

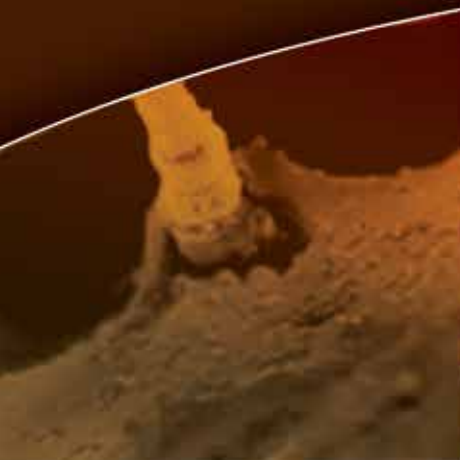
Volume 16  
Number 5  
Sep-Oct 2012  
ISSN 1517-5693

# JBRA

## Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lemnart Nilsson "Images of Life"

*Veja a  
obra de arte  
que fizemos  
juntos.*



*Fertilidade.*

*Você. Nós. Somos os pais da fertilidade*

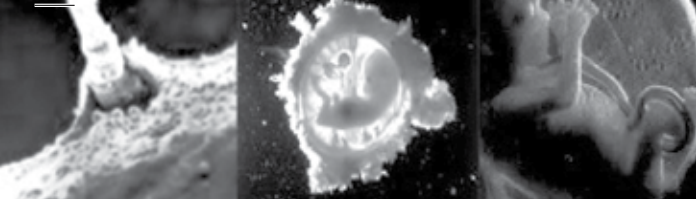
**Merck Serono**

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 | nº5 | Sep-Oct / 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: [journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@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](mailto:alamtec@br.inter.net)  
[www.alamtec.com.br](http://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 (OHSW 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 País 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 Equador)

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<sup>1,2</sup>



**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](http://www.sbra.com.br)) e da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida ([www.redlara.com](http://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](http://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 gestões 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](http://www.actr.org.au), [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org), [www.umin.ac.jp/ctr/index/htm](http://www.umin.ac.jp/ctr/index/htm) e [www.trialregister.nl](http://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 ([journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@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](http://www.sbra.com.br)) and the Latin America Network of Assisted Reproduction ([www.redlara.com](http://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](http://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](http://www.actr.org.au), [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org), [www.umin.ac.jp/ctr/index/htm](http://www.umin.ac.jp/ctr/index/htm) and [www.trialregister.nl](http://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](mailto: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](http://www.sbra.com.br)) y de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida ([www.redlara.com](http://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](http://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](http://www.actr.org.au), [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org), [www.umin.ac.jp/ctr/index/htm](http://www.umin.ac.jp/ctr/index/htm) y [www.trialregister.nl](http://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 ([journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@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

### To the Community of JBRA New directions for publications in Latin America

Maria do Carmo Borges de Souza, Paulo F. Taitson .....267

## Artigo Original

### Diagnóstico preimplantatório en biopsia de blastocisto y transferencia en ciclo diferido

Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Neuspiller S, Gismondi FL, Neuspiller N. ....268

### Avaliação da qualidade seminal em adultos após o uso de spirulina platensis e resveratrol

Franciele Bona Verzeletti; Rodrigo Sell Poletto; Telma Elita Bertolin; Fernando Fornari .....271

### The fate of stored human embryos 5 years after approval of embryo stem cell research in Brazil

Renata Bossi ; Alfredo Góes ; Marcos Sampaio ; Selmo Geber .....278

## Artigo de Revisão

### Técnicas de reprodução assistida – revisão histórica

Jalsi Tacon Arruda; Mônica Canêdo Silva Maia; Tatiana Moreira Silva; Mário Silva Approbato .....282

## Relato de Caso

### Vesícula germinativa recorrente, resistente à maturação in vitro: relato de caso

Nícolas Thiago Nunes Cayres de Souza; Hitomi Miura Nakagava; Íris de Oliveira Cabral; David Barreira Gomes Sobrinho; Antônio César Paes Barbosa; Bruno Ramalho de Carvalho .....286

## Case Report

### PGD by aCGH and QF-PCR in a couple with recurring aneuploidies

Andressa G. Mondadori; Maria Eugenia Ducatelli; Judith Mincman; Alicia Gallo; Fabián Coco; Roberto Coco .....290

## Eventos

.....302

## To the Community of JBRA New directions for publications in Latin America

Many aspects have been discussed about scientific publications in our LA community and we are all committed to improving the quality, as well as the visibility of JBRA Assisted Reproduction.

In fact, at this very moment we are all invited to a specific Symposium of IFFS during 13 RED Congress in Panamá, next May 2-4, entitled "How to write a scientific paper", with Paul Devroye, Nicholas Polyzos and Johan Smitz.

A Latin American journal written in English does not mean that we are losing cultural identity. While we seek new indexes, with online possibilities, keeping the printed condition, we aim to have a wider spread of the papers published.

We will always keep a summary in Portuguese and Spanish, in addition to that of English. So, it was agreed that from 2013 we will give priority to publishing articles in English.

At the same time, when the authors belong to a center NETWORK, this will be highlighted in the publication.

We thank the President of SBRA, as well as the members present in the Assembly during the 16 th Brazilian Congress on Assisted Reproduction, in Guarujá, Sao Paulo, the availability of helping the editors by offering resources to reach this goal.

**Maria do Carmo Borges de Souza**

**Paulo F Taitson**

Editors

# Diagnóstico preimplantatorio en biopsia de blastocisto y transferencia en ciclo diferido.

Diagnóstico pré-implantatório em blastocisto: biópsia e transferência em ciclo diferido.

Preimplantation diagnosis in blastocyst biopsy and deferred transfer cycle.

Coco R, Mondadori A, Ducatelli ME, Mincman J, Gallo A, Coco F, Neuspiller S, Gismondi FL, Neuspiller N.

Fecunditas- Instituto Medicina Reproductiva- afiliado a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

## RESUMEN

**Objetivo:** Los adelantos en reprogenética han permitido el PGD en trofoectodermo equivalente al diagnóstico en villosidad coriónica. La mayor experiencia se tiene con biopsia en día+3. Si bien los resultados son satisfactorios tiene el inconveniente que el estudio se realiza en una o dos moléculas de ADN y si bien se acondicionan las técnicas para efectuar el estudio en células únicas, hasta en un 20% no se obtiene resultado. La biopsia en D+5 permite mayor número de células y la obtención de resultados.

**Material y método:** Se presenta la experiencia de 62 ciclos realizados en 43 pacientes con transferencia diferida al ciclo estimulado. Los motivos fueron: afecciones monogénicas (15), translocaciones recíprocas (6), tipificado HLA (5), RHD(1), aneuploidías recurrentes (5) y PGSS (2). De los 62 ciclos iniciados, 61 fueron aspirados. De los aspirados, 17 (28%) no llegaron a blastocisto. Cuarenta y cinco ciclos (72%) llegaron a blastocisto, 29 de ellos de buena calidad (grupo I) y 16 de regular o mala calidad (grupo II).

**Resultados:** Se lograron 12 embarazos de 26 transferencias hasta ahora efectuadas (46%), 11 en el grupo I (52%) y 1 en el II (20%). Los resultados hallados nos permitieron cambiar el anterior programa en D+3 y transferencia en fresco.

## SUMMARY

**Objective:** Advances in reprogenetics have allowed the equivalent blastocyst biopsy to chorionic villi. prenatal diagnosis. The major experience is with biopsy on day +3. While the results are satisfactory, the inconvenient is the study in only one or two cells, and no always the result is obtained. Biopsy in D +5 allows to remove more cells and the result almost is obtained.

**Material and methods:** We report our experience of 62 cycles performed in 43 patients with transfer after the stimulated cycle. The reasons were: monogenic disorders (15), reciprocal translocations (6), HLA typed (5), RHD (1), recurrent aneuploidy (5) and PGSS (2). Of the 62 cycles started, 61 were aspirated. Of the aspirates, 17 (28%) failed to reach blastocyst stage. Forty-five cycles (72%) reached blastocyst stage, 29 of them of good quality (group I) and 16 fair or poor quality (group II).

**Results:** Twelve pregnancies were achieved in 26 trans-

fers (46%), 11 in group I (52%) and 1 in group II (20%). The results obtained allowed us to change program in D +3 with fresh transfer by biopsy on D+5 and transfer in another cycle, unstimulated, with better results than previous program on day 3.

## RESUMO

**Objetivo:** Os avanços em reprogenética tem permitido que o PGD em trofoectodermo seja equivalente ao diagnóstico em vilosidade coriônica. A maior experiência se tem com a biopsiano dia+3. Embora os resultados sejam satisfatórios, tem o inconveniente de que o estudo se realiza em uma ou duas moléculas deDNA e nas técnicas para efetuar o estudo em células únicas, até em 20% não se obtém resultado. A biopsia no dii D+5 permite maior número de células e a obtenção de resultados.

**Material e método:** Apresenta-se a experiência de 62 ciclos realizados em 43 pacientes com transferência diferente ao ciclo estimulado. Os motivos foram: afecções monogênicas (15), translocações recíprocas (6), tipagem HLA (5), RHD(1), aneuploidias recorrentes (5) e PGSS (2). Dos 62 ciclos iniciados, 61 foram aspirados. Dos aspirados, 17 (28%) não chegaram a blastocisto. Quarenta e cinco ciclos (72%) chegaram a blastocisto, 29 dos quais de boa qualidade (grupo I) e 16 regulares ou ruins (grupo II).

**Resultados:** Obteve-se 12 gravidezes de 26 transferências efetuadas até agora (46%), 11 no grupo I (52%) e 1 no II (20%). Os resultados nos permitiram mudar o programa anterior de D+3 com transferência à fresco.

## INTRODUCTION

Los adelantos en reprogenética han hecho posible que el diagnóstico genético preimplantatorio (PGD) pueda realizarse en blastocisto y que la transferencia embrionaria se efectúe en ciclo diferido preparado fisiológicamente el endometrio con estrógenos y progesterona.

La mayor experiencia en PGD es con biopsia en día 3 en embriones clivados, siendo la tasa de embarazo alrededor del 20% y la certeza diagnóstica mayor del 90%. Si bien los resultados obtenidos pueden considerarse satisfactorios, el estudio genético en una sola molécula de ADN es un verdadero desafío no solo para el equipo médico, sino además para la pareja, ya que no siempre se puede obtener resultados de los análisis genéticos efec-



tados, fundamentalmente por la poca cantidad y calidad del ADN que se dispone cuando se usa una sola célula. La biopsia del trofoectodermo del blastocisto nos permite contar con más células para el estudio genético, lo que aseguraría arribar a un diagnóstico en la mayoría de los blastocistos estudiados. Como la mayoría de las células del trofoectodermo y macizo celular interno dan lugar a la placenta y vellosidades coriales se podría también decir que la biopsia de trofoectodermo equivale al diagnóstico prenatal efectuado en vellosidades coriales. Por lo tanto, la certeza diagnóstica esperada sería la misma que en vellosidad coriónica.

Pensando en la mejora de los resultados con esta nueva posibilidad tecnológica decidimos reemplazar la biopsia de blastómeras en día 3 por la biopsia de blastocisto en día 5 o 6 y la transferencia en fresco por la de blastocistos vitrificados-desvitrificados.

Se presenta el resultado obtenido en una serie de 62 ciclos de PGD perteneciente a 43 pacientes por biopsia de blastocisto y transferencia diferida.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Los motivos del PGD fueron por: mayor riesgo para enfermedades monogénicas ( $n=24$ ), translocaciones cromosómicas ( $n=6$ ), recurrencia de aneuploidías ( $n=5$ ), tipificado de HLA ( $n=5$ ), isoimmunización RHD ( $n=1$ ) y PGSS ( $n=2$ ). Las edades de las mujeres variaron entre 20 y 44 años.

