIV convencional, en cada aspiración los oocitos obtenidos de cada paciente fueron divididos en dos grupos, uno de ellos fue inseminado por FIV convencional y el otro por ICSI.

Se registró la tasa de fecundación, porcentaje de casos en los que hubo falla de fecundación por alguna de las dos técnicas y porcentaje de casos en los que la fecundación fue $\geq 67\%$ (2/3). Los embriones fueron cultivados en los correspondientes medios según el estadio de desarrollo. Se registró el desarrollo de los embriones en los días 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3) y 5 (D5) luego del día de la aspiración.

Los embriones fueron clasificados en los D2 y D3 de cultivo según la cantidad de células y el porcentaje de fragmentación. Aquellos casos en los que había tres o más embriones de 7-8 células en día 3 se los dejó evolucionar hasta el estadio de blastocisto y se los transfirió en D5, el resto fue transferido en D3 de cultivo.

Los embarazos fueron corroborados mediante ecografía luego de 40 días desde la aspiración.

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Chi² o el test de Kruskal-Wallis según correspondiera. Se consideró significativo $p < 0.05$.

RESULTADOS

Un total de 81 parejas fueron incluidas en este estudio, 29 presentaron K=10-13 ($11,7 \pm 0,9$) y 52 un K ≥ 14 ($15,1 \pm 2,1$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos para edad femenina, edad masculina, números de intentos, movilidad Grado A y A+B, número de oocitos recuperados, número de oocitos MII, ni la proporción de casos que fueron transferidos en D5 (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de la población de paciente.

	Grupo 1 K=10-13	Grupo 2 K ≥ 14
Número de casos	29	52
Edad femenina	34,2 \pm 3,7	33,5 \pm 2,9
Edad masculina	35,8 \pm 5,3	36,6 \pm 4,2
Número de intentos	1,2 \pm 0,8	1,2 \pm 1,0
Movilidad Grado A	46,5 \pm 13,2	47,4 \pm 12,8
Movilidad Grado A+B	47,4 \pm 12,8	55,0 \pm 12,4
Número de oocitos recuperados	9,7 \pm 4,8	12,0 \pm 6,1
Número de oocitos MII recuperados	7,6 \pm 3,8	8,4 \pm 3,2
Número de transferencias en D5/ total	22/29 (76%)	38/52 (73%)

D5= Día 5

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de fecundación entre ambos grupos (Tabla 2). Tampoco se encontraron diferencias en los casos en que hubo falla total de fecundación ni en el número de casos cuya fecundación fue $\geq 67\%$.

Si bien no se encontraron diferencias al comparar FIV e ICSI dentro de los dos grupos, al sumarlos (K ≥ 10 , n=81) se observó que la técnica de ICSI tuvo una diferencia significativamente mayor en la tasa de fecun-

Tabla 2. Tasa de fecundación para los tratamientos de FIV convencional según su valor de Kruger.

	Grupo 1 K 10-13	Grupo 2 K ≥14
Tasa de fecundación	66,1±38,4	71,6±33,3
Número de casos con falla total de fecundación	5/29 (17,2%)	4/52 (7,7%)
Número de casos con fecundación ≥67%	20/29 (69%)	35/52 (67,3%)

dación y en aquellos casos donde hubo fecundación ≥67%. Por otra parte, el FIV convencional presentó un número significativamente mayor de casos con falla total de fecundación (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre los tratamientos para los grupo 1 y 2.

	Total de casos K ≥10 (n = 81)	
Técnica de fecundación	FIV	ICSI
Tasa de fecundación	69,6±35,1 ^a	84,5±18,5 ^b
Número de casos con falla total de fecundación	9/81 (11,1%) ^a	0/81 (0%) ^b
Número de casos con fecundación ≥67%	55/81 (67,9%) ^a	72/81 (88,9%) ^b

(^{a,b}) Difieren significativamente, p<0.05

Al comparar la calidad embrionaria entre las técnicas de FIV e ICSI se vio que pacientes con K =10-13 no mostraron diferencias significativas (Tabla 4), pero si las había en aquellos con K ≥14, para fragmentación en D2 y D3, número de embriones con 8 células en D3 y el número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de blastocito expandido (BE) (Tabla 5).

Tabla 4. Calidad embrionaria para FIV e ICSI para el Grupo 1 (K=10-13)

	FIV	ICSI
Número de embriones con 4 células en D2	46/85 (54%)	40/68 (59%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D2	55/85 (65%)	51/68 (75%)
Número de embriones con 8 células en D3	54/85 (64%)	44/68 (65%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D3	51/85 (60%)	51/68 (75%)
Número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de BE	28/52 (54%)	17/32 (53%)

D2 = Día 2; D3 = Día 3; D5 = Día 5; BE = Blastocisto expandido

Tabla 5. Calidad embrionaria para FIV e ICSI para el Grupo 2 (K ≥14)

	FIV	ICSI
Número de embriones con 4 células en D2	102/151 (68%)	103/165 (62%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D2	115/151 (76%) ^a	108/165 (65%) ^b
Número de embriones con 8 células en D3	105/151 (70%) ^a	103/165 (62%) ^b
Número de embriones con fragmentación = 0% en D3	117/151 (77%) ^a	106/165 (64%) ^b
Número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de BE	33/80 (41%)	23/63 (37%)

(^{a,b}) Difieren significativamente, p<0.05

D2 = Día 2; D3 = Día 3; D5 = Día 5; BE = Blastocisto expandido

La comparación entre las dos técnicas uniendo ambos grupos (K ≥10) mostró sólo diferencias significativas para el porcentaje de llegada a blastocisto a favor del FIV convencional (Tabla 6).

Tabla 6. Calidad embrionaria para FIV e ICSI para el total de los casos (K ≥10)

	FIV	ICSI
Número de embriones con 4 células en D2	148/236 (63%)	143/233 (61%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D2	170/236 (72%)	159/233 (68%)
Número de embriones con 8 células en D3	159/236 (67%)	147/233 (63%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D3	158/236 (67%)	157/233 (67%)
Llegada a blastocisto	132/236 (56%) ^a	95/233 (41%) ^b
Número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de BE	61/132 (46%)	40/95 (42%)

(^{a,b}) Difieren significativamente, p<0.05

D2 = Día 2; D3 = Día 3; D5 = Día 5; BE = Blastocisto expandido

Cuando se evaluó la calidad embrionaria para todos los casos de FIV convencional del G1 con los del G2 (Tabla 7) y lo mismo para los casos de ICSI (Tabla 8), no se vieron diferencias significativas para ICSI y sólo se observaron para el número de embriones con 4 células en D2 y para embriones sin fragmentos en D3 (0%) para el caso de FIV convencional.

Tabla 7. Calidad embrionaria para el tratamiento de FIV convencional según su valor de Kruger.

	FIV	ICSI
Número de embriones con 4 células en D2	46/85 (54%) ^a	102/151 (68%) ^b
Número de embriones con fragmentación = 0% en D2	55/85 (65%)	115/151 (76%)
Número de embriones con 8 células en D3	54/85 (64%)	105/151 (70%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D3	51/85 (60%) ^a	117/151 (77%) ^b
Número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de BE	28/52 (54%)	33/80 (41%)

(^{a,b}) Difieren significativamente, p<0.05

D2 = Día 2; D3 = Día 3; D5 = Día 5; BE = Blastocisto expandido

Tabla 8. Calidad embrionaria para el tratamiento de FIV convencional según su valor de Kruger.

	Grupo 1 K=10-13	Grupo 2 K≥14
Número de embriones con 4 células en D2	40/68 (59%)	103/165 (62%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D2	51/68 (75%)	108/165 (65%)
Número de embriones con 8 células en D3	44/68 (65%)	103/165 (62%)
Número de embriones con fragmentación = 0% en D3	51/68 (75%)	106/165 (64%)
Número de embriones de D5 que alcanzan el estadio de BE	17/32 (53%)	23/63 (37%)

D2 = Día 2; D3 = Día 3; D5 = Día 5; BE = Blastocisto expandido

Finalmente, cuando se compararon las tasas de éxito por transferencia según la técnica de fecundación empleada, no se observaron diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación del éxito por transferencia de cada procedimiento.

	FIV	FIV/ICSI	ICSI
Número de transferencias	35	24	22
Promedio de embriones transferidos	2,1±0,2 ^a	2,3±0,5 ^b	2,5±0,7 ^b
Tasa de embarazo clínico	22/35 (63%)	14/24 (58%)	12/22 (55%)
Tasa de implantación	31/72 (43%)	17/56 (30%)	17/54 (31%)
Tasa de embarazos múltiples (≥2 sacos)	9/22 (41%)	3/14 (21%)	5/12 (42%)
Tasa de aborto	5/22 (23%)	1/14 (7%)	2/12 (17%)
Tasa de embarazo ectópico	0/22 (0%)	1/14 (7%)	0/12 (0%)
Tasa de nacimientos	17/35 (49%)	12/24 (50%)	10/22 (45%)

DISCUSIÓN

Existen numerosos trabajos que evidencian que para aquellos casos donde existe factor masculino severo ($K < 4$) es aconsejable realizar la fecundación mediante la técnica de ICSI para obtener mejores resultados (Haute Autorité de Santé, 2007). También se encuentra bien documentado que para parejas con factor masculino normal ($K \geq 14$) se recomienda realizar FIV convencional (Macklon & Fauser, 2004), pero poco se evaluó sobre los pacientes que presentaban valores de Kruger intermedios ($K = 10-13$). Este trabajo se centró en comparar el éxito de las técnicas de FIV e ICSI en pacientes con morfología normal y con teratozoospermia leve ($K = 10-13$).

Al comparar los resultados de FIV convencional para los grupos 1 y 2 se vio que no había diferencias tanto en la tasa de fecundación global como en el número de casos en los que hubo falla total de fecundación y en los que la fecundación fue $\geq 67\%$. A partir de ello se decidió unificar los grupos ($K > 10$) para evaluar los mismos parámetros comparando FIV e ICSI. Cabe remarcar que el presente estudio se realizó empleando la misma cohorte de oocitos divididos en dos grupos, lo cual otorga a los resultados de la comparación de FIV e ICSI, el valor de ser obtenidos evitando la variabilidad entre pacientes. Al analizar la tasa de fecundación global se encontraron diferencias significativas en favor del ICSI (69,6±35,1% vs 84,5±18,5%). Lo mismo ocurrió cuando se evaluó el número de casos que presentaron falla de fecundación total según la técnica, donde se encontraron diferencias significativas a favor del ICSI (11,1% vs 0%). De esta forma, se rescataron 9 de 81 casos que hubieran fracasado si sólo se les hubiera hecho FIV convencional.

Por último, cuando se evaluó la cantidad de casos en los que la tasa de fecundación fue $\geq 67\%$ se encontraron diferencias significativas a favor del tratamiento de ICSI (67,9% vs 88,9%).

Nuestros hallazgos coinciden con los reportados por Lucas (Lucas et al., 2010) quienes obtuvieron resultados similares en un estudio multicéntrico realizado sobre 487 casos.

En ambos trabajos se observa un efecto de la técnica empleada para realizar la fecundación, la cual deberá ser tomada en cuenta con precaución ya que en los casos de FIV convencional queda enmascarado por la posibilidad de calcular esta tasa sobre oocitos que al momento de descargar los espermatozoides en la cápsula de cultivo eran inmaduros. De cualquier manera, existe un beneficio al realizar FIV + ICSI en pacientes que realizan un tratamiento con indicación de FIV convencional por primera vez, dando un pronóstico más favorable para la pareja, ya que de esta forma pueden prevenirse casos de falla de fecundación total. Esto ya ha sido discutido en anteriores trabajos donde se plantea el inconveniente de realizar un ICSI de rescate luego de una falla total de fecundación mediante FIV convencional (Shalom-paz et al., 2011; Taylor et al., 2008).

En cuanto a la calidad embrionaria, al comparar ambas técnicas de fecundación, aquellas muestras con $K=10-13$ no presentaron diferencias en los resultados, pero para los casos con $K \geq 14$ se vieron diferencias a favor del FIV convencional, mostrando que habría una mejor calidad embrionaria y mejor llegada al estadio de blastocisto. Esto mostraría un posible efecto de la técnica empleada para la fecundación sobre la calidad embrionaria producto, posiblemente, de someter a los oocitos a una mayor manipulación para realizar el ICSI.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos destacar la ventaja de realizar FIV + ICSI en aquellos pacientes con indicación de FIV convencional que realizan tratamiento de alta complejidad por primera vez. También podemos afirmar que la teratozoospermia leve no tiene efecto sobre los oocitos en la fecundación. En la actualidad nos encontramos avocados a estudiar el efecto de la técnica de fecundación sobre la calidad embrionaria y tasa de llegada a blastocisto y la evaluación de la técnica de FIV + ICSI en parejas en las que el varón presenta valores de morfología estricta ≤ 9 .

Correspondencia:

A. Gustavo Martínez

Endereço: Libertador 16958 San Isidro - Buenos Aires

Telefone: 54-11-4743-5225

Email: agmartinez@fibertel.com.ar

REFERENCIAS

- Haute Autorité de Santé Prog. Evaluation of fertilization in vitro with micromanipulation (intracytoplasmic sperm injection [ICSI]). Indications, cost-effectiveness and risks for offspring. *Progrès en Urologie*. 2007; 7: 1313-18.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*. 1987; 30: 248-51.
- Lucas H, Lammers J, Pfeffer J, Aknin I, Carré-Pigeon F, Jafou N, Paulus JM, Sifer C. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes: A French experience analysis for BLEFCO. *Gynecol Obstet Fertil*. 2010; 38: 515-20.
- Luna M, Bigelow C, Duke M, Ruman J, Sandler B, Grunfeld L, Copperman AB. Should ICSI be recommended routinely in patients with four or fewer oocytes retrieved? *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28: 911-15.
- Macklon NS, Fauser BC. Indications for IVF treatment: from diagnosis to prognosis. In: Gardner DK, Weissman A, Howles C and Shoham Z (eds). *Textbook of Assisted Reproductive Technology: Laboratory and Clinical Perspectives*. 2nd edition. 2004; p.495-505.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992; 340: 17-18.
- Shalom-paz E, Alshalati J, Shehata F, Jimenez L, Son WY, Holzer H, Tan SL, Almog B. Clinical and economic analysis of rescue intracytoplasmic sperm injection cycles. *Gynecological Endocrinology*. 2011; 12: 993-6.
- Sun Y, Li B, Fan LQ, Zhu WB, Chen XJ, Feng JH, Yang CL, Zhang YH. Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normalsperm concentration and motility? *Andrologia*. 2012; doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01280.x
- Taylor TH, Wright G, Jones-Colon S, Mitchell-Leef D, Kort HI, Nagy ZP. Comparison of ICSI and conventional IVF in patients with increased oocyte immaturity. *RBM Online*. 2008; 17: 46-52.
- Tournaye H. Male factor infertility and ART. *Asian J Androl*. 2012; 1: 103-8.
- World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2nd edition. London: Cambridge University Press; 1999.
- World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination and processing of human sperm, 5th edition. London: Cambridge University Press; 2010.

La encrucijada de la Fertilización In-Vitro en Costa Rica

The Crossroads of the In-Vitro Fertilization in Costa Rica A encruzilhada da fertilização in vitro em Costa Rica

Carlos José Valerio Monge

Abogado especialista en Salud Pública y Derecho a la Salud - Funcionario del Ombudsman de Costa Rica
E-mail: cajovamo@amnet.cr

RESUMEN

Puede que sea Costa Rica, el país donde el tema de la FIV haya sido más ampliamente debatido desde una perspectiva médica, ética, religiosa y de derechos humanos. Así es que la prohibición de la fertilización in vitro afectó el derecho a la salud de las parejas que no podían tratar la infertilidad a través de otro método representando una supresión de la identidad personal y de la autonomía personal para decidir tener hijos biológicos y desarrollar el proyecto de vida. El 19 de enero de 2001, un grupo de parejas perjudicadas por esta resolución presentaron una denuncia ante la Comisión Interamericana de Derechos Humanos (CIDH), contra el Estado costarricense. La CIDH señaló que la prohibición de la fertilización in vitro afectó el derecho a la salud y se realizaron decenas de simposios, siendo uno de los más importantes por su carácter internacional el que realizaron de manera conjunta la REDLARA y la Asociación de Derecho Médico de Costa Rica en 2011. Se presentaron en la Asamblea Legislativa varios proyectos de ley pero ninguno fue aprobado. De esta forma, la CIDH inició a los procedimientos jurisdiccionales contra el Estado de Costa Rica en setiembre de 2012. Mantenemos la esperanza de que la resolución de la Corte sea notificada al país para el mes de diciembre de 2012.