Los PGDs por enfermedades monogénicas fueron: Fibrosis quística, beta talasemia, Síndrome de Hurler, Síndrome de Hunter, Hemofilia A, enfermedad de Huntington, Neurofibromatosis tipo 1, Poliquistosis renal dominante, Atrofia medular espinal, acidemia metilmalónica, Síndrome de Alport, Distrofia Miotónica, Poliquistosis renal recesiva, Deficiencia de la enzima Ornitin Transcarbamilasa y metabopatía mitocondrial. Los PGDs por translocaciones recíprocas: 46,XX,t(1;8), 46,XX,t(10;18), 46,XX,t(6;7), 46,XY,t(3;6), 45,XY,t(13;21) y 45,XX,t(15;21). Los PGDs para tipificado de HLA correspondieron a dos casos por leucemia mieloide crónica, uno a granulomatosa crónica, uno a talasemia, y otro a síndrome de Hurler.

Los PGDs génicos fueron abordados por minisequenciación de la mutación causante del trastorno monogénico, excepto la poliquistosis renal dominante que fue por ligamiento. Los PGDs para tipificado de HLA se realizaron con STRs informativos ligados al HLA. El PGD por isoimmunización RHD se realizó con STRs ligados al gen RHD. Los PGDs por translocaciones fueron realizados por hibridación genómica comparada (aCGH 24 sure plus de Bluegenome®). Los PGDs por recurrencia de aneuploidías y sexado social por aCGH 24 Sure V3 de Bluegenome®. En todos los estudios por trastornos monogénicos, tipificado de HLA y factor RHD se usaron además STRs ligados al cromosoma 21 para enumerar a los mismos. Previo a la realización del PGD se analizaron en las mujeres estudios hormonales básicos, recuento de folículos antrales, estudio de flujo, e histerosalpingografía. En los varones espermograma con espermocultivo. Todas las parejas fueron informadas acerca del valor predictivo de los mencionados estudios.

La mayoría de los ciclos fueron estimulados con Gonal F y agonistas del GnRH.

Treinta y dos parejas realizaron un ciclo, once realizaron dos, una tres y otra cuatro ciclos. Todos los ciclos iniciados fueron aspirados excepto uno. De los 61 ciclos aspirados 17 (28%) no llegaron a blastocisto. Cuarenta y cinco ciclos (72%) llegaron al estadio de blastocisto, siendo 29 de ellos de buena calidad (grupo I) y 16 de regular o mala calidad (grupo II). Los blastocistos fueron clasificados de acuerdo con el grado de cavitación, tipo de macizo celular interno y trofoectodermo. La biopsia se efectuó en blastocistos en

día 5 ó 6 que estaban eclosionando, facilitando la remoción con algunos disparos a ambos lados del trofoectodermo eclosionado. Dicha eclosión se favoreció perforando en día 3 la membrana pelúcida con un disparo de rayo láser microscópico durante 7 milisegundos a los embriones que tenían más de cinco células.

## RESULTADOS

En el grupo I (integrado por los pacientes que originaron blastocistos de buena calidad) se efectuó la biopsia de 123 blastocistos. En el grupo II integrado por los pacientes que originaron blastocistos de regular o mala calidad, se efectuó la biopsia a 39 de ellos.

En el grupo I de los 123 blastocistos biopsiados, 48 resultaron normales, mientras en el grupo II de 39 biopsiados 12 fueron normales.

Hasta el presente se realizaron 26 transferencias, de las cuales 12 lograron el embarazo (46%). En el grupo I se lograron 11 embarazos de 21 transferencias (52%), mientras que en el grupo II un embarazo de 5 (20%). Diecinueve pacientes no fueron transferidas aún, ocho corresponden al grupo I y 11 al grupo II.

## DISCUSIÓN

La mayor experiencia del PGD se tiene con la realización de la biopsia de una o a lo sumo dos blastómeras en embriones de día 3 post fecundación. En ese día los embriones de buena calidad tienen más de cinco células, siendo los mejores aquellos que han alcanzado las 8 células. La remoción de una o dos células en ese estadio, si bien todas las células son totipotenciales, significa una reducción de la masa celular entre el 12,5 y 25%. En cambio como la mayoría de los blastocistos que están eclosionando tienen más de cien células, la remoción de 5 a 10 células del trofoectodermo significa una disminución menor de células del trofoectodermo, aparentemente sin modificación del número de las células primordiales embrionarias.

La experiencia recogida en los 20 años de aplicación del diagnóstico preimplantatorio ha evidenciado una tasa promedio de embarazo por ciclo del 22,7%, con una certeza diagnóstica mayor del 90%, según los registros del Consorcio de PGD de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología ESHRE (Harton *et al.*, 2012). Un inconveniente no menor es cuando se trabaja con una o dos células que no se pueda obtener el resultado del estudio genético, a pesar de haber acondicionado la técnica, que de hecho ocurre en un 10 al 20% de las células estudiadas. En cambio con la biopsia de trofoectodermo como la cantidad de células removidas es mayor, entre 5 y 10 células, uno se asegura prácticamente siempre el resultado de las células extraídas. En nuestra serie de 162 biopsias, 60 (37%) correspondieron a resultados normales, 5 (3%) resultados dudosos y 97 (60%) resultados anormales. Teniendo en cuenta que la serie estuvo conformada por 10 indicaciones por enfermedades recesivas, 4 dominantes, 6 translocaciones recíprocas, 5 para tipificado de HLA, 5 por recurrencia de embarazos aneuploides, 1 por incompatibilidad RHD y 2 por sexado social, el porcentaje hallado de embriones transferibles (37%) corresponde con las predicciones teóricas efectuadas (44%). El 90% de los PGDs realizados fueron por riesgo genético aumentado y una minoría para PGS con la intención de seleccionar a los blastocistos euploides. Cinco de los embarazos correspondieron a parejas con trastornos monogénicos, dos a tipificado de HLA, tres a portadores de translocaciones recíprocas, uno a aneuploidías recurrentes y uno a una pareja por sexado social. Debemos señalar que la tasa de embarazo logrado en los PGDs por translocaciones fue muy superior a lo reportado previamente por el PGD Consortium de la ESHRE. Una mención especial merece el caso de una pareja

de edad avanzada y abortadora por aneuploidías recurrentes que logró el nacimiento de un hijo normal con la transferencia del único blastocisto normal logrado en una cohorte de ocho. En los siete con aneuploidías logramos identificar la misma proporción de aneuploidías meióticas por ambos progenitores. Según nuestro conocimiento es la primera vez que se documenta la contribución paterna con un porcentaje tan importante de aneuploidías espermáticas en un varón de 46 años con semen y cariotipo mitótico normales. Obviamente que la extensión de este tipo de estudios permitirá aseverar o descartar el efecto de la edad del varón sobre las aneuploidías espermáticas. Sin embargo, el porcentaje de embarazo logrado en el grupo de las cinco parejas abortadoras fue bajo (1/5). Al respecto no deberíamos olvidar que la realización de ensayos clínicos controlados luego de 10 años de haberse arraigado screening de aneuploidías embrionarias por FISH en todo el mundo, sobre todo por edad materna avanzada, aborto recurrente, falla reiterada en FIV y factor masculino severo, se llegó a la conclusión que el PGS por FISH no solo no mejoraba los resultados sino que aún los podía empeorar (Stevens *et al.*, 2004; Steassen *et al.*, 2004; Mastenbroek *et al.*, 2007; Jansen *et al.*, 2008; Hardanson *et al.*, 2008; Schoolcraft *et al.*, 2009; Steassen *et al.*, 2008). Tres argumentos fueron utilizados para explicar esos magros resultados: a) limitación de la técnica para enumerar a todos los cromosomas, b) disminución de la tasa de implantación luego de la extracción de una o dos blastómeras y c) el descarte de embriones supuestamente aneuploides que podrían haberse autocorregidos. Ahora tenemos mucha esperanza con el array de CGH, con el cual solucionaríamos el primer argumento, con la biopsia de trofoectodermo el segundo, ya que la proporción de células extraídas del embrión es mayor, correspondiente al trofoectodermo, sin alterar la proporción de células primordiales embrionarias, pero el tercer argumento aún es incontestable, si bien el único ensayo clínico controlado terminado es promisorio (Yang *et al.*, 2012), el diseño usado al igual que los demás registrados en Clinicaltrials.gov (*Clinicaltrials.gov a*), no pueden contestar si la constitución cromosómica del trofoectodermo se corresponde con la constitución embrión-fetal. Nosotros pensamos que hasta no tener resultados de estudios observacionales, a ciegas y prospectivos, como el registrado por nosotros en Clinicaltrials.gov (*Clinicaltrials.gov b*), no se puede saber acerca del valor clínico de la determinación del cariotipo molecular. No dudamos de su valor benéfico cuando se dispone de una serie de blastocistos y se eligen los euploides para transferir. La duda se plantea cuando se tiene un único blastocisto de buena calidad y el estudio demuestra que tiene una aneuploidía, la cual podría autocorregirse o estar limitada a la placenta. Por lo tanto, habría que ser más cauteloso con la utilización del cariotipo molecular para la selección del mejor embrión antes de contar con los resultados de los ensayos clínicos bien diseñados que avalen el valor clínico del mismo.

El mantenimiento de un programa de PGD con transferencia de embriones sin congelar exige un esfuerzo casi sobre humano por parte de los reproductores que les exige estar siempre presente cuando sea necesario trabajar. Debido al poco tiempo disponible entre la biopsia y la transferencia prácticamente no pueden programar sus días laborables. Además la tarea es muy estresante, ya que al trabajar con unas pocas células, la eficacia en la obtención de resultados nunca es 100%. La posibilidad de conjugar los adelantos advenidos en cuanto a la mejora de los medios de cultivo embrionario para que puedan alcanzar el estadio de blastocisto, la biopsia del trofoectodermo que equivale a la punción de vellosidades coriónicas, la vitrificación exitosa de los blastocistos biopsiados, la mejor receptividad endometrial en un ciclo no estimulado (Goto *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012),

la ausencia del potencial efecto teratogénico de las drogas utilizadas durante la superestimulación ovárica (Davies *et al.*, 2012), la posibilidad de contar con más células para que los resultados sean más robustos y la posibilidad de repetir resultados dudosos nos pareció que se podría traducir en mejores resultados. Como los resultados obtenidos en la serie de 62 ciclos resultaron satisfactorios y superiores a los obtenidos con la biopsia clásica de blastómeras, hemos decidido cambiar la biopsia del tercer día con transferencia en fresco en quinto día, por la biopsia de trofoectodermo en día 5 ó 6 con transferencia en ciclo diferido con endometrio preparado fisiológicamente. Como la biopsia de trofoectodermo equivale a la punción de vellosidades, la corroboración del diagnóstico preimplantatorio debería entonces realizarse con la amniocentesis, la cual permite evaluar la constitución genética de las células descamadas del feto.

#### Correspondencia a:

Dr. Roberto Coco  
robertococo@fecunditas.com.ar  
Larrea 790, CABA 1030, Argentina

#### REFERENCIAS

- ClinicalTrials.gov a: a) preimplantation genetic diagnosis using blastocyst biopsy and array CGH; b) Preimplantation genetic screening (PGS) in advanced female and male severe factor.
- Clinical Trials.gov b: Study of the best blastocyst post transfer by aCGH
- Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Haan EA, Chan A. Reproductive Technologies and the Risk of Birth Defects. *N Engl J Med.* 2012;366:1803-13.
- Goto S, Kadowaki T, Tanaka S, Hashimoto H, Koikeguchi S and Shio-tani M. Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1,488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril.* 2001;95:948-952.
- Hardanson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008;25: 1-7.
- Harton G, Traeger-Sydninos, Goosens V. Data from the ESHRE PGD Consortium. *Hum Reprod.* 2012;27 suppl 1:i58-i59.
- Jansen RP, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod.* 2008;23: 1476-1478.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007;357: 9-17.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe M, Stevens J, Rawlins M, Munné S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril.* 2009;92(1):157.
- Steaessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of Blastocyst Transfer With or Without Preimplantation Genetic Diagnosis for Aneuploidy Screening in Couples With Advanced Maternal Age: a Prospective Randomized Controlled Trial. *Hum Reprod.* 2004;19(12): 2849-58.
- Steaessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, van der Elst J, Liebaers I, et al. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single embryo transfer. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2818-25.
- Stevens J, Wale P, Surrey ES, Schoolcraft WB. Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004;82 suppl 2: 249.
- Song T, Liu L, Zhou F, Lin XN, Zhang SY. Frozen-thawed embryo transfer (FET) versus fresh embryo transfer in clinical pregnancy rate during in vitro fertilization-embryo transfer. *Clin Exp Reprod Med.* 2012;39(1): 33- 39.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle S, Peck AC, Scott Sills E, Salem RD. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular cytogenet.* 2012;5(1):24.

# Avaliação da qualidade seminal em adultos após o uso de spirulina platensis e resveratrol

## Evaluation of sperm quality in adults after use spirulina platensis and resveratrol

Franciele Bona Verzeletti<sup>1</sup>, Rodrigo Sell Poletto<sup>2</sup>, Telma Elita Bertolin<sup>3</sup>, Fernando Fornari<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Docente das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil) e Graduada em Biomedicina pela Universidade Luterana do Brasil. Mestranda em Envelhecimento Humano (UPF).

<sup>2</sup>Estudante de Medicina na Faculdade Santa Marcelina (FASM), São Paulo-SP.

<sup>3</sup>Docente Universidade de Passo Fundo (UPF) e Graduada em Biologia. Doutora em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica pela Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup>Docente da Universidade de Passo Fundo (UPF) e Graduado em Medicina. Doutor em Ciências em Gastroenterologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

### RESUMO

A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores. As causas mais comuns incluem número insuficiente de espermatozoides, e/ou pouca motilidade destes. O uso de antioxidantes poderia contribuir no tratamento da infertilidade masculina em pacientes com perda da qualidade seminal. O objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de antioxidantes (*Spirulina platensis* e resveratrol) contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

**Material e métodos:** Este é um estudo clínico randomizado com dois grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R), cada um dos grupos foi composto por 25 homens entre 40 a 60 anos de idade, totalizando 50 homens. Para as análises, o grupo Sp foi submetido à terapia de 4g de *Spirulina platensis* em cápsulas e o grupo R foi submetidos à terapia com 500mg de Resveratrol em cápsulas, ambos durante 90 dias. As amostras foram submetidas às análises de Espermograma, Índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e Catalase (CAT), antes e depois da terapia. Todos os homens foram submetidos a um questionário padrão. A análise de espermograma obteve significância na concentração ( $p=0,022$ ) e morfologia espermática ( $p=0,037$ ) com o uso de Sp, e significância na motilidade ( $p=0,027$ ) e vitalidade ( $p=0,017$ ) com uso de R.

**Conclusão:** a terapia de 90 dias com *Spirulina platensis* ou resveratrol tem um efeito estacionário das espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a melhora da qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

**Palavras chave:** Antioxidantes. Envelhecimento. Infertilidade masculina. Qualidade seminal.

### ABSTRACT

Male infertility may be caused by different factors. The most common ones include the insufficient number of sperm and/or this little motility. The use of antioxidants should be contribute to the treatment of male infertility in patients with loss of seminal quality. The main objective of this study was evaluating if the of antioxidants (*Spirulina platensis* and resveratrol) contributes in the seminal quality among men between 40 and 60 years old.

**Material and methods:** This is a randomized clinical study with two groups: *Spirulina platensis* (Sp) and Resveratrol(R), each of the groups has been compound by 25 men between 40 and 60 years old, wich means they were 50 in total. For

the analysis, the Sp group were made to have 4g of *Spirulina platensis* whereas the R group took 500mg of Resveratrol, in both cases the medicine was taken in capsules and during 90 days. The samples were sent to spermogram analysis, index of reactive substances to acid 2-thiobarbituric (TBARS) and Catalase (CAT), before and after the therapy. All the men have been submitted to a standard questionnaire. The analysis of semen concentration achieved significance ( $p = 0,022$ ) and morphology ( $p = 0,037$ ) using Sp. Motility ( $p = 0.027$ ) and vitality ( $p = , 017$ ) have significance with use R.

**Conclusion:** the therapy use has a stationary effect of reactive oxygen species, improving the seminal quality in men between 40 and 60 years old.

**Key words:** Antioxidants. Aging. Male infertility. Sperm quality.

### INTRODUÇÃO

A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres na mesma proporção. De acordo com a Associação Americana para Medicina Reprodutiva (ASMR, 2007) e a Organização Mundial de Saúde (2010), infertilidade é a falta de gestação detectada de forma clínica ou hormonalmente após 12 meses de relações sexuais normais, sem contracepção. A infertilidade masculina é causada por diferentes fatores, sendo que as causas mais comuns incluem número insuficiente de espermatozoides, e/ou pouca motilidade destes.

A tendência recente de paternidade tardia levanta preocupações por causa dos efeitos negativos do envelhecimento sobre a fertilidade. Embora se saiba que a fertilidade feminina diminui com o envelhecimento como resultado da diminuição da reserva de ovócitos e de qualidade, estudos recentes têm demonstrado os efeitos do envelhecimento no sistema reprodutor masculino. No entanto, o declínio observado relacionado à idade na fertilidade masculina continua a ser estabelecido (Desai *et al.*, 2010).

Os recentes achados da comunidade científica discutem com ênfase a relação entre o envelhecimento humano e o estresse oxidativo (Gharagozloo *et al.* 2011). Dentre as teorias que explicam o envelhecimento humano, a teoria do estresse oxidativo é hoje uma das mais aceitas cientificamente. Estes resultados podem mostrar que existe uma relação entre o processo de envelhecimento humano e sua correlação com o estado oxidativo do organismo.

De acordo com Gharagozloo e Aitken (2011), o estresse oxidativo pode afetar a fertilidade masculina. Assim, especialistas em fertilidade estão explorando ativamente o diagnóstico de estresse em espermatozoides, e avaliar o possível uso de antioxidantes para melhorar esta condição.

Um importante fator que contribui para a infertilidade é o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de antioxidantes no organismo pode levar a queda no número de espermatozoides e deformidade dos mesmos. Altas concentrações de EROS podem causar patologias espermáticas, levando à peroxidação lipídica e perda da motilidade e viabilidade. Estudos demonstram que em pequenas e controladas concentrações, as EROS desempenham importante papel nos processos fisiológicos dos espermatozoides, como a capacitação, reação acrossômica e sinalização de processos para garantir a fertilização (Bansal & Bilaspuri, 2011).

O uso de antioxidantes pode contribuir para redução de estresse oxidativo nas células germinativas, melhorando sua capacidade espermática tanto na concentração quanto na motilidade, apesar de não se conhecer doses e tempo de uso destas substâncias.

Um antioxidante que vem sendo pesquisado é o resveratrol, encontrado na uva e no vinho, podendo contribuir para prevenir doenças e retardar o envelhecimento. O resveratrol, um polifenol natural, é encontrado em uvas vermelhas, amoras, mirtilos, extrato das raízes da erva daninha *Polygonum cuspidatum*, e devido sua estrutura pode estar relacionada à atividade antioxidante, já sendo descrito suas propriedades como um antioxidante e anti-inflamatório. Esta substância pode estimular a ação das sirtuínas, que são enzimas reguladoras dos mecanismos de longevidade, podendo atenuar a ação das EROS (El-Agamy, 2010).

O uso de resveratrol poderia reduzir os processos de lipoperoxidação em homens férteis e inférteis, potencialmente melhorando a qualidade espermática (Garcez *et al.*, 2010). A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria encontrada em vários territórios, incluindo areias, pântanos, lagos, rios e mares (Khan *et al.*, 2005). Seu cultivo é realizado em tanques de água expostos ao sol para possibilitar fotossíntese. Pode ser comercializada em pó ou cápsulas, com diversos propósitos terapêuticos. Vem sendo utilizada há séculos no México e na África, e tem sido cultivada em fazendas de algas, com produção atual que ultrapassa um milhão de toneladas/ano, para o consumo humano. A produção mundial é liderada pelos Estados Unidos, seguido pela Tailândia, Índia, Japão e China. A *Spirulina* está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos (Fox, 1996).

O laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo vem estudando há alguns anos o uso terapêutico da microalga *Spirulina platensis*, a qual têm sido utilizada mundialmente na alimentação humana e animal, assim como na obtenção de aditivos utilizados em formas farmacêuticas e alimentos. Além de excelente suplemento alimentar é uma fonte potencial no tratamento de diversas doenças (Ambrosi *et al.*, 2008), podendo também contribuir para o tratamento da infertilidade masculina, melhorando a qualidade seminal em homens inférteis.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o uso de antioxidantes (*Spirulina platensis* e resveratrol) contribui na qualidade seminal em homens entre 40 e 60 anos de idade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo. O período de coleta de dados para avaliação, bem como o experimento, ocorreu entre janeiro de 2012 a novembro de 2012 no

Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Curso de Engenharia de Alimentos da UPF e na Genesis Centro de Reprodução Humana de Passo Fundo.

Foi realizado um estudo clínico randomizado com 2 grupos: *Spirulina platensis* (Sp) e Resveratrol (R). Ambos os grupos foram compostos por 25 homens entre 40 e 60 anos de idade, totalizando 50 homens ( $n=50$ ). Para as análises o grupo Sp foi submetido à terapia oral em cápsulas de 4g de *Spirulina platensis* durante 3 meses (90 dias). O grupo R foi submetidos à terapia oral em cápsulas de 500mg de Resveratrol durante 3 meses (90 dias).

As amostras de ambos os grupos foram submetidas às análises de Espermograma completo, Índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) – Análise do Estresse Oxidativo e Catalase (CAT). Após três meses de terapia com *Spirulina platensis* (4g) e resveratrol (500mg), as análises foram efetuadas novamente, comparando os resultados entre as análises antes e depois da terapia.

Ambos os grupos, Sp e R, foram submetidos a um questionário padrão antes da terapia, com os questionamentos sobre idade, etnia, peso, fumante, prática e intensidade de exercícios físicos, consumo e frequência de bebidas alcoólicas, número de filhos, se já realizou fertilização *in vitro* e, ainda, se estava adquirindo medicamento controlado.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), que foram avaliados nesta pesquisa.

**Table 1.** Parâmetros seminais de acordo com a Organização Mundial da Saúde

PARÂMETROS SEMINAIS	OMS 2010
Volume (mL)	≥ 1,5
Concentração (M/mL)	≥ 15
Concentração total (M)	≥ 39
Motilidade total (%)	≥ 40
Motilidade A + B (%)	≥ 32
Vitalidade (%)	≥ 58
Morfologia (%)	≥ 4

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010.

Para seleção dos pacientes, foram incluídos no estudo homens entre 40 e 60 anos de idade que apresentavam sub-infertilidade, caracterizada por espermograma anormal e homens com espermograma normal de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 2010 (WHO, 2010).