ABSTRACT

It may be Costa Rica, the country where the issue of IVF has been widely discussed from a medical, ethical, religious and human rights. So the ban on in vitro fertilization affected the right to health of couples who could not treat infertility through another method representing a deletion of personal identity and personal autonomy to decide to have biological children and develop life project. On January 19, 2001, a group of couples affected by this resolution filed a complaint with the Commission on Human Rights (IACHR) against the Costa Rican government. The Commission noted that the ban on in vitro fertilization affected the right to health. After this dozens of symposia on these matters were conducted, one of the most important by its international character which joined the REDLARA and the Medical Law Association of Costa Rica in 2011. Various law projects about ART were presented in the Legislative Assembly but none were approved. Thus, the Commission initiated court proceedings against the State of Costa Rica in September 2012. The Court's decision will be notified to the country for the month of December 2012.

RESUMO

Costa Rica pode ser o país onde a questão da fertilização in vitro tem sido das mais amplamente discutidas a partir de uma perspectiva médica, ética, de direitos religiosos e humanos. A proibição da fertilização in vitro tem afetado o direito à saúde dos casais que não podem tratar a infertilidade através de outro método, sendo uma supressão da identidade pessoal e de autonomia pessoal para decidir ter filhos biológicos e desenvolver um projeto de vida. Em 19

de janeiro de 2001, um grupo de casais afetados por essa proibição realizou uma queixa junto à Comissão Internacional de Direitos Humanos (CIDH), contra o governo da Costa Rica. A Comissão aceitou que a proibição da fertilização in vitro afeta o direito à saúde e determinou ações a serem seguidas pelo país. Daí, dezenas de simpósios foram realizados sobre o tema e um dos mais importantes, por seu caráter internacional, teve o apoio da REDLARA e da Associação de Direito Médico de Costa Rica, em 2011. Foram apresentados vários projetos de Lei à Assembleia Legislativa do país, mas nenhum foi aprovado. Assim, a CIDH deu início a um processo judicial contra o Estado da Costa Rica, em setembro de 2012. A decisão final deverá ser notificada ao país até o mês de dezembro de 2012. Pode que sea Costa Rica, el país donde el tema de la FIV haya sido más ampliamente debatido desde una perspectiva médica, ética, religiosa y de derechos humanos. El inicio del desarrollo normativo y jurisprudencial de este tema en Costa Rica data de 1996 cuando la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), mediante Acuerdo de la Sesión 7082 del 27 de noviembre de 1996, rechazó la fecundación in vitro por considerarla ilícita, debido a que supone un grave riesgo de producción de abortos. Ese mismo año, la Asamblea Legislativa de Costa Rica comenzó a discutir la conveniencia o no de esta técnica de reproducción asistida. Para el año 1998, se había presentado ante la Asamblea Legislativa un proyecto de ley en el que entre otros temas, se pretendía regular la fecundación asistida. Sin embargo, el 15 de marzo del 2001 la Sala Constitucional anuló el Decreto Nº 24029-S "Fecundación *In vitro* y Transferencia de Embriones" o FIVET del 3 de febrero de 1995, del 3 de marzo de 1995 mediante el cual el país regulaba este procedimiento médico de reproducción asistida. La Sala Constitucional costarricense consideró, con fundamento en una serie de argumentos constitucionales, de Derechos Humanos, así como con base en valoraciones morales y religiosas e interpretando hechos biológicos respecto del inicio de la vida, que el FIV atentaba contra la vida humana. La Sala indicó que todo ser humano tiene un comienzo único que se produce en el momento mismo de la fecundación. La Sala Constitucional consideró además: "*En cuanto ha sido concebida, una persona es una persona y estamos ante un ser vivo, con derecho a ser protegido por el ordenamiento jurídico. Esta segunda posición es acorde con las normas del Derecho Internacional de los Derechos Humanos vigentes en Costa Rica.*" La objeción principal de la Sala fue que la aplicación de la técnica importaba una elevada pérdida de embriones, que no podía justificarse en el hecho de que el objetivo de ésta es lograr un ser humano y dotar de un hijo a una pareja que de otra forma no podría tenerlo.

Por contravenir la técnica, considerada en sí misma, el derecho a la vida, la Sala dejó expresa constancia de que, ni siquiera por norma de rango legal era posible autorizar legítimamente su aplicación, al menos mientras su desarrollo científico permanezca en el actual estado y signifique el daño

consciente de vidas humanas. El 19 de enero de 2001, un grupo de parejas perjudicadas por esta resolución presentaron una denuncia ante la Comisión Interamericana de Derechos Humanos (CIDH), contra el Estado costarricense, en la que alegaba la responsabilidad internacional por las implicaciones de la anterior sentencia. La Comisión informó la apertura del caso número 12.361 que se ocuparía de darle trámite a esta demanda. Los peticionarios alegaron que la referida sentencia violaba los artículos 1, 2, 4, 5, 8, 11(2), 17, 24, 25, 26 y 32 de la Convención Americana sobre Derechos Humanos, así como los artículos 3, 10 y 15 del Protocolo Adicional a la Convención Americana sobre Derechos Humanos en materia de Derechos Económicos, Sociales y Culturales y los artículos 1 y 7(h) de la Convención Interamericana para Prevenir, Sancionar y Erradicar la Violencia contra la Mujer. Los peticionarios alegaron que la prohibición de la práctica de la FIV en Costa Rica, importaba una discriminación y un tratamiento desigual entre enfermos, violando de esta forma los artículos 1 y 24 de la Convención Americana. Los peticionarios también alegaron que el Estado de Costa Rica violó el artículo 17 de la Convención Americana a través de la prohibición de la técnica de la FIV cuando negó a hombres y mujeres que padecen infertilidad o esterilidad la posibilidad de fundar o constituir una familia. Mientras la CIDH tramitaba esta denuncia contra el Estado costarricense, se presentó a nivel interno una denuncia contra la CCSS en un proceso contencioso administrativo, el cual se declaró con lugar en el año 2008. El Tribunal Contencioso Administrativo concluyó que la fecundación in Vitro como mecanismo de reproducción asistida no está prohibida en Costa Rica, en el tanto no se incurriera en los vicios señalados por la Sala Constitucional, sobre todo tomando en cuenta que el desarrollo actual de este procedimiento médico posibilita, en un ciclo reproductivo femenino, la fecundación de un solo óvulo para su posterior transferencia al útero de la madre. El Tribunal agregó que mediante la Ley No. 8661 de 19 de agosto del 2008, Costa Rica al aprobar la Convención sobre los Derechos de las Personas con Discapacidad y su Protocolo, se comprometía a evitar realizar acciones u omisiones de "discriminación por motivos de discapacidad" Precisamente, bajo ésta óptica, el Tribunal consideró que la discapacidad reproductiva refiere a una enfermedad, que si bien, no tiene riesgo de vida para quien la padece (aunque si lo podrían ser las causas que la originan), si dice de una limitación de sus capacidades como ser vivo a partir de una disfuncionalidad de su organismo y, además, conlleva una afectación en su salud psicológica, lesionando con ello el derecho a la salud de los pacientes, tutelado, por ejemplo, en el numeral 10 del Protocolo a la Convención de Derechos Económicos y Sociales de San Salvador, aprobado por la Ley No. 7907 de 03 de septiembre de 1999. El Tribunal concluyó que la infertilidad, como enfermedad que refiere a la discapacidad en la reproducción humana, afecta la salud de quienes la padecen y, por consiguiente, la Caja Costarricense de Seguro Social, como entidad estatal encargada de los tratamientos a la salud por mandato expreso del artículo 73 de la Carta Magna, el cual es de aplicación directa, debe brindar la atención médica que corresponda de conformidad con el desarrollo de la ciencia. Lamentablemente, esta resolución fue apelada por la CCSS dejándose sin efecto la condena contra esta Institución Dichosamente, la CIDH, concluyó su informe sobre la demanda contra el Estado costarricense el 14 de julio de 2010 el cual fue notificado el 23 de agosto de 2010, mediante la Resolución No.85/10 señalando que "el Estado de Costa Rica violó los derechos consagrados en los artículos 11.2 (derecho a la vida privada) 17.2 (derecho a fundar una familia) y 24 (garantiza la equidad y protección ante la ley), de la Convención Americana de Derechos Humanos en relación con las obligaciones establecidas en los artículos 1,1

y 2 del mismo instrumento" De forma vehemente, la CIDH señaló que la prohibición de la fertilización in vitro afectó el derecho a la salud de las víctimas y que en los casos de las parejas que no podían tratar la infertilidad a través de otro método la prohibición representó una supresión de la identidad personal y de la autonomía personal para decidir tener hijos biológicos y desarrollar el proyecto de vida. Además para la CIDH constituyó una limitación desproporcionada al derecho de la pareja de tomar decisiones en cuanto a fundar una familia. Fue una medida discriminatoria en la medida en que impidió a las víctimas superar la situación de desventaja en que se encontraban a través del aprovechamiento de los adelantos científicos y además tuvo un impacto diferenciado en las mujeres, pues incidió en su autonomía en un grado mayor que en la de los hombres infértiles.