A análise seminal – espermograma – também foi realizada de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Para tal, as amostras seminais foram coletadas por masturbação em uma sala equipada do laboratório da Clínica Genesis de Passo Fundo. Esse método teve a vantagem de ter sob controle as condições de meio ambiente, e também a maneira como a amostra foi coletada, e se ocorreu ou não perda do material biológico durante a coleta. Além disso, pode-se saber o lapso de tempo entre a ejaculação e a investigação, e, ainda, observações como, por exemplo, a presença de coagulação e a ocorrência de liquefação. O período de abstinência sexual foi de três a cinco dias para todos os pacientes. Para análise da liquefação, após alguns minutos da ejaculação, o material coletado à temperatura ambiente, começa a liquefazer, ficando mais fino. Este processo de liquefação foi analisado dentro de 30 minutos, ou seja, em 30 minutos a amostra deveria estar totalmente liquefeita. Após a liquefação, a viscosidade da amostra foi estimada aspirando, suavemente, com auxílio de uma pipeta, permitindo que o sêmen caísse por gravidade, e observado o comprimento



do fio formado, que deveria ter até 2 cm de comprimento. A medida do volume foi realizado com auxílio de uma pipeta descartável. Após misturar bem a amostra seminal, espalhou-se uma gota de sêmen uniformemente sobre a fita de pH. Passados alguns segundos, foi realizada a comparação da cor com a tira de calibração para determinar o pH seminal. A análise da concentração e motilidade dos espermatozoides foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico, com objetiva de 20x e uma magnificação de 200x. Para tal, foi homogeneizado a amostra de sêmen, retirando-se uma alíquota de 5µL de sêmen. Esta amostra foi colocada na câmara de Makler, e então acrescentou-se a lâmina redonda, que permite a obtenção de uma espessura constante do esperma de 10mm. Levou-se o material ao microscópio com objetiva de 20x. Foi realizada a contagem de 5 quadrados da câmara e a seguir, adicionou-se seis zeros ao número de espermatozoides contados nos 5 quadrados do campo. Para análise da motilidade, foi realizado imediatamente após contagem de espermatozoides (concentração). Foi examinado no microscópio óptico em contraste de fase de 200 a 400 vezes de ampliação. Foram escolhidos campos aleatórios da lâmina. Com auxílio de um contador celular, foi realizada a contagem espermática avaliando a motilidade, expressa em porcentagem de espermatozoides móveis. Estes foram classificados em: grau A (motilidade progressiva rápida), grau B (motilidade progressiva lenta), grau C (motilidade não-progressiva) e grau D (imobilidade). Para determinação da vitalidade foi utilizado o teste da eosina Y. Foi preparado NaCl 0,9% (dissolvendo 0,9g de NaCl em 100ml de água purificada); eosina Y 0,5%, dissolvida em 0,5g de eosina Y em 100ml de 0,9% NaCl. Para a análise, a amostra de sêmen foi homogeneizada; retirou-se uma alíquota de 5 µL de sêmen e 5 µL de solução de eosina, e foram colocados em lâmina e misturados com auxílio da ponteira. Deixou-se por 30 segundos em repouso, e em seguida analisou-se o material em microscópio óptico com contraste de fase de 200 a 400 vezes as cabeças dos espermatozoides. Foi realizada a contagem do número de espermatozoides corados (mortos) e não corados (vital) com auxílio do contador de células. Foram avaliados 200 espermatozoides, a fim de alcançar uma forma aceitável de baixa porcentagem de erro. Após, foi realizado o cálculo da média de espermatozoides vivos e mortos. O resultado final foi expresso em porcentagem. Para realização da morfologia espermática foi retirado uma pequena quantidade desse material seminal sob a forma de uma pequena gota de esperma. O material foi colocado na extremidade de uma lâmina histológica limpa. A seguir, foi feita uma distensão de forma semelhante à executada para estudo citológico do sangue, em película fina. Esperou-se secar o material durante dois a cinco minutos. A fixação do material foi realizada com kit de coloração de Leishman. Deixou-se o corante agir aproximadamente 15 minutos. A seguir o excesso do corante foi retirado com algumas gotas de álcool metílico em uma lavagem rápida, e depois, com muito cuidado lavou-se delicadamente a lâmina em água corrente. Após secagem foi efetuada a análise em microscópio na objetiva de imersão com óleo antidissipador de fluorescência de alta qualidade (1000x). Foram realizadas as análises bioquímicas do índice de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e a Catalase (CAT).

Para determinação do TBARS, foi utilizada a técnica de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Ohkawa et al., 1979). Para tal, foi preparado os reagentes Lauril sulfato de sódio, ácido acético 20% pH 3,5 e TBA 0,8% (Ácido Tiobarbitúrico). Foi pipetado em um tubo falcon 200 µL de sêmen, 25 µL de Lauril sulfato de sódio, 750 µL de ácido acético 20% pH 3,5, 350 µL de água e por último o reagente TBA 0,8% . Após encubado em banho fervente (95°C)

por 60 minutos. Após, centrifugado (QUIMIS®) a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida retirado 500 µL do sobrenadante e colocado em uma cubeta de quartzo para efetuar a leitura no espectrofotômetro em 535nm. Após o ensaio determinou-se a proteína de cada uma das amostras pelo método de Lowry (Lowry et al., 1971). Realizou-se o cálculo final para obtenção do resultado.

A atividade da Catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Desta forma, a atividade da enzima Catalase pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda, onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas (Nelson & Kiesov, 1972).

A CAT degrada o peróxido de hidrogênio, que diminui a absorção e com o tempo pode ser medido em 240 nm. A diferença de extinção por unidade de tempo é uma medida de atividade da CAT. A atividade de CAT foi calculada a partir da variação de absorbância e expressa em U/mg (Ohkawa et al., 1979). O princípio da técnica se dá pela queda da absorbância do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A<sub>240</sub>) pela metabolização deste pela catalase. Foi preparado tampão de fosfato de sódio 20mM pH 7,4, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos. Os materiais utilizados para a técnica foram tampão para catalase (fosfato 50mM), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3M, (peróxido de hidrogênio), cubetas de quartzo de 3 mL e material biológico (sêmen). Foi colocado 2 mL de tampão, acrescentado 20µL da amostra e homogeneizado. Zerou-se o espectrofotômetro e acrescentou-se 50µL da solução peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3M na cubeta, 20 µL de amostra seminal, e imediatamente pressionado o botão "iniciar leitura". A duração do ensaio foi de 60 segundos. Após o ensaio determinou-se a proteína de cada uma das amostras pelo método de Lowry (Lowry et al., 1971). Realizou-se o cálculo final para obtenção do resultado.

Para a estruturação do banco de dados foi utilizado o aplicativo Epi Info™ 3.5.1 e para as análises os programas estatísticos SPSS 18 e R 2.10.0 for Windows. Para a análise dos dados foram utilizados os seguintes testes: a) para a comparação de uma variável quantitativa com outra categórica foi utilizado o Teste Qui-quadrado; b) para a comparação de duas variáveis quantitativas foi utilizado o Teste *t* de Student. O nível de significância utilizado nos testes para rejeitar H<sub>0</sub>, quando a hipótese nula for verdadeira, foi de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Todos os pacientes que participaram desta pesquisa realizaram a terapia de acordo com o que foi estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como finalizaram no tempo proposto (90 dias) a administração da *Spirulina platensis* e resveratrol, e realizaram as coletas antes e após a terapia.

Após análise dos dados do grupo submetido a terapia com *Spirulina platensis*, constatou-se que os parâmetros de análise seminal – espermograma – que tiveram melhora nos resultados foram: concentração ( $p=0,022$ ) e morfologia espermática ( $p=0,037$ ), demonstrando haver relação positiva depois da terapia oral com *Spirulina platensis*, conforme apresentado na Tabela 2.

Observa-se na Figura 1 que a vitalidade das amostras submetidas a esta terapia (*Spirulina platensis*), obtiveram melhora de 3,33%.

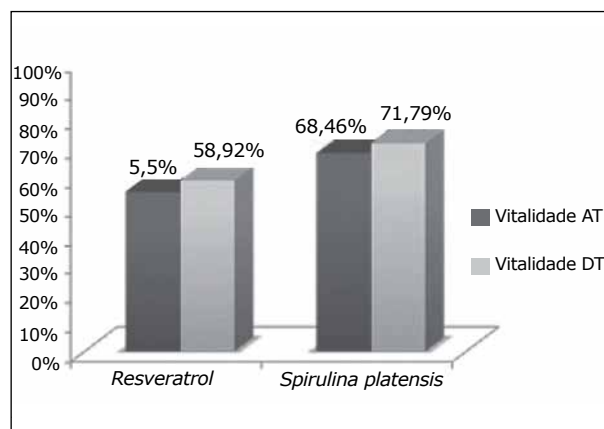
A motilidade aumentou quando comparado antes e depois da terapia, conforme Tabela 2. A concentração espermática (milhões/mL) também aumentou significativamente após uso de resveratrol, cerca de 23,33%.

**Table 2.** Análise seminal grupo *Spirulina platensis*

Variável	Experimento	Média e desvio padrão	Teste t
Volume (ml)	AT	2,72±1,16	0,255
	DT	2,96±1,40	
Concentração (milhões/ml)	AT	29,44±24,09	0,022*
	DT	39,32±27,68	
Concentração Total (milhões/ml)	AT	109,96±70,25	0,079
	DT	88,60±69,43	
Motilidade (%)	AT	63,83±39,65	0,839
	DT	65,42±34,49	
Grau A (%)	AT	7,79±17,26	0,721
	DT	8,08±16,24	
Grau B (%)	AT	36,17±30,80	0,692
	DT	39,12±29,72	
Grau C (%)	AT	19,62±20,43	0,678
	DT	18,37±17,27	
Grau D (%)	AT	19,62±28,04	0,760
	DT	21,92±25,09	
Vitalidade (%)	AT	68,46±31,12	0,129
	DT	71,79±30,59	
Morfologia (%)	AT	3,33±2,06	0,037*
	DT	4,21±3,02	
pH	AT	7,16±0,20	0,212
	DT	7,13±0,21	

\* Significativo  $p < 0,05$ 

Variável	Antes	Depois	p-value
Volume de sêmen (ml)	2,7±1,16	3±1,4	0,255
Concentração de espermatozoides (milhões/ml)	29,4±24,1	39,3±27,7	0,022*
Concentração Total (milhões/ml)	88,6±69,4	110±70,2	0,079
Motilidade (%)	63,8±39,6	65,4±34,5	0,839
Grau A (%)	7,8±17,3	8,1±16,2	0,721
Grau B (%)	36,2±30,8	39,1±29,7	0,692
Grau C (%)	19,6±20,4	18,4±17,3	0,678
Grau D (%)	19,6±28,0	21,9±25,1	0,760
Vitalidade (%)	68,5±31,1	71,8±30,6	0,129
Morfologia (%)	3,3±2,1	4,2±3,0	0,037*
pH	7,2±0,2	7,1±0,2	0,212

\* Significativo  $p < 0,05$ **Figure 1.** Vitalidade antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

Analisando a morfologia espermática antes e após a terapia com *Spirulina platensis*, houve melhora de 0,88%.

No grupo Resveratrol, assim como no grupo da *Spirulina platensis*, apresentaram resultados significativos na motilidade ( $p=0,027$ ), após o terapia oral de 500mg de Resveratrol (Tabela 3). Ou seja, a motilidade espermática aumentou 7,80% depois da terapia. Já a concentração espermática aumentou 24,35%, e a morfologia teve uma melhora de 0,24%. A vitalidade espermática aumentou 3,92% após esta terapia.

Não foi possível a aplicação de teste estatístico dos parâmetros cor e aparência, viscosidade e liquefação em ambos os grupos, por se tratar de uma constante, não existindo diferença antes e depois da terapia, conforme Tabela 4.

Tanto o grupo Resveratrol quanto o grupo *Spirulina platensis*, a vitalidade, a concentração e a concentração total foram significativas ( $p < 0,05$ ), porém o

**Table 3.** A análise seminal do grupo Resveratrol. A tabela mostra as variáveis realizadas no espermograma completo.

Variável	Antes	Depois	p-value
Volume de sêmen (ml)	3,0±1	2,9±1	0,505
Concentração de espermatozoides (milhões/ml)	32,7±32,3	40,7±37	0,229
Concentração Total (milhões/ml)	91,9±98,6	129±140,4	0,109
Motilidade (%)	59,3±43,1	67,1±39,5	0,158
Grau A (%)	7,3±24,9	9,72±26,6	0,099
Grau B (%)	30,1±33,8	40,9±35,5	0,027*
Grau C (%)	24,2±28,2	19,4±24,5	0,199
Grau D (%)	19,9±32,6	9,7±19,3	0,057
Vitalidade (%)	55±33,6	58,9±34,1	0,017*
Morfologia (%)	3,4±2,7	3,7±2,7	0,110
pH	7,2±0,2	7,0±0,5	0,096

\* Significativo  $p < 0,05$

grupo Resveratrol apresentou melhor desempenho nas análises. Ainda, a terapia com Resveratrol mostrou-se mais eficiente do que a *Spirulina platensis* no quesito motilidade, sendo um aumento de apenas 1,59% no grupo *Spirulina platensis*, e 7,80% no grupo Resveratrol. Por outro lado, analisando morfologicamente os espermatozoides, o grupo *Spirulina platensis* apresentou maior destaque (0,88% versus 0,24%).