Como recomendaciones al Estado costarricense, las cuales debieron ser cumplidas el 23 de octubre de 2011, la CIDH señaló las siguientes:

a.- Levantar la prohibición de la FIV.

b.- Asegurar que la regulación que se otorgue a la práctica de la fecundación in vitro sea compatible con los artículos 11.2, 17.2 y 24.

c.- Reparar integralmente a las víctimas.

Luego de esta resolución, a principios del año 2012 se presentaron en la Asamblea Legislativa varios proyectos de ley. Se realizaron decenas de simposios, siendo uno de los más importantes por su carácter internacional el que realizaron de manera conjunta la REDLARA y la Asociación de Derecho Médico de Costa Rica en julio de 2011 con la participación de expertos como la Dra. Sheryl Vanderpoel de la OMS, el Dr. Ian Cooke de la IFFS, la licenciada Vera Raposo, abogada de Portugal, De Estados Unidos, el Dr. Klaus Wiemer, Director de KEW Technologies y por parte de la (REDLARA) participaron la Dra. María Do Carmos Borges de Brasil Presidenta de REDLARA y la Dra. María Teresa Urbina de Venezuela, Directora Regional de REDLARA. En cuanto a los proyectos de ley, cabe decir que ninguno fue aprobado. Por el contrario, todos fueron archivados. Las indemnizaciones por ende tampoco se realizaron. De esta forma, la Corte Interamericana de Derechos Humanos acuerda dar inicio a los procedimientos jurisdiccionales contra el Estado de Costa Rica, lo cual ocurrió los días 5 y 6 de setiembre, momento en el cual la Comisión rindió un informe con sus conclusiones. Ese día, los abogados de las víctimas, los peritos y los representantes de Estado debatieron ampliamente sobre los aspectos científicos y de derechos humanos de la FIV.

Un debate como probablemente pocos ha habido en el que se tuvo la oportunidad de enfrentar las viejas teorías de quienes adversan la FIV de frente a la realidad científica y normativa de la misma. Quienes estuvimos ese día en esa audiencia quedamos convencidos del nivel de preocupación que mostraron los jueces de la Corte por comprender los motivos y los argumentos que tuvo Costa Rica para prohibir esta técnica. A la vez fue posible constatar la penosa situación en la que – acorralado- quedó el Estado costarricense ese día. El caso de Costa Rica es emblemático por que es el único país del mundo donde se ha prohibido la realización del FIV. En otras legislaciones se protege al embrión, pero Costa Rica es el único país que para protegerlo, prohíbe el FIV. Sin embargo, ninguno prohíbe la FIV. Finalmente, con la prohibición de la Sala Constitucional no se logró evitar que las parejas del país se sometieran al FIV, pues las que han tenido los recursos económicos continúan recibiendo el tratamiento en otros países, con lo cual solo se aumentó la inequidad en el acceso de este tratamiento. Esta situación se mantiene. Sin embargo, mantenemos la esperanza de que la resolución de la Corte Interamericana de Derechos Humanos sea notificada al país para el mes de diciembre de 2012.

Gestação clínica após transferência de embriões desvitrificados obtidos em ciclo de IVM.

Marcos Höher¹, Adriana Bos-Mikich², Gerta N. Frantz¹, Norma P Oliveira¹, Nilo Frantz¹

¹ Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz – Porto Alegre (RS), Brasil.

² Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde –ICBS –Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre (RS), Brasil.

RESUMO

Esta é a primeira descrição de gestação no Brasil após a combinação de duas tecnologias de ponta em reprodução humana: a IVM e a vitrificação embrionária. Trata-se de uma estratégia que permite, dentro do tratamento de infertilidade, aumentar as taxas de gestação por contornar um eventual crescimento endometrial insuficiente ao preparar adequadamente o útero para a transferência dos embriões em um ciclo posterior à IVM.

Palavras-chave: Gestação, IVM, vitrificação, endométrio

ABSTRACT

This is the first report in Brazil of a pregnancy following the combination of two state-of-the-art technologies in human assisted reproduction: IVM and embryo vitrification. The present strategy allows, within the infertility treatment, to increase gestational rates, because it gets round a potential poor endometrial growth, as it adequately prepares the uterus for embryo transfer in a later cycle to IVM.

Keywords: Pregnancy, IVM, vitrification, endometrium

INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* de oócitos (IVM) é uma tecnologia de reprodução assistida que vem se disseminando gradativamente dentre as opções de tratamento da infertilidade de causa anovulatória. Suas vantagens são divulgadas e reconhecidas pelos centros que empregam a tecnologia em reprodução assistida (RA). As pacientes são beneficiadas, pois não necessitam se submeter à estimulação ovariana controlada e, portanto, realizam o tratamento de forma menos onerosa e mais confortável, sendo dispensadas as injeções diárias de gonadotrofinas exógenas e, assim, do risco da Síndrome de Hiperestimulação Ovariana. Os resultados de fertilização, desenvolvimento embrionário, gestações, implantações e bebês nascidos se equiparam aqueles de ciclos estimulados quando a IVM é realizada por clínicos experientes na punção de pequenos folículos antrais e por embriologistas hábeis na captura e maturação dos complexos cumulus-oócito (COCs) *in vitro*. O Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz (CPRHNF) dedicou-se ao estabelecimento da metodologia de IVM, tendo sido responsável pelo primeiro bebê nascido através dela na América Latina (Frantz et al., 2009). Atualmente o Centro apresenta resultados de gestações e nascimentos semelhantes aos serviços de referência que adotaram a metodologia como opção de tratamento em RA (Son et al., 2008; Zaho et al., 2009; Bos-Mikich et al., 2010). Um dos motivos do emprego e das taxas de sucesso da IVM não serem maiores é a dificuldade em se obter condições endometriais ideais para a transferência embrionária. Nas pacientes com ciclos ovulatórios a fase proliferativa é encurtada, uma vez que o hCG é usualmente administrado entre o 6º e 8º dia do ciclo, antes do folículo líder atingir a dominância (diâmetro maior ou igual a 10 mm). Já nas pacientes amenorréicas, ou

seja, com ciclos oligoanovulatórios, freqüentemente o endométrio apresenta espessura e características histoquímicas insuficientes e/ou inadequadas. Uma vez que em muitos dos ciclos de IVM, o endométrio se apresenta desfavorável à implantação, a criopreservação pela técnica de vitrificação visando uma transferência futura, em ciclo natural ou preparado com estradiol, constitui uma boa alternativa. Dentre as metodologias de criopreservação, a vitrificação é uma tecnologia que se estabeleceu nos últimos anos em muitos centros de RA como a primeira opção para o armazenamento de embriões excedentes em ciclos clássicos. Outra crescente indicação tem sido a preservação de oócitos com a finalidade de tentar preservar a fertilidade, seja em pacientes oncológicas, seja por motivos sociais objetivando postergar a maternidade. Nos casos de IVM, a vitrificação também encontrou um nicho de grande importância quando o endométrio da paciente não se apresenta adequado para a transferência embrionária, aumentando significativamente as taxas de gestações e bebês nascidos após a transferência em um ciclo natural ou preparado (DE Vos et al., 2011).