**Table 4.** Impossibilidade de análise estatística das variáveis.

Parâmetro		Normal	Aumentada	Qui-quadrado
Viscosidade	AT	23 (92%)	2 (8%)	0,920
	DT	24 (96%)	1 (4%)	
Cor e aparência	AT	25 (100%)	0 (0%)	*
	DT	25 (100%)	0 (0%)	
Liquefação	AT	25 (100%)	0 (0%)	*
	DT	25 (100%)	0 (0%)	

\* Constante

Aplicando análise estatística Qui-quadrado no questionário padrão, constatou-se que a motilidade espermática foi menor no grupo de fumantes do que aqueles não fumantes ( $p=0,044$ ). Os homens que praticam atividade física apresentaram melhor motilidade seminal (espermatozoides grau A e B) do que aqueles que não praticam nenhuma atividade física,  $p=0,035$ , e a

**Table 5.** Variáveis questionário padrão através da análise estatística Qui-quadrado.

Dados pessoais	Dados coletados	p-value
Fumantes	Motilidade espermática	0,044*
Praticantes de atividades físicas	Motilidade seminal	0,035*
Fumantes	Vitalidade espermática	0,105
Consumo de bebidas alcoólicas	Qualidade seminal	0,308
Fumantes	Morfologia	0,042*

\* Significativo  $p < 0,05$

concentração espermática é 6,27% maior que os não praticantes.

Por outro lado, a atividade física não influencia na vitalidade espermática. Assim como a vitalidade não obteve significância entre os fumantes e os não fumantes ( $p=0,105$ ). Não foi constatado nenhuma relação entre consumo de bebidas alcoólicas e a qualidade seminal ( $p=0,308$ ). O uso de medicamentos controlados não influenciou na qualidade seminal.

Após as análises de TBARS, constatou-se que em ambos os grupos, Resveratrol e *Spirulina platensis*, não obteve-se resultado significativo após a terapia. Na análise de Catalase também não obteve-se resultado significativo após a terapia de ambos os grupos, Tabelas 6 e 7, respectivamente.

**Table 6.** Análise de TBARS pela aplicação do Teste t de Student.

Terapia	Média e desvio-padrão	p-value
Resveratrol TBARS AT	1,284±0,64	0,985
Resveratrol TBARS DT	1,288±0,85	
Spirulina TBARS AT	1,390±0,62	0,114
Spirulina TBARS DT	1,151±0,46	

**Table 7.** Análise de TBARS pela aplicação do Teste t de Student.

Terapia	Média e desvio-padrão	p-value
Resveratrol CAT AT	23,56±9,21	0,490
Resveratrol CAT DT	25,94±19,49	
Spirulina CAT AT	22,25±15,82	0,278
Spirulina CAT DT	18,49±11,75	

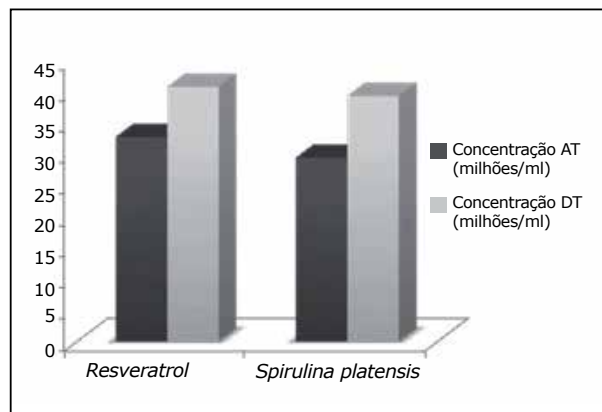
## DISCUSSÃO

O espermograma inclui uma análise seminal completa, incluindo a estimativa quantitativa (percentual de espermatozoides móveis) e qualitativa (velocidade de progressão e motilidade). Também são realizados procedimentos de coloração vital para determinar a vitalidade, a concentração e a morfologia espermática (MENKEVLD; KRUGER, 1997; DESAI, et al., 2010).

Os fatores ambientais, fisiológicos e genéticos têm sido implicado nas funções do espermatozoide e na infertilidade. Um dos fatores mais importantes que contribuem para espermatozoides de má qualidade é o estresse oxidativo. Entre as várias causas, o estresse oxidativo afeta a fertilidade e a fisiologia das células espermáticas (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Não foram encontrados estudos referente ao uso de *Spirulina platensis* e resveratrol na avaliação da qualidade espermática quando estes administrados via oral, somente quando adicionados ao processo de congelamento espermático, agindo como antioxidantes.

Neste estudo, aqueles pacientes submetidos à terapia com *Spirulina platensis* e resveratrol, quando analisado o parâmetro de vitalidade constatou-se melhora após a terapia. A vitalidade reflete na proporção de espermatozoides vivos. O princípio desta técnica baseia-se na perda da integridade da membrana plasmática, que está ligada também ao dano do DNA



**Figure 2.** Concentração antes e depois do tratamento com Resveratrol e *Spirulina platensis*.

espermático e morte celular. A partir deste dado, podemos concluir que o uso destes antioxidantes auxiliam na proteção da membrana plasmática, impedindo a morte celular, e consequentemente aumentando a porcentagem de espermatozoides vivos nos homens submetidos a estas terapias, ou seja, aumentando a viabilidade espermática (CAPUCHO *et al.*, 2012).

Após uso de *Spirulina platensis* e resveratrol, a concentração espermática (milhões/mL) também aumentou nas amostras. Ao contrário do que mostrou o estudo de Garcez *et al.* (2010), quando aplicou resveratrol em congelamento de espermatozoides e notaram que após descongelamento a concentração e motilidade espermática permaneceram iguais. Já outro estudo mostrou que a adição do resveratrol no congelamento espermático apresentou melhora da motilidade e viabilidade espermática (MEAMAR *et al.*, 2012). Isto significa que, em nosso estudo, a terapia oral com antioxidantes contribuiu para a melhora da qualidade seminal, principalmente nos parâmetros concentração e motilidade espermática. Esses parâmetros são importantes para àqueles casais que desejam ter filhos naturalmente, sem necessidade de recorrer ao tratamento de fertilização *in vitro*, uma vez que a concentração e motilidade espermática permitem a fertilização natural do oócito.

A morfologia obteve uma melhora significativa naqueles pacientes submetidos à *Spirulina platensis*, e com o resveratrol, houve aumento da porcentagem após a terapia (0,24%). Pode-se dizer que os efeitos danosos do estresse oxidativo em espermatozoides estão entre 30% a 80% dos casos de infertilidade masculina (ESTEVES; AGARWAL, 2011). Os espermatozoides são protegidos por vários antioxidantes e enzimas antioxidantes no plasma seminal. Estes antioxidantes são agentes responsáveis pela quebra da reação oxidativa, reduzindo, assim, o estresse oxidativo.

A partir disso, o uso destas terapias contribuíram para a melhora da concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, sendo útil no tratamento da infertilidade masculina (BANSAL; BILASPURI, 2011). Em ambos os grupos (Resveratrol e *Spirulina platensis*), obteve-se resultados positivos após a terapia oral, ou seja, alguns parâmetros houve melhora e outros permaneceram estáveis aos resultados, mostrando que estes antioxidantes podem ser importantes no tratamento da infertilidade masculina através da estagnação dos parâmetros ou melhora destes. Um dado importante a citar, é o fato da inexistência de estudos comparando a *Spirulina platensis* com

a qualidade seminal, principalmente no parâmetro concentração espermática. E, neste estudo, mostramos a melhora deste parâmetro seminal. Assim como, quando utilizado resveratrol, houve melhora na motilidade espermática.

Apesar de não ter sido encontrado estudos referente a motilidade espermática e o uso de cigarro, nesta pesquisa constatou-se que a motilidade foi menor no grupo de fumantes do que no grupo de não fumantes ( $p=0,044$ ). Acredita-se que, o cigarro por ser um dos contribuintes da formação de espécies reativas de oxigênio, tem a influência de danificar os parâmetros seminais. Ainda, os homens que praticam atividade física apresentaram melhor motilidade seminal (espermatozoides grau A e B) do que aqueles que não praticam nenhuma atividade física,  $p=0,035$ . Os espermatozoides grau A e B são aqueles capazes de fertilizar o óvulo naturalmente. Portanto, a prática de atividade física também pode contribuir para a qualidade seminal, já que o nível de estresse oxidativo e geração de espécies reativas de oxigênio também diminui, contribuindo assim para a fertilidade masculina (CAPUCHO *et al.*, 2012).

## CONCLUSÕES

O uso do Resveratrol e da *Spirulina platensis* estão associados com muitos benefícios à saúde, principalmente a inativação de doenças, por serem fontes ricas de antioxidantes e facilmente incorporados na membrana lipídica, inibindo a formação de radicais lipídicos e mantendo a integridade da membrana e o equilíbrio iônico da célula.

Nesta pesquisa teve-se a perspectiva que estas duas terapias fossem capaz de agir como antioxidantes, melhorando a qualidade seminal em humanos após sua administração oral. Mostramos resultados positivos apenas de que a ingestão oral de resveratrol e *Spirulina platensis* também podem contribuir no tratamento da infertilidade masculina, já que após a terapia de 90 dias houve melhora dos parâmetros seminais concentração e motilidade, que são considerados cruciais para a fertilização natural do óvulo. Não constatamos ação destas substância sob o estresse oxidativo, onde não foram apontados resultados significativos da relação com TBARS e CAT associados. Devido à falta de artigos científicos que relacionam a análise de TBARS e CAT com o uso de resveratrol e *Spirulina platensis*, acredita-se na necessidade de mais pesquisas envolvendo estas terapias como ação antioxidante nas células germinativas masculinas.

A causa mais comum da infertilidade masculina é a pouca concentração ou a motilidade espermática, ou seja, presença apenas de espermatozoides grau C e grau D, que são incapazes de fertilizar os óvulos naturalmente. Nesta pesquisa conseguimos obter melhora destes parâmetros em homens entre 40 e 60 anos de idade, mostrando relação positiva deste tipo de terapia quando relacionado a estas duas causas mais comuns da infertilidade masculina.

Portanto, com este estudo mostramos que a suplementação oral destas substâncias também podem melhorar a qualidade seminal em humanos quando realizadas análises em amostras frescas, sendo tratamentos promissores para estudos futuros em homens inférteis.

## Correspondência:

Franciele Bona Verzeletti

Avenida Visconde de Guarapuava, 1131 – Apt. 04  
CEP 80045-200 - Alto da XV  
Curitiba – (PR), Brasil

e-mail: fra.verzeletti@gmail.com

**REFERÊNCIAS**

- AGARWAL, A. Role of oxidative stress in male infertility and antioxidant supplementation. *Business Briefing; Urology and Urological Disease*, 2005; 7; 122-129.
- AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de Spirulina spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*; 2008; 29; 2.
- AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Super-ICSI: Nova pesquisa confirma bons resultados; 2007; 88.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative stress an antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*; 2011; 7; 1-7.
- CAPUCHO, C. et al. Green propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol.*; 2012; 50; 11; 3956 – 3962.
- DESAI, N.; SABANEKH, E. J.; KIM, T.; AGARWAL, A. Free radical theory of aging: implications in male fertility. *Urology*; 2010; 75; 1; 9-14.
- EL-AGAMY, D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aXatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch Toxicol*; 2010; 84; 5; 389-396.
- FOX, R.D.; Spirulina production and potencial. France: Edisud, 232p., 1996.
- GARCEZ, M.E. et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility*, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, mar. 2010.
- GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, J.R. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, v. 26, n.7, p. 1628-1640, mai. 2011.
- KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S.; Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol*, v.5, n. 6, p. 373-379, out. 2005.
- LOWRY O.H. et al. *Journal Biol. Chem.*; 1951; 193; 265-275.
- MEAMAR, M. et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertility & Sterility*, 2012; 98, 2; 326-333
- MENKEVLD, R.; KRUGER, T. Análise Seminal Básica. In: BADALOTTI, Mariangela; TELÖKEN, Claudio; PETRACCO, Alvaro (Org.). *Fertilidade e Infertilidade Humana*. Porto Alegre: Medsi.,1997; 417-423.
- NELSON, D.P.; KIESOV, L.A. *Analytical Biochemistry*; 1972; 49;174-178.
- OHKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 1979; 95; 351-358.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, mai., 2010.
- Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), 2009†, Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS).
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. Glossário revisado da Terminologia das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), 2009†, Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART) e Organização Mundial da Saúde (OMS). *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 2010; 14:14-8.



# The fate of stored human embryos 5 years after approval of embryo stem cell research in Brazil

Renata Bossi<sup>1,2</sup>, Alfredo Góes<sup>2</sup>, Marcos Sampaio<sup>1</sup>, Selmo Geber<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ORIGEN - Centro de Medicina Reprodutiva, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

## ABSTRACT

After human embryonic stem cells were successfully obtained from frozen embryos, donation for research became a new alternative for surplus embryos. The aim of this study was to analyze the impact of Brazil's Biosecurity Law on the availability of frozen embryos donated for embryonic stem cell research, through the observation of the number of embryos donated for that purpose by patients of a private clinic and by obtaining data from the National Health Surveillance Agency's online registers. A total of 43 couples donated 245 embryos for research between 2005 and 2010. Couples kept their frozen embryos for 3.35 years before donating them to research and the mean age of the women was 36.54 when donation took place. A total of 37 couples (86%) that donated embryos for research achieved pregnancy during IVF fresh cycle. In 2008 in Brazil, 573 surplus frozen embryos, from 50 IVF clinics, were donated for human embryonic stem cell research and in 2009, 455 from 31 IVF clinics were donated. A reduction in embryo donation, therefore, was observed. We believe it is necessary to release information and promote public discussion to clarify the potential of embryonic stem cell research, as a strategy to increase the number of embryo donations for research.

**Key Words.** Embryo Donation; Research; IVF; Stem Cell

## ABSTRACT

After human embryonic stem cells were successfully obtained from frozen embryos, donation for research became a new alternative for surplus embryos. The aim of this study was to analyze the impact of Brazil's Biosecurity Law on the availability of frozen embryos donated for embryonic stem cell research, through the observation of the number of embryos donated for that purpose by patients of a private clinic and by obtaining data from the National Health Surveillance Agency's online registers. A total of 43 couples donated 245 embryos for research between 2005 and 2010. Couples kept their frozen embryos for 3.35 years before donating them to research and the mean age of the women was 36.54 when donation took place. A total of 37 couples (86%) that donated embryos for research achieved pregnancy during IVF fresh cycle. In 2008 in Brazil, 573 surplus frozen embryos, from 50 IVF clinics, were donated for human embryonic stem cell research and in 2009, 455 from 31 IVF clinics were donated. A reduction in embryo donation, therefore, was observed. We believe it is necessary to release information and promote public discussion to clarify the potential of embryonic stem cell research, as a strategy to increase the number of embryo donations for research.

**Key Words.** Embryo Donation; Research; IVF; Stem Cell

## INTRODUCTION

Since the report of the first live birth from successful cryopreservation of human embryos (Trounson & Mohr, 1983), many advances related to cryostorage have been published (Vajta & Kuwayama, 2006; AbdelHafez *et al.*, 2010). More recently, the use of vitrification has increased embryo survival rates and thus resulted in higher pregnancy rates (Kuwayama *et al.*, 2005; AbdelHafez *et al.*, 2010). Besides the higher pregnancy rates associated with this technique, cryopreservation is associated with a lower risk of multiple pregnancy and of developing hyperstimulation ovarian syndrome. Additionally, it reduces the costs of fertility treatment (Kuwayama *et al.*, 2005; Mohler-Kuo *et al.*, 2009; Knopman *et al.*, 2010). Currently, cryopreservation is being used routinely in most human assisted reproduction programs to store surplus embryos generated by in vitro fertilization (IVF). The great production of frozen human eggs and embryos generated by IVF led countries around the world to establish legal basis for the number of eggs that can be inseminated and embryos that can be cryopreserved, in an attempt to avoid the ethical issues associated with abandoned frozen embryos (Lornage *et al.*, 1995). In some countries (United States of America, Brazil, Spain), there are no regulations that dictate how long a frozen embryo can be stored whereas in others a limit of time for storage has been established. These are Denmark (2 years), the United Kingdom, Switzerland, Belgium, Australia, and Sweden (5 years) (Bangsboll *et al.*, 2004; Hammarberg & Tinney, 2006; Hug, 2008; Luna *et al.*, 2009; Mohler-Kuo *et al.*, 2009). Abandoned embryos may be discarded, donated to another infertile couple, or donated for research, depending on the legal possibilities in each country and the wish of the embryo's donor.

Since 1998, when the first lineage of human embryonic stem cells (hESC) was produced and maintained, many hESCs were successfully obtained from frozen embryos. Work with hESCs holds great promise in several fields of medicine, especially in regenerative medicine (Odorico *et al.*, 2001; McMahon *et al.*, 2003; Allegrucci & Young, 2007; Fenno *et al.*, 2008; Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2009). Therefore surplus embryos may be donated for hESC research.

Research using hESCs in Brazil has been regulated by the Biosecurity Law (L. 11.105, 24 March 2005). However, only after additional debates in the Brazilian Supreme Court in 2008 could studies in fact be initiated (Squizato, 2008).

The Biosecurity Law allowed the use of human embryos in hESC research that were spontaneously donated by their owners and that had been frozen for more than 3 years after the enactment of the law or those frozen until that date, and for which the cryopreservation period had been at least 3 years. In addition, the law allowed the use of non-viable embryos presenting genetic alterations detected by preim-

plantation genetic diagnosis (PGD), embryos arrested for more than 24 hours after IVF, or embryos presenting severe morphological alterations that could affect their development. Parents' consent is also required under the legislation. The aim of this study was to analyze the impact of the Biosecurity Law on the availability of frozen embryos donated for hESC research in Brazil. We evaluated the number of embryos donated for this specific purpose by patients of a private clinic, also using data from the National Health Surveillance Agency's (ANVISA) online registers, and investigated the characteristics associated with those who chose this fate for their surplus frozen embryos.

A better understanding of how this process is taking place in the country and what factors are associated with embryo donation for hESC research is crucial in order to develop strategies that provide couples with the information they need to make informed decisions about the fate of their frozen embryos.

## MATERIAL AND METHODS

Data collection (number of frozen embryos, age of patients, number of donated embryos, year of donation) was performed using our local database at Centro de Medicina Reprodutiva - ORIGEN in Belo Horizonte, Minas Gerais and the Brazilian National Health Surveillance Agency's (ANVISA) registers (SIS EMBRIO) available online (<http://portal.anvisa.gov.br>). The data of SIS EMBRIO go back to 2008 when 50 IVF clinics in the country reported the total number of frozen and donated embryos. In 2009, only 31 IVF clinics reported their number of frozen embryos. The study was approved by the research ethics committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG).

Data were collected for a period corresponding to January 2005 to September 2010 (almost six years). We evaluated the donation of frozen embryos to hESC research that was carried out in our private clinic and donation done in other clinics in Brazil. We also evaluated the donation of embryos according to pregnancy rate and according to the stage of the embryos at the time of donation.

## RESULTS

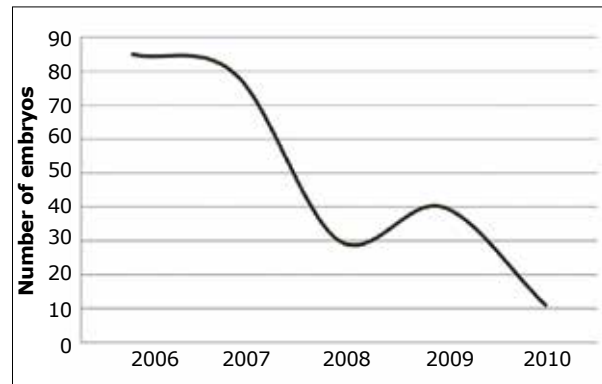
During the studied period, we observed that a total of 2440 fresh cycles were performed, with 682 (28%) frozen cycles that generated 4400 frozen embryos. A total of 1521 embryos were stored in 2006, and 712 embryos from 104 cycles were frozen within that year.

Table 1 presents the number of frozen, thawed, donated, and total cryostored embryos during the 2005–2010 period. Figure 1 shows the number of embryos donated for HESC research per year, in relation to the number of cryopreserved embryos during the same period. A total of 43 couples (6%) donated 245 embryos for research within the last 5 years,

**Table 1.** Number of frozen, thawed, donated, and total cryostored embryos from 2005 to 2010, from a private fertility clinic in Brazil.

Year	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Frozen embryos	411 (65)	712 (104)	662 (102)	871 (131)	965 (149)	779 (131)
Thawed embryos	132	359	440	426	405	462
Donated embryos	--	85 (16)	79 (11)	30 (6)	40 (8)	11 (2)
Total frozen embryos	1168	1521	1743	2188	2748	3065

Numbers in parenthesis indicate the number of couples who made the donation and/or underwent the procedure.



**Figure 1.** Number of embryos donated for hESC per year from a private fertility clinic in Brazil.

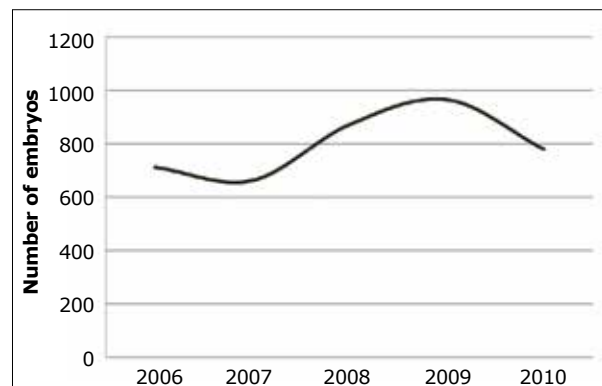
139 (57%) of which were frozen in day 2 and 3 stage, 86 (35%) in pronuclei stage, and 20 (8%) in blastocyst stage. During IVF treatments, the ages of the women who donated their embryos ranged from 26 to 50 years (mean 33.16). Couples kept their frozen embryos for an average of 3.35 years and the mean age of the women was 36.54 when donation was made. A total of 37 couples (86%) that donated their embryos for research achieved pregnancy during IVF fresh cycle.

The SIS EMBRIO data go back to 2008 when 47,570 cryopreserved embryos were registered and 643 (12%) were donated for hESC research. In 2009 there were 8,058 frozen embryos in Brazil and 455 (6%) were donated for hESC research.

## DISCUSSION

Stem cells are the great promise for the future of regenerative medicine. Embryonic stem cells are able to differentiate into tissues of three germ layers (endoderm, mesoderm, and ectoderm) and also show great potential to be used for developing new treatment modalities for a wide range of serious diseases such as Parkinson's, diabetes, Alzheimer's, spinal injuries, and several heart conditions (Thomson *et al.*, 1998; Klimanskaya *et al.*, 2008; Trounson, 2009; Vazin & Freed, 2010). The first embryonic stem cell trial in human patients is currently being conducted in USA to treat spinal injuries (Alper, 2009). Another group in the USA has been authorized by the Food and Drug Administration to perform embryonic stem cell transplantation to treat retinal diseases (Lu *et al.*, 2009).

Some studies have shown that stem cells can be obtained without destroying the embryo by doing a biopsy of the embryo in which a single cell is removed and then is cultiva-



**Figure 2.** Number of cryopreserved embryos per year from a private fertility clinic in Brazil.

ted until it reaches the blastocyst stage (Geber *et al.*, 1995; Boada *et al.*, 1998; Klimanskaya *et al.*, 2006). Other studies reveal that somatic adult cells can be induced to a pluripotent stage through the integration of some genes (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). However these studies cannot replace hESC. Embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell studies are complementary because they improve our understanding on how to maintain pluripotency in these cells (Park *et al.*, 2008).

Our results show that 86% of the couples that donated their embryos for hESC research achieved pregnancy after the IVF fresh cycle. These results are similar to those observed by McMahon *et al.* (2003) who described that couples tend to donate their remaining frozen embryos after achieving a successful IVF. Bangsboll *et al.* (2004) showed that having children due to IVF was a favorable factor to donate embryos for stem cell research in Denmark. Mohler-Kuo *et al.* (2009) observed that once pregnancy is achieved, couples usually abandon their surplus embryos.