DESCRIÇÃO DO CASO

Paciente PWM, 34 anos, procurou atendimento por infertilidade primária de causa anovulatória devido à síndrome dos ovários policísticos. Após insucessos em tentativas de indução da ovulação para coito programado com citrato de clomifeno foi sugerido ciclo de fertilização *in vitro* (FIV). Diante de uma excessiva massa folicular, representada pelos altos níveis plasmáticos do hormônio anti-Mülleriano (AMH: 27,3 ng/ml) e pela elevada contagem de folículos antrais à ultrassonografia (aproximadamente 90 folículos com diâmetro entre 2 e 9 mm) foi oferecida a opção de FIV pela metodologia da IVM, visando assim erradicar por completo o risco de uma possível complicação pela Síndrome de Hiperestimulação Ovariana. No 14º dia após sangramento de privação pelo uso de medroxiprogesterona via oral foi administrada injeção subcutânea de 250µg de alfacorionadotropina (Ovidrel® Merck Serono). A punção dos folículos ovarianos não estimulados foi realizada 36 horas após, com uma agulha de 17 Gauge e pressão de aspiração de 80-90 mmHg. Foram coletados e encaminhados à maturação *in vitro* 27 complexos cumulus-oócitos. Após cerca de 30 horas de cultivo, os COCs foram desnudados, sendo que 24 dos oócitos neles contidos atingiram MII. Com a inseminação por IMSI (ICSI amplificada ou com alta-magnificação) foram obtidos 15 zigotos, dos quais 10 se desenvolveram e apresentaram no mínimo 6 células no terceiro dia pós-fertilização. Diante de espessura endometrial desfavorável à transferência embrionária (3 mm), três embriões de 7-8 células e 1 mórula inicial foram vitrificados. Em um ciclo menstrual posterior, o endométrio da paciente foi preparado com doses diárias de 6 mg de estradiol via oral (Estrofem® Medley) e, após 13 dias de medicação, obteve-se endométrio com 7 mm de espessura e aspecto trilíneo. Associou-se então a progeste-

rona natural micronizada (Utrogestan® Besins Healthcare) via vaginal na dose de 800mg diários. Três dias após o início da progesterona os quatro embriões foram reaquecidos e dois destes, que apresentaram as melhores características morfológicas, foram selecionados e transferidos. Passados 12 dias da transferência, o exame de β -hCG plasmático quantitativo foi de 49,85 mUI/ml. Ultrassonografia transvaginal realizada na 4ª semana pós-transferência demonstrou a presença de saco gestacional único e bem posicionado, não sendo, no entanto, verificado o esperado desenvolvimento embrionário.

DISCUSSÃO

O relato deste primeiro caso de gestação pós-transferência de embriões desvitrificados obtidos após IVM demonstra a adequação da combinação destas metodologias quando o endométrio da paciente submetida à IVM não está adequado à transferência a fresco. A escolha por esta estratégia de tratamento foi corroborada pelo recente estudo de De Vos e colegas (2011) com um número significativo de pacientes (39), no qual os autores demonstraram pela primeira vez que, em tratamentos de IVM onde não é utilizado o hCG anteriormente à coleta dos COCs, a transferência de embriões vitrificados e reaquecidos leva a uma taxa global de sucesso em termos de gestações, maior do que aquela alcançada com a transferência de embriões frescos. Outro aspecto relevante que merece menção nesta descrição de caso é o fato da possibilidade de aplicar esta combinação de procedimentos, IVM e vitrificação, como uma alternativa viável e prática para a preservação da fertilidade de pacientes oncológicas. (Shalon et al., 2010). Por não exigir estimulação ovariana, a IVM permite a coleta de oócitos de folículos em desenvolvimento e sua maturação *in vitro* em qualquer momento do ciclo menstrual. A vitrificação é apontada como a metodologia com melhor prognóstico para criopreservar os óvulos e armazená-los até o momento adequado, quando a paciente estiver livre da condição e apta a passar por uma gravidez. A falha no progresso da gestação deste caso pode ser devida a diferentes fatores, associados ou não à tecnologia da IVM ou da vitrificação. Sabe-se, por exemplo, que a maturação *in vitro* leva a uma potencial perda da competência de desenvolvimento por parte do oócito maturado *ex-vivo*, a menos que ele seja coletado o mais próximo possível da complementação de sua fase de crescimento pré-ovulatório *in vivo*. A importância desta etapa no potencial de desenvolvimento do oócito foi bem demonstrada pelo estudo de Son et al., (2008) . Conforme reportado pelo nosso grupo, bem como por outros que se dedicam ao método, a seleção embrionária no caso da IVM é de

fundamental importância, visto que as taxas de fertilização e desenvolvimento inicial são equiparáveis àquelas dos ciclos clássicos. Sem um critério mais rigoroso que a morfologia embrionária, como a precocidade do embrião, as chances de implantação e gestação podem ser altamente comprometidas e o índices de sucesso global da IVM bastante desanimadoras. Por fim, cabe mencionar que a maioria da pesquisa envolvendo a metodologia da IVM se concentra na melhora dos meios de cultivo, ficando a questão da adequação do endométrio sem a devida atenção. Mais pesquisas são necessárias para podermos entender e controlar os mecanismos fisiológicos e moleculares que atuam de forma complementar entre a maturação *in vitro* e o crescimento endometrial, na ausência do desenvolvimento folicular a termo. Em conclusão, apesar de esta gestação ter se interrompido, o seu relato corrobora recentes referências internacionais que indicam a vitrificação de embriões obtidos por IVM como uma alternativa adequada e válida para contornar a insuficiente proliferação endometrial, uma das limitações em ciclos não estimulados. Assim, este caso contribui para um maior entendimento e utilização da combinação de IVM e vitrificação em ciclos de RA humana, de forma a aumentar as taxas de sucesso para esta modalidade de tratamento de infertilidade.

Correspondência:

Adriana Bos-Mikich

Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde –ICBS –Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Av. Sarmento Leite, nº 500, Porto Alegre (RS), Brasil.

Adriana.bosmikich@gmail.com

Tel: 55-51-33083631

Fax: 55-51-33083146

REFERÊNCIAS

1. Bos-Mikich A, Ferreira F, Höher M, Frantz G, Oliveira N, Dutra CG, Frantz N. Fertilization outcome, embryo development and birth after unstimulated IVM. JARG 2011 28: 107-109.
2. De Vos M, Ortega-Hrepich C, Albus FK, Guzman L, Polyzos NP, Smitz J, Devroey P. Clinical outcome of non-hCG-primed oocyte in vitro maturation treatment in patients with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility_ Vol. 96, No. 4, October 2011:860-864.
3. Son W-Y, Chung Lee S, Lim J-H. Comparison of in-vitro maturation cycles with and without in vivo matured oocytes retrieved. RBM Online. 2008;17:59-67.
4. Zhao J-Z, Zhou W, Zhang W, Ge HS, Huang XF, Lin JJ. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2009;91:2568-71.

Live birth of a healthy baby from slow-freezing cryopreserved pronuclear stage embryos warmed using a standard devitrification protocol: Case report

Renata F. Erberelli¹, Renato M. Salgado¹, Francisco J. Lopes²; Carlos G. Almodin^{3,*}, Paula M. Almodin³, and Philip Wolff^{1,2,4}

¹ Genics – Reproductive Medicine and Genomics – 04063-000 – São Paulo, Brazil

² Clinimater – Human Reproduction – 11045-301 – Santos, Brazil

³ Materbaby – Human Reproduction – 87.013-230 – Maringá, Brazil

⁴ Invitrogenese – Development Biology and Assisted Reproduction – 04063-000 – São Paulo, Brazil

Running Title: Live birth from devitrified slow-frozen embryos

ABSTRACT

This paper reports on the birth of a healthy child after the transfer of pronuclear stage embryos cryopreserved through slow-freezing method, stored for nine years, and warmed through a standard devitrification protocol. Surviving embryos were transferred to a 45-year-old patient, resulting in clinical pregnancy and the birth of a live child. This case report demonstrated that long-term-stored pronuclear stage embryos cryopreserved through the slow-freezing method may successfully present cleavage, implantation and developmental viability after being warmed using a standard devitrification protocol.

Keywords: Case report; Cryopreservation; Devitrification; Slow-freezing.