In our study, the mean age of the women when they donated their embryos was 36.5 years. These results are in agreement with others (Hoffman *et al.*, 2003) in which women  $\geq 38$  years were less likely to make an embryo donation than were younger couples. Bangsboll *et al.* (2004) described that being a woman  $< 35$  years old was a favorable factor for donation of embryos for stem cell research. Hammarberg & Tinney (2006), however, did not find any association between parents' age and embryo donation.

The storage mean time before couples donated their embryos was 3.4 years. McMahon *et al.* (2003) observed that the willingness to donate frozen embryos is greater in couples who have had them stored for a period of time, which is consistent with the findings of Luna *et al.* (2009) who reported that the couples' choice for donation was higher after 5 years of storage. In these studies, couples were asked about their intention to donate their stored embryos, while in our study the donation was done spontaneously.

From 47,570 frozen embryos in Brazil, 643 embryos (1.4%) were donated to hESC research in 2008 (50 IVF clinics). In 2009, 455 embryos were donated, however the total number of cryopreserved embryos is unknown (31 IVF clinics). The results observed in Brazil are different from those described in United States and Canada in 2003 where 2–3% of the embryos were available for hESC research. In Australia and Europe the willingness of couples to donate their embryos (40% to 90%) was higher when compared to the United States and Canada. These differences may be due to more restrictive policies in human embryonic stem cell research in these countries. In Canada, a survey applied to investigate the willingness of couples to donate their frozen embryos for research found a rate of 54% (Hoffman *et al.*, 2003; Choudary *et al.*, 2004; Hug, 2008).

We observed a reduction in the rate of embryos donated for research over the years despite the continuously increasing number of frozen embryos throughout the same period. Several reasons may impact the decision of embryo donation for research, including the approach applied and the moment of the donation request, the individual's age, status of IVF treatment (whether or not successful), cyostorage period, ethnical and cultural values, religion, political and social environment, cryopreservation fees, and information availability about hESC research and advances (Bangsboll *et al.*, 2004; Choudary *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2007; Hug, 2008; Luna *et al.*, 2009).

In Sweden, 92% of 331 couples preferred to donate their surplus embryos to stem cell research than to discard them. This might be related to the high level of information provided on HESC research and to an altruistic nature of Swedish

couples (Bjuresten & Hovatta, 2003). Lanzendorf *et al.* (2010) observed that patients in the United States (59% of 149 couples) who wanted to discontinue the cryostorage of their embryos were more likely to donate them for research than simply discard them. Bangsboll *et al.* (2004) reported that in Denmark 49% of 101 couples donated their frozen embryos to hESC research, when they were asked about the fate of their embryos. This study, however, was performed with couples for whom the period of embryo storage had exceeded the limits allowed by Denmark's legislation. In a Spanish study, 97 couples were interviewed in two different public IVF units about the fate of their embryos that were being kept frozen for periods longer than 3 years. Forty-six couples had donated 192 embryos (45%) from a total of 428 frozen embryos. It is important to clarify that the results were similar in both IVF units, located in cities with different economic and social profiles (Cortes *et al.*, 2007).

When the law was approved in Brazil, a lot of information was released by the media concerning the hESC research. In 2005, approximately 80 embryonic stem cell-related articles were published in four mainstream Brazilian newspapers, in print and online. In 2006, these sources published 60 news articles. In 2007, 134 news articles were published. In 2008, when the law was finally considered to be in accordance with the country's constitution, 396 news articles were published. Since then, the number of articles published about the subject has diminished: 129 in 2009 and only 68 in 2010. This lack of news on the subject may explain the observed reduction in embryo donation for research.

We believe it is necessary to release information and to promote public debate and discussion to clarify the potential of embryonic stem cell research. Also, couples that have surplus frozen embryos should be contacted by IVF clinics so their apprehensions can be understood and the stem cell research can be elucidated and the procedures demystified. These actions may help increase the number of embryos donated for research in Brazil.

#### Correspondence to:

Selmo Geber - Av do contorno 7747 - Lourdes  
CEP: 30110120 Belo Horizonte - Minas Gerais - Brazil  
Phone: 55 31 21026363 - FAX: 55 31 21026334  
Email: selmogeber@medicina.ufmg.br

#### REFERENCES

- AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010; 20:209-222.
- Allegrucci C, Young LE. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod Update*. 2007; 13:103-120.
- Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat Biotechnol*. 2009; 27:213-214.
- Bangsboll S, Pinborg A, Yding Andersen C, Nyboe Andersen A. Patients' attitudes towards donation of surplus cryopreserved embryos for treatment or research. *Hum Reprod*. 2004; 19:2415-2419.
- Baylis F, Beagan B, Johnston J, Ram N. Cryopreserved human embryos in Canada and their availability for research. *J Obstet Gynaecol Can*. 2003; 25:1026-1031.
- Bjuresten K, Hovatta O. Donation of embryos for stem cell research--how many couples consent? *Hum Reprod*. 2003; 18:1353-1355.
- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet*. 1998; 15:302-307.
- Choudhary M, Haimas E, Herbert M, Stojkovic M, Murdoch AP. Demographic, medical and treatment characteristics associated with couples' decisions to donate fresh spare embryos for research. *Hum Reprod*. 2004; 19:2091-2096.

- Cortes JL, Antinolo G, Martinez L, Cobo F, Barnie A, Zapata A, et al. Spanish stem cell bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:17-20.
- Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Donating spare embryos for stem cell research. *Fertil Steril*. 2009; 91:667-670.
- Fenno LE, Ptaszek LM, Cowan CA. Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; 18:324-329.
- Geber S, Winston RM, Handyside AH. Proliferation of blastomeres from biopsied cleavage stage human embryos in vitro: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. *Hum Reprod*. 2005; 10:1492-1496.
- Hammarberg K, Tinney L. Deciding the fate of supernumerary frozen embryos: a survey of couples' decisions and the factors influencing their choice. *Fertil Steril*. 2006; 86:86-91.
- Hoffman DI, Zellman GL, Fair CC, Mayer JF, Zeitz JG, Gibbons WE, et al. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril*. 2003; 79:1063-1069.
- Hug K. Motivation to donate or not donate surplus embryos for stem-cell research: literature review. *Fertil Steril*. 2008; 89:263-277.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*. 2006; 444:481-485.
- Klimanskaya I, Rosenthal N, Lanza R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:131-142.
- Knopman JM, Talebian S, Berkeley AS, Grifo JA, Noyes N, Licciardi F. Fate of cryopreserved donor embryos. *Fertil Steril*. 2010; 94:1689-1692.
- Krones T, Neuwohner E, Bock K, Manolopoulos K, Tinneberg HR, Richter G. Attitudes of patients, healthcare professionals and ethicists towards embryonic stem cell research and donation of gametes and embryos in Germany. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13:607-617.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11:608-614.
- Lanzendorf S, Ratts V, Keller S, Odem R. Disposition of cryopreserved embryos by infertility patients desiring to discontinue storage. *Fertil Steril*. 2010; 93:486-489.
- Lornage J, Chorier H, Bouliou D, Mathieu C, Czyba JC. Six year follow-up of cryopreserved human embryos. *Hum Reprod*. 1995; 10:2610-2616.
- Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells*. 2009; 27:2126-2135.
- Luna M, Boada M, Aran B, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. Couples' opinions regarding the fate of surplus frozen embryos. *Reprod Biomed Online*. 2009; 19 Suppl 2:11-15.
- McMahon CA, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM, Porter KA, Tennant CC. Embryo donation for medical research: attitudes and concerns of potential donors. *Hum Reprod*. 2003; 18:871-877.
- Mohler-Kuo M, Zellweger U, Duran A, Hohl MK, Gutzwiller F, Mutsch M. Attitudes of couples towards the destination of surplus embryos: results among couples with cryopreserved embryos in Switzerland. *Hum Reprod*. 2009; 24:1930-1938.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001; 19:193-204.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008; 451:141-146.
- Squizato R. Brazilian court decision eases scientists' stem cell worries. *Nat Med*. 2008; 14:699.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007; 2:3081-3089.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983; 305:707-709.
- Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med*. 2009; 7:29.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006; 65:236-244.
- Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*. 2010; 28:589-603.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318:1917-1920.

# Técnicas de reprodução assistida – revisão histórica

## Assisted reproduction techniques - historical review

Jalsi Tacon Arruda<sup>1</sup>; Mônica Canêdo Silva Maia<sup>1</sup>; Tatiana Moreira Silva<sup>2</sup>; Mário Silva Approbato<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Ciências da Saúde – UFG, Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

<sup>2</sup> Mestre em Ciências da Saúde – UFG, Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

<sup>3</sup> Professor titular do Departamento de Gineco-Obstetria da Faculdade de Medicina e orientador no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Diretor do Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. Não há conflitos de interesse.

### RESUMO

Embora a Fertilização *in vitro* tenha sido estabelecida com sucesso nas últimas décadas do século XX, a sua história é muito mais antiga. Vários estudos de diferentes partes do mundo contribuíram para o entendimento do processo reprodutivo e para o desenvolvimento das Técnicas de Reprodução Assistida. Durante as últimas décadas, pesquisas contribuíram para o avanço dessas técnicas. Fertilizar oócitos *in vitro* permitiu a compreensão dos mecanismos da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial. Este estudo realizou uma revisão histórica dos experimentos que ajudaram no desenvolvimento da área e do conhecimento científico.

**Palavras-chave:** técnicas reprodutivas, inseminação artificial, fertilização *in vitro*, ICSI, injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

### ABSTRACT

Although IVF has been successfully established in the last decades of the twentieth century, its history is much older. Several studies from different parts of the world contributed to the understanding of the reproductive process and the development of assisted reproductive techniques. During the last decades, research has contributed to the advancement of these techniques. Fertilize oocytes *in vitro* allowed the understanding of the mechanisms of fertilization and early embryonic development. This study performed a historical review of experiments that helped in developing the area and scientific knowledge.

**Keywords:** reproductive techniques, insemination artificial, *in vitro* fertilization, ICSI, intracytoplasmic sperm injections.

### INTRODUÇÃO

O primeiro relato sobre infertilidade esta no livro de Gênesis (17:17-21:02) na Bíblia, que descreve o caso de Sara e Abraão. Depois de receber a intervenção divina, Sara dá a luz ao filho Isaque aos 90 anos e o pai Abraão com 100 anos. Existem também hieróglifos sobre deuses da fertilidade no Egito e, na Roma antiga a infertilidade era uma razão aceitável para pedir o divórcio.

Embora a Fertilização *in vitro* (FIV) tenha sido estabelecida com sucesso nas últimas décadas do século XX, a sua história é muito mais antiga. Vários estudos de diferentes partes do mundo contribuíram para o entendimento do processo reprodutivo e para o desenvolvimento das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA).

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão histórica da literatura sobre estudos importantes que levaram ao desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida.

### PRINCÍPIO DA REPRODUÇÃO ASSISTIDA – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Os primeiros relatos sobre reprodução assistida foram encontrados em um documento do ano de 1322 que faz referência aos povos árabes que realizavam procedimentos de inseminação artificial com objetivo de criar cavalos mais fortes e resistentes ao calor para a locomoção no deserto. Alguns séculos mais tarde, a primeira inseminação foi descrita cientificamente pelo padre italiano Lázaro Spallanzani, estudante de ciências naturais. Em 1779, colheu sêmen de um cão que circulava pelas imediações do mosteiro e introduziu manualmente no trato reprodutor de uma cadela de estimação durante o período do cio, a qual pariu três filhotes (Graciano, 2002).

Na espécie humana o primeiro relato é atribuído ao médico inglês John Hunter num caso de hipospádia grave em 1790. Muitas tentativas foram feitas após esta data, sendo que o primeiro sucesso ocorreu em 1838 pelo médico francês Girault (Kotecki, 2004). Em 1865 o médico francês F. Dehaut fez a primeira publicação científica sobre o assunto. No ano de 1866, o ginecologista francês Jaime Marion Sims obteve sucesso com a inseminação artificial cientificamente documentada, e em 1884 o médico inglês Pancoast foi o primeiro a realizar a inseminação heteróloga, indicada para azoospermia pós-gonocócica (Graciano, 2002).