INTRODUCTION

Recently, a new ultra-rapid cryopreservation technique, known as vitrification, has emerged as a more effective alternative to more traditional methods used in the preservation of human oocytes and embryos (Liebermann et al., 2002; Stehlik et al., 2005; Vatja et al. 2006; Stachecki, 2008; Almodin et al, 2010). Thus, there has been an increasing trend for the use of vitrification in cryopreservation processes in replacement to slow-freezing methods (Al-Hasani et al., 2007; Saragusty et al., 2011; de Moraes et al., 2009). Due to this shift towards vitrification, companies that produce media used in the cryopreservation of human cells are losing interest in producing solutions for slow-freezing protocols. As a result, it is possible that, in the near future, warming kits for the slow-freezing method may disappear from the market altogether. Besides, not only the technique, but also the type and the concentrations of cryoprotectants used in vitrification are totally different from those used in the slow-freezing methods (Rall et al.; 1985; Park et al., 2000). These have raised some concern in many human reproduction centers all over the world on how to warm human cells that have been cryopreserved through the slow-freezing method and been kept stored for long periods of time.

This paper reports on the birth of a healthy child after the transfer of long-term-stored pronuclear stage

embryos cryopreserved through the slow-freezing method, stored for nine years, and warmed through a standard devitrification protocol.

CASE REPORT

Patient consent

Before a new embryo transfer attempt was performed, both the patient and her husband were fully informed on the circumstances involving the procedure, and consented to having their embryos warmed through the standard devitrification procedure.

Slow-freezing cryopreservation

A 36-year-old patient began infertility treatment in 2003 due to male factor. The stimulation cycle was initiated with 300 UI/day of GnRH analog (Synarel – Zodiac, São Paulo, Brazil) during 21 days, followed by 150 UI of hMG (Merional – Mezler, São Paulo, Brazil). Serial transvaginal ultrasound was performed to monitor and control follicular growth and endometrial thickness. Recombinant hCG (Ovidrel – Merk, São Paulo, Brazil) was administered on the night of the eleventh day of the cycle, followed by transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval 35 to 36 hours later. After oocyte aspiration, cumulus cells were removed from all oocytes and twelve mature metaphase II (MII) oocytes were selected out of twenty three. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed in all twelve MII oocytes, and after 16h in controlled culture (37°C and 6% CO₂ atmosphere), they were checked for fertilization.

Two pro-nuclei were observed in 10 out of the 12 injected oocytes. Six pronuclear stage embryos were cryopreserved while four embryos were kept in culture until day 3, when they were loaded into a Sydney IVF embryo transfer catheter (Cook IVF – Brisbane, Australia), and transferred into the uterine lumen under trans-abdominal ultrasound guidance. β -hCG serum levels were measured 12 days after embryo transfer to determine biochemical pregnancy. Transvaginal ultrasound was performed at 6 weeks of gestation to confirm clinical pregnancy, which consisted of two gestational sacs and one heartbeat. The result was the birth of a healthy boy.

The exceeding embryos were cryopreserved through a slow-freezing method using FREEZE-KIT™ (Vitrolife – San Diego, USA), which consists of three solutions: Cryo-PBS (phosphate-buffered saline), EFS 1 (1.5M 1,2-propanediol) and EFS 2 (1.5M 1,2-propanediol and 0.1M Sucrose). Embryos were washed for 5 minutes in Cryo-PBS, incubated for 20 minutes in EFS 1 and washed quickly in EFS 2. They were then loaded into straws (two per straw), which were sealed and placed in a programmable freezer. The temperature was programmed to decrease to -70°C at 20°C/min rate, held at -70°C to allow manual seeding, and subsequently dropped to -300°C at 0.30°C/min rate. Samples were then plunged into liquid nitrogen for storage until warming.

WARMING

In January 2012, the couple returned to the clinic to try to achieve a new pregnancy using the embryos that had been kept stored in liquid nitrogen for the past nine years. The patient, now 45 years old, had her endometrium prepared for ET through the administration of estradiol valerate (2mg/day), during 16 consecutive days, until the endometrial lining reached 10 mm. The vitrification-warming system developed by Ingamed (Maringá, Brazil) was used in this case (Vitrifingá-Kit®). The warming kit is constituted of three solutions: DV-I (warming), DV-II (diluent) and DV-III (rinsing). Their chemical composition is based on different concentrations of sucrose (Almodin et al., 2010).

The straws containing the embryos were removed from LN2 and left at room temperature for 30 seconds and then incubated in water bath at 37°C for 30 seconds. After the straws were wiped with sterile gauze, both ends were opened, the contents expelled in a petri dish and analyzed under a stereomicroscope. Embryos were collected and incubated in DV-I for 1 min at 37°C, and subsequently moved to DV-II, in which they were incubated for 3 min. Finally, the embryos were washed in DV-III twice for 5 min each, and then moved into pre-equilibrated G-1™ Plus medium (Vitrolife – San Diego, USA) at 37°C, with a survival rate of 75%.

The zygotes were kept in culture for 24 hours and three embryos were transferred to the uterus on day 2, each one grade A with four cells (symmetric blastomeres with no fragmentation). β -hCG serum levels were measured 12 days after embryo transfer to determine biochemical pregnancy. Luteal phase was supported by 600 mg of intravaginal progesterone per day until 12 weeks of gestation. Transvaginal ultrasound was performed at 6 weeks of gestation to confirm clinical pregnancy, which consisted of a gestational sac and one heartbeat. Nine months later the result was the live birth of a healthy baby boy.

DISCUSSION

This case report is interesting as it reports on an IVF live birth of a healthy boy resulting from the transfer of pronuclear stage embryos cryopreserved through a slow-freezing method, stored for nine years, and warmed using a standard devitrification protocol. Several studies have been performed in order to minimize cryostorage duration and the risk of intracellular ice crystal formation, and thus optimizing embryo survival (Trad et al., 1999). The development of well-established ultra-rapid protocols (vitrification) was a practical solution to the matter (Liebermann et al., 2002). Vitrification is a cryopreservation strategy

in which the water remaining inside and around the cells is converted into an amorphous crystal-free solid resembling glass (Vatja et al., 2006). This is achieved by the combination of high concentrations of cryoprotectants and ultra-rapid cooling (Almodin et al., 2010). The fact that there is no ice-crystal formation, which is one of the main problems found with more traditional cryopreservation techniques, has made vitrification a very attractive technique.

Although there is no ice crystal formation during the vitrification process, this may take place during warming. Seki and Mazur (2009) demonstrated that samples of mouse oocytes submitted to the vitrification procedure, when warmed at high rates had a survival rate higher than 80%. However, when samples were warmed at low rates survival was close to 0%, regardless the freezing rate used. They interpreted the lethality of slow warming as a consequence of allowing the growth of small intracellular ice crystals.

According to Mishima and Stanley (1998) three phenomena occur during warming: i) the conversion of amorphous ice into ultra-viscous water; ii) devitrification, which is the conversion of ultra-viscous water into clear ice; and iii) by increasing the temperature, ice goes through a third phenomenon, recrystallization. Hence, warming is also a critical process due to the occurrence of crystallization and recrystallization. Two factors are important in this process, warming rates and the concentration of solutes. Rapid warming is essential to minimize both the formation of intracellular ice crystals and their growth to lethal size by recrystallization (Seki et al., 2008). Therefore, with both the slow-freezing as well as vitrification protocols the formation of ice crystals during warming is possible, a problem that may be avoided by high warming rates. This is the reason why the straws removed from liquid nitrogen were submitted to a water bath at 37°C before being added to the DV- I solution, as normally performed in the devitrification process.

The events that follow are the exit of cryoprotectants from the cell, as well as its rehydration. High sucrose levels are needed during warming to diminish the harmful effects of permeable cryoprotectants, by reducing osmotic stress and controlling cell water influx (Fabbri et al., 2000), and thus reducing the time of exposure of cells to the toxic cryoprotective agents. In general, the solutions used in slow-freezing methods are composed of 10% (1-2M) of permeable cryoprotectants, whereas the solutions used in vitrification protocols contain 30% (5-8M) (Shaw et al., 2003). As the concentration of cryoprotectants used in vitrification is much higher than that used in the slow-freezing method, it is fair to infer that the warming protocol used in vitrification has been standardized in such a way as to avoid cell osmotic shock even more than in the slow-freezing protocol. Thus the warming protocol used in vitrification could be safely used for the warming of cells cryopreserved with the slow-freezing protocol, a concept that has been fully demonstrated by this report.

This case report, therefore, demonstrated that long-term-stored pronuclear stage embryos cryopreserved through the slow-freezing method may successfully present cleavage, implantation and developmental viability after being warmed using a standard devitrification protocol. Prospective randomized comparative studies should be carried out to certify the viability and safety of devitrification of embryos cryopreserved with the slow-freezing methods.

AUTHORS' ROLES

RFE, RMS and PW were responsible for embryo warming and culture. FJL was responsible for embryo transfer and luteal phase support. RFE, and PMA were responsible for drafting the article, and CGA for revising the article critically for important intellectual content. CGA and PW were responsible for the final approval of the version to be published.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr. Antonio Carlos Correa for his contribution in revising the English version of the manuscript.

FUNDING

No specific funding was obtained for this study

CONFLICT OF INTEREST

None declared

* Corresponding Author:

Carlos Gilberto Almodin, MD, MSc, PhD
 Av. XV de Novembro, 1232
 87.013-230 - Maringá – PR - Brazil
 Phone: (55 44) 3224-3992
 Fax: (55 44) 225-1162
 E-mail: almodin@materbaby.com.br

REFERENCES

1. Al-Hasani S, Ozmen B, Koutlaki N, Schoepper B, Diedrick K, Schultze-Mosgau A. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod Biomed Online* 2007;14:288-293.
2. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Paixão CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 2010; 25: 1192-1198.
3. de Moraes LAM, de Aguiar LPT, Lamaita RM, Marinho RM, Caetano JPJ. Comparação de resultados obtidos com uma nova técnica de vitrificação de blastocistos e com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro

dias de cultivo. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2009;13:16-20.

4. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1-2):39-42.
5. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;67:1671-80.
6. Mishima O, Stanley HE. The relationship between liquid, supercooled, and glassy water. *Nature* 1998; 396:329-35.
7. Park SP, et al. Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod* 2000;15:1787-90.
8. Rall WF, Fahy GM. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313(6003):573-5.
9. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 2011;141:1-19.
10. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:583-605.
11. Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, et al. A new safe, simple, and successful Vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2008; 7:360-7.
12. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009;59:75-82.
13. Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biology of Reproduction* 2008;79:727-37.
14. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer K, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005;11:53-7.
15. Trad FS; Toner M; Biggers JD. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of human oocytes. *Hum Reprod* 1999;14:1596-7.
16. Vajta G; Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12:779-96.

2012**FEVEREIRO****04 de fevereiro**

Simpósio: Avanços na Medicina Reprodutiva - Interações da clínica com o laboratório
Local: Hotel Windsor Barra - Rio de Janeiro - RJ
Apoio: SGORJ E SBRA
e-mail: ginecologista@cmb.com.br

ABRIL**11 a 14 de abril**

V Congresso Mineiro de Ginecologia e Obstetrícia/ XVII Congresso de Ginecologia e Obstetrícia da Região Sudeste/ III Colpominas
Realização: SOGIMIG
Local: Centro de Convenções Expominas - Belo Horizonte/MG
Informações e inscrições:
(31) 3291-9899
www.cmgo2012.com.br

21 a 24 de abril

ASA 37th Annual Meeting - American Society of Andrology
Hilton Tucson El Conquistador / Tucson, Arizona
www.asa.org

MAIO**17 a 20 de maio**

The 2nd International Congress on Cardiac Problems in Pregnancy (CPP 2012)
Local: Berlin - Germany
www.cppcongress.com

23 a 25 de maio

38º Congresso Pernambucano de Ginecologia e Obstetrícia
Local: Centro de Convenções - Olinda - PE
Realização: SOGOPE
secretaria@sogope.com.br
http://www.sogope.com.br

24 a 26 de maio

VII Congresso Brasileiro de Climatério e Menopausa
Realização: SOBRAC - Associação Brasileira de Climatério
Local: São Paulo - SP (Centro de Convenções Frei Caneca)
www.menopausa.org.br

30 de maio a 01 de junho

19º Congresso Espírito Santense de Ginecologia e Obstetrícia
Realização: SOGOES
www.sogoes.com.br

JUNHO**07 a 09 de junho**

XXXVI Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do Rio de Janeiro
Local: Centro de Convenções Sulamérica - Av. Paulo de Frontin, 1 - Cidade Nova - RJ
Realização: SGORJ
sgorj@sgorj.org.br

13 a 16 de junho

I Congresso Goiano de Ginecologia e Obstetrícia
22º Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do Brasil Central da FEBRASGO
IV Congresso Internacional de Ginecologia e Obstetrícia de Goiás
37ª Jornada Goiana de Ginecologia e Obstetrícia
Local: Centro de Convenções de Goiânia - Goiás
ginecologia@sogo.com.br

27 a 29 de junho

45º Congresso de Ginecologia e obstetrícia do Distrito Federal,
6º Congresso Internacional de Ginecologia e Obstetrícia do DF e 1º Congresso Internacional de Controvérsias em Ginecologia e Obstetrícia do DF
Local: Centro de Convenções Ulysses Guimarães - Brasília - DF
www.sgob.com.br

28 a 30 de junho

XII Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia da Infância e Adolescência
Local: Maksoud Plaza Hotel, em São Paulo, SP
http://www.sogorn.com.br

JULHO**1 a 4 de julho**

28th Annual Meeting - ESHRE 2012 - Istanbul, Turkey.
European Society of Human Reproduction and Embryology
www.eshre.org

18 a 21 de julho

11º Congresso Brasileiro de Videocirurgia
Local: Windsor Barra Hotel - Rio de Janeiro - RJ
e-mail: congresso@sobracil.org.br
www.sobracil.org.br/congresso

26 a 28 de julho

XI Congresso Sul Brasileiro de Urologia
Hotel Infinity Blue - Recanto das Águas na cidade de Balneário Camboriú - SC.
www.praxis.srv.br

AGOSTO**15 a 18 de agosto de 2012**

XXII Congresso Brasileiro de Citopatologia
Local: Mar Hotel - Recife - PE
http://www.xxiicbc2012.com.br/

22 a 25 de agosto

XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida Sofitel Jequitimar Guarujá
http://www.sbra2012.com.br/

SETEMBRO**14 a 17 de setembro**

63rd Annual Meeting of the German Society of Urology (DGU)
Hamburg - Germany
Organisation: INTERPLAN
E-mail: 2011@dgu.de
Website: www.dgu-kongress.de/index.php?id=571

OUTUBRO**7 a 12 de outubro**

XX FIGO WORLD CONGRESS OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS
http://www.figo2012.org/fellowship/

10 a 14 de outubro

XIV Simpósio Brasileiro de Patologia do Trato Genital Inferior e Colposcopia e V COLPOVIX
Local: Centro de Convenções de Vitória - ES
Realização: SOGOES
http://www.sogoes.com.br

26 a 26 de outubro

84th Congress of the SIU - Rome - Italy
E-mail: info@siu.it
Website: www.siu.it

25 a 27 de outubro

19º Congresso Baiano de Obstetrícia e Ginecologia
Local: Bahia Pestana Hotel
Realização: SOGIBA
http://www.sogiba.com.br/

28 a 31 de outubro

XVI Congresso Sul-Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia
I Jornada Sul-Brasileira de Mastologia
Costão do Santinho
Resort - Florianópolis

Menopur® (menotropina - LH 75 U.I. + FSH 75 U.I.).

USO ADULTO. INDICAÇÕES Mulheres: Esterilidade com insuficiência ovariana hipo – ou normogonadotrófica: estimulação do crescimento folicular, incluindo mulheres com síndrome de ovário policístico que não responderam ao tratamento com citrato de clomifeno. **Homens:** Esterilidade com hipogonadismo hipo – ou normogonadotrófico: em combinação com HCG, para estimular a espermatogênese. **CONTRAINDICAÇÕES Em Mulheres:** tumores na glândula pituitária ou no hipotálamo e no útero, ovários e mamas; gravidez e lactação; sangramento ginecológico de etiologia desconhecida; hipersensibilidade aos componentes da fórmula. aumento dos ovários ou cistos que não tenham sido causados por síndrome de ovário policístico; níveis altos de LH e FSH indicando uma insuficiência ovariana primária. Menopur® não deve ser administrado nos casos de: falência primária ovariana; má-formação de órgãos sexuais incompatíveis com a gravidez; tumor fibroide do útero incompatível com a gravidez. **Em Homens:** câncer de próstata; tumores no testículo. As seguintes condições devem ser tratadas antes do início da terapia: disfunções da glândula tireoide e do córtex da glândula supra-renal; hiperprolactinemia; tumores na glândula pituitária ou no diencéfalo (hipotálamo). **CUIDADOS E ADVERTÊNCIAS** Não deve ser utilizado para induzir a ovulação em mulheres cujos ovários foram involuntariamente hiperestimulados. A terapia requer monitorização da resposta ovariana verificada apenas pela ultrassonografia ou em combinação com a mensuração do nível de estradiol sanguíneo. Alguns pacientes podem apresentar baixa resposta. Pacientes que estão sob estímulo do crescimento folicular para técnicas de reprodução assistida podem apresentar aumento ovariano ou desenvolver hiperestimulação. **Uso em idosos e crianças** Menopur® é um medicamento de uso adulto. **Gravidez e Lactação** Menopur® não deve ser utilizado por mulheres grávidas ou lactentes. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS** O uso concomitante de Menopur® com o citrato de clomifeno pode aumentar a resposta folicular. Quando for utilizado um agonista de GnRH, uma dose mais alta de Menopur® deve ser necessária para atingir uma resposta folicular adequada. **REAÇÕES ADVERSAS** dores abdominais, náusea, aumento do abdômen, dor e reação no local da injeção, cefaleia, hiperestimulação dos ovários, dor pélvica, febre, ascite, hidrotórax, oligúria, hipotensão e fenômenos tromboembólicos. Em casos muito raros, pode causar a formação de anticorpos tornando o tratamento ineficaz. **POSOLOGIA** Para indução do crescimento folicular em procedimentos de baixa complexidade (coito programado e inseminação intrauterina) em mulheres normo ou hipogonadotróficas a dose depende da reação ovariana, a qual deve ser definida através de exames ultrassonográficos dos ovários e mensuração dos níveis de estradiol. Se a dosagem de Menopur® for muito alta, podem ocorrer crescimentos foliculares uni e bilaterais múltiplos. Em geral, a terapia é iniciada dentro dos 7 primeiros dias do ciclo menstrual com uma dosagem inicial diária correspondente a 75 - 150 U.I. de FSH. Se os ovários não respondem, a dosagem pode ser gradativamente aumentada até surgirem evidências de aumento da secreção de estradiol e de crescimento folicular. O ajuste na dose não deve ser feito em frequência maior que 7 dias. O tratamento com a mesma dosagem de Menopur® é continuado até atingir-se um nível sérico de estradiol pré-ovulatório. Se o nível aumentar muito rapidamente, a dosagem deve ser reduzida. A dose máxima diária não deve ultrapassar 225 U.I. Caso a paciente não responda após 4 semanas de tratamento, o tratamento deve ser reiniciado com uma dosagem inicial maior do que a do ciclo anterior. Para induzir a ovulação, após uma resposta ótima do tratamento com Menopur®, utiliza-se 5.000 ou 10.000 U.I. de HCG injetado por via intramuscular, 1 dia após a última administração de Menopur®. **Importante:** recomenda-se que a paciente tenha relação sexual no dia e no dia seguinte da administração do HCG. Como alternativa, a inseminação intrauterina pode ser realizada. **OBSERVAÇÃO:** Após a administração de uma dose muito alta de Menopur®, a administração subsequente de HCG pode causar uma hiperestimulação involuntária dos ovários. Neste caso, o tratamento deve ser interrompido tanto com Menopur® ou com HCG e a paciente deverá utilizar um método anticoncepcional ou evitar relações sexuais até o início da próxima menstruação. A dosagem de Menopur® em programas de fertilização assistida (FIV/ICS) pode variar de pessoa para pessoa. De um modo geral recomendam-se os seguintes esquemas posológicos: Quando for utilizado agonista de GnRH em depósito, a terapia com Menopur® deve ser iniciada aproximadamente 2 semanas após o início do tratamento com o agonista. A dose inicial recomendada de Menopur® é 150 – 225 U.I. por, pelo menos, 5 dias iniciais do tratamento. Baseado na monitorização clínica (ultrassonografia do ovário em combinação ou não com a mensuração do nível de estradiol sanguíneo) as doses subsequentes devem ser ajustadas de acordo com a resposta individual e não devem exceder a quantidade de 150 U.I. por ajuste. A dosagem máxima diária não deve exceder 450 U.I. por dia e na maioria dos casos não é recomendada a utilização acima de 20 dias. Caso não seja utilizado o agonista de GnRH, a terapia com Menopur® deve ser iniciada no 2º ou 3º dia do ciclo menstrual. É recomendada a utilização de esquemas de variação de doses acima citadas. Quando um número adequado de folículos atingir um tamanho apropriado, uma única injeção de 10.000 U.I. de HCG deve ser administrada para induzir a maturação folicular final, na preparação da aspiração de óocitos. As pacientes devem ser cuidadosamente monitoradas por, pelo menos, 2 semanas após a administração de HCG. Caso seja obtida uma resposta em excesso de Menopur®, deve-se interromper o tratamento e descontinuar o uso de HCG e as pacientes devem utilizar um método contraceptivo de barreira (por exemplo: camisinha) ou evitar relações sexuais até iniciar-se a próxima menstruação. **No Homem:** Inicialmente, 1.000 – 3.000 U.I. de HCG são administrados 3 vezes por semana, até atingir-se um nível sérico de testosterona normal. Então, 75 - 150 U.I. de Menopur® são administradas 3 vezes por semana, por alguns meses e de acordo com o critério médico. Orientar a/o paciente quanto ao protocolo de uso, para que não haja comprometimento do sucesso terapêutico. **Venda sob prescrição médica.** Material de uso exclusivo à classe médica. A persistirem os sintomas, o médico deverá ser consultado. Reg. MS: 1.2876.0011 Farm. Resp.: Helena Satié Komatsu - CRF/SP: 19.714 - Laboratórios Ferring Ltda. Praça São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo – SP / CNPJ: 74.232.034/0001-48 / SAC: 0800 772 4656.

Contraindicação: Para mulheres com tumores no útero, nos ovários e nas mamas. **Interações medicamentosas:** O uso concomitante com o citrato de clomifeno pode aumentar a resposta folicular.

Referências: **1** Ziebe, S. *et al.* Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patient undergoing IVF. *Human Reproduction*, 22(9): 2404-2413, 2007. **2** Weghofer, A. the impact of LH-containing gonadotropin on ploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. *Human Reproduction*, 23(3): 499-503, 2008. **3** Al-Inany HG, *et al.* Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis. *Reprod Biomed OnLine*. 16:81-88, 2008. **4** Coomarasamy, A. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(2): 310-315, 2008. **5** Wely, V. *et al.* Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev*. 16(2):CD005354. Review, 2011. **6** Al-Inany HG. *et al.* Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. *Gynecol Endocrinol*. 25(6):372-8, 2009. **7** Platteau P. *et al.* Highly purified hMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles. *Reprod Biomed Online* 17(2):190-8, 2008. **8** Andersen, AN. *et al.* Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. *Human Reproduction*, 21(12): 3217-3227, 2006. **9** Bosch, E. *et al.* Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists - a randomized study. *Human Reproduction*, 23(10): 2346-2351, 2008. **10** Jee BC. *et al.* Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis. *Gynecol Obstet Invest.*, 70(2):132-7, 2010.



Laboratórios Ferring - Brasil
Pça. São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo - Brasil
PABX - 55 11 3024.7500




MEN AN 112 Maio 2012

CONTRIBUINDO PARA MELHORES RESULTADOS¹⁻⁷



O TRATAMENTO COM MENOPUR® PROMOVE:

 Maior proporção de embriões de alta qualidade quando comparado ao rFSH^{1,2}

 Menores níveis de progesterona ao final da estimulação vs. rFSH, o que pode resultar em melhor receptividade endometrial para a implantação do embrião^{8,9}

 Taxas de gravidez em curso e de nascidos vivos significativamente maiores comparado com rFSH^{3-7,10}



 FALEFERRING
0800 772 4656

Laboratórios Ferring - Brasil
Pça. São Marcos, 624 - 05455-050 - São Paulo - Brasil
PABX - 55 11 3024.7500

FERRING
PHARMACEUTICALS