A Inseminação Artificial transpõe bloqueios no trato genital inferior, que impedem o transporte dos gametas masculino, colocando-os mais próximos do encontro com o oócito, já que apenas 10% dos espermatozoides móveis adentram na cavidade uterina. Por ser considerada uma técnica simples, várias experiências foram realizadas como a deposição de gametas masculinos no trato reprodutivo feminino. Inicialmente foram utilizadas no tratamento de problemas que impediam a cópula, como vaginismo ou defeitos anatômicos penianos (Kotecki, 2004).

### O SURGIMENTO DA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A primeira tentativa de FIV foi realizada pelo embriologista vienense Leopold Samuel Schenk em 1878 estudando coelhos. Schenk observou a ruptura de células da granulosa após adicionar espermatozoides coletados do epidídimo a foliculos



suspensos em fluido folicular e muco uterino. Entretanto, não houve êxito na fertilização (Pincus & Enzmann, 1937). E esse experimento incentivou à descoberta de hialuronidase no esperma, décadas depois (McClellan & Rowlands, 1942). Em 1891 o fisiologista inglês Walter Heape demonstrou que oócitos de coelha já fertilizados forneciam embriões que poderiam ser recuperados diretamente das trompas e transferidos para uma mãe receptora. A cultura de oócitos foi reconhecida como uma possibilidade favorável no fim do século XIX. Cientistas dessa mesma época já faziam idéia de que o sangue carregava substâncias que afetavam a saúde e o termo “hormônio” foi cunhado apenas em 1905 por William Maddock Bayliss e Ernest Henry Starling (Rohden, 2008). Lewi e Greving, por volta de 1920, caracterizaram o eixo hipotálamo-hipofisário e desvendaram os hormônios essenciais para a fertilidade feminina: hormônio folículo estimulante (FSH – Follicle-Stimulating Hormone), hormônio luteinizante (LH – Luteinizing hormone) e hormônio gonadotrofina coriônica humana (hCG – human Chorionic Gonadotropin) (Rohden, 2008).

O biólogo americano Gregory Goodwin Pincus estudou oócitos de coelhas e em 1934 publicou, com o colega Ernst Vinzenz Enzmann, os primeiros experimentos sobre FIV, no qual afirmavam ter produzido a primeira gravidez bem sucedida. No entanto, análises posteriores do estudo sugeriram que a fertilização ocorreu tecnicamente *in vivo* e não *in vitro*, já que os oócitos transferidos foram fertilizados, provavelmente, na trompa da coelha receptora; procedimento conhecido como GIFT – Gamete Intra-Fallopian Transfer (Pincus & Enzmann, 1937). Este estudo permitiu novas idéias sobre as fases de maturação dos oócitos de coelhas obtidos diretamente dos ovários, visto que durante o experimento eles observaram diferentes estágios de folículos. Pincus ficou conhecido também pelo desenvolvimento da pílula anticoncepcional mais tarde na década de 50, juntamente com Carl Djarassi.

Após experiências com modelos animais, as primeiras observações em humanos foram relatadas pelo médico John Rock e seu colaborador Arthur Hertig em 1938 quando analisavam histerectomias realizadas logo após a ovulação na esperança de observar oócitos fertilizados. Em colaboração com a assistente Mirian Menkin, em 1944, oócitos não fertilizados foram cultivados na presença de esperma coletado de estagiários do Dr. Rock, e ao final do período de incubação observaram blastômeros regulares. Em 1948, expuseram oócitos a espermatozóides *in vitro* e notaram clivagem em quatro oócitos, porém nenhuma transferência foi realizada. Após quatro anos de pesquisa, o projeto foi abandonado por ser considerado impossível (Menkin & Rock, 1948).

Em 1951, Min Chueh Chang nos Estados Unidos e Colin Russell Austin na Austrália notaram que os espermatozóides necessitavam de uma etapa prévia para a fertilização, surgindo novas idéias sobre a capacitação espermática (Austin, 1951; Chang, 1951). Novos métodos de preparo do sêmen foram pesquisados proporcionando o processamento espermático – espermatozóides separados do plasma seminal, aumentando a concentração dos espermatozóides móveis (Chang, 1959; Edwards, 2004). Até esse ponto da história os critérios que confirmavam que o oócito havia sido fertilizado pelo espermatozóide variavam desde a emissão do segundo corpúsculo polar, a formação de pró-núcleos e a clivagem. Devido a essa falta de padronização das definições de “fertilização” e “concepção”, as taxas de sucesso variavam significativamente causando confusão.

O biólogo britânico Robert Geoffrey Edwards professor na Universidade de Cambridge, acredita que o que frustrou

os trabalhos de pesquisadores como Menkin e Rock foi a não-compreensão do conceito de capacitação do sêmen, elucidado posteriormente por Chang. Edwards conduzia seus estudos sobre embriologia de mamíferos, investigava a ovulação em ratos fêmea e também as primeiras observações de oócitos humanos em diferentes estágios de maturação *in vitro* (Edwards, 1965; 2004).

Havia uma dificuldade em conseguir mais oócitos por ciclo que, até este momento, eram ciclos naturais. Edwards percebeu que os espermatozóides eram abundantes enquanto que o oócito não e, a partir desse fato, estudou a sincronização de oócitos para obter um número maior disponível para recuperação em ratos fêmea, originando uma série de estudos sobre controle da ovulação induzida por uso de hormônios exógenos (Fowler & Edwards, 1957). Trabalhando em conjunto com Alan Gates, descreveram uma sequência de eventos que levava a ovulação após a injeção hCG extraído de éguas prenhas, o que induzia os oócitos a amadurecerem num tempo previsível (Edwards & Gates, 1959). Em colaboração com o ginecologista Patrick Christopher Steptoe, estudaram a recuperação de oócitos inicialmente através de laparoscopia utilizada no tratamento da síndrome dos ovários policísticos, com ressecção em cunha dos ovários. Essa colaboração começou em 1968, quando Edwards assistiu a uma palestra que Steptoe proferiu sobre laparoscopia na Royal Society of Medicine, em Londres (Edwards, 1965; 2004; Johnson, 2010).

A primeira gravidez obtida através da FIV em humanos foi uma gravidez tubária, em uma mulher de 35 anos com infertilidade por fator tubário, em 1976. Após estimulação ovariana, quatro oócitos foram obtidos. Algumas horas depois um oócito foi fertilizado (clivado até o estágio de 16 células), mas resultou em gestação ectópica removida com 13 semanas (Steptoe & Edwards, 1976). Edwards e Steptoe trabalhavam com o casal infértil Lesley e John Brown. Numa tentativa bem sucedida, um oócito obtido por ciclo natural foi fertilizado *in vitro* e à meia-noite um embrião de oito células foi transferido. O verdadeiro marco que estabeleceu o início de uma nova era na Medicina Reprodutiva deu-se com o nascimento de Louise Joy Brown, em 25 de julho de 1978 (Steptoe & Edwards 1978). Esse marco ocorreu um século após as primeiras tentativas de fertilização *in vitro* em mamíferos, realizada por Schenk em 1878.

No início da década de 80 um grupo australiano foi o primeiro a repetir o sucesso da FIV. Nascia então Candice Reed, após transferência de um oócito no estágio de oito células, originário de um único oócito aspirado por laparoscopia, durante ciclo natural (Lopata *et al.*, 1980). Os pesquisadores Howard W. Jones e Georgeanna Jones dos Estados Unidos obtiveram oócitos por indução da ovulação com gonadotrofina menopausal humana (hMG – human Menopausal Gonadotropins) e hCG, e em 1981 nasceu Elizabeth Carr Comeau (Jones *et al.*, 1982).

Ana Paula Bettencourt Caldeira foi o primeiro bebê gerado por FIV no Brasil e na América Latina, aos 07 de outubro de 1984 em São Paulo. No mesmo ano nasceu em Melbourne na Austrália, Zoe Leyland, o primeiro bebê desenvolvido a partir de um embrião descongelado, por Alan Trounson e Carl Wood (Trounson *et al.*, 1983).

Novas técnicas para punção folicular foram propostas além da laparoscopia realizada com anestesia geral e entubação, elevando os riscos do procedimento e intervenção. A ultrassonografia passou a ser utilizada para guiar uma agulha através da parede vaginal para recuperação dos oócitos nos ovários. Usando esse método, os riscos associados com a anestesia necessária para

a laparoscopia, bem como os custos do procedimento foram consideravelmente reduzidos (Dellenbach et al., 1985). O uso do ultrassom na punção folicular alcançou resultados indiscutíveis e essa evolução ocorreu simultaneamente com o monitoramento da ovulação e o desenvolvimento dos equipamentos que permitiam acompanhar o ciclo (Passos, 2004).

O conhecimento endocrinológico também evoluiu nessa época, melhorando a qualidade da estimulação da ovulação com a perspectiva de desenvolvimento folicular adequado, com menos riscos. Exames de sangue para dosagens hormonais também eram solicitados. Apesar de Steptoe e Edwards terem usado gonadotrofinas no fim da década de 70, somente em 1981 houve relato da primeira gestação com o emprego destas medicações em conjunto com a FIV (Trounson et al., 1981). Assim, a FIV se firmou como um procedimento clínico utilizado por centros no mundo todo.

### OUTRAS PERSPECTIVAS DE USO DAS TRAS

A doação de oócitos foi indicada para casos de insuficiência ovariana, menopausa precoce, disgenesia ovariana ou ooforectomias bilaterais, mas também nas situações de presença da função ovariana, mas com falhas repetidas. A primeira gestação proveniente de oócitos doados ocorreu em uma mulher sem ovários, mas resultou em abortamento no primeiro trimestre (Trounson et al., 1983). Alguns meses depois, Lutjen et al., relataram o nascimento de uma criança proveniente de oócito doado anonimamente para tratamento de insuficiência ovariana precoce, além de ser o pioneiro a usar estimulação ovariana controlada para a doadora (Lutjen et al., 1984). Em 1985, Quinn et al., publicaram uma fórmula que mimetizava o fluido das trompas humanas, chamando de meio de cultura HTF – Human Tubal Fluid, imitando o ambiente in vivo ao qual o embrião fica exposto (Quinn et al., 1985).

Na década de 80 outras formas de fertilização realizada em laboratório, consideradas mais complexas, foram descritas. Fernandez et al., publicaram a primeira gestação obtida por transferência intra tubária de gametas (GIFT), em 1984, no Chile (Fernandez et al., 1985). Contudo, os primeiros relatos sobre micromanipulação de gametas são do final da década de 70 quando Uehara e Yanagimachi injetaram o núcleo isolado do espermatozóide em um oócito de hamster (Uehara & Yanagimachi, 1976). A microinjeção de espermatozóide sob a zona pelúcida (microinjection of a few spermatozooids under the pellucid zone) foi proposta por Ng et al., em Singapura que relataram o primeiro nascimento com uso dessa técnica (Ng et al., 1988).

A partir desses trabalhos Lanzendorf et al., realizaram a primeira avaliação pré-clínica da formação de pró-núcleos por microinjeção de espermatozóide dentro do oócito e, assim, surgiu a injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI – *IntraCytoplasmic Sperm Injection*), onde um único espermatozóide é injetado dentro do oócito maduro (Lanzendorf et al., 1988). Em 1992 Palermo et al., relataram sucesso após o uso de ICSI em 47 oócitos maduros, verificando que 38 permaneceram intactos após a microinjeção (Palermo et al., 1992). Quatro gestações foram obtidas após 8 ciclos de tratamento, sendo duas gestações únicas, uma gemelar e um aborto pré-clínico. Já em 1993 utilizaram a ICSI em 716 oócitos (em Metáfase II) para tratamento do fator masculino e também com TESE (*Testicular Sperm Extraction*) para casos de azoospermia não obstrutiva (Palermo et al., 1993; Devroey et al., 1995).

O sucesso da ICSI abriu novas perspectivas principalmente para homens considerados até então como “estéreis”. Os primeiros casos de gravidez com espermatozoides aspirados do epidídimo foram obtidos entre o final da década de 80 utilizando a FIV. Entretanto, o baixo número de espermatozoides obtidos e com motilidade reduzida causavam resultados desanimadores. Com o surgimento da ICSI as taxas de sucesso aumentaram passando de 11% com a FIV convencional, para 30-35% com a ICSI (Passos, 2004).

O microscópio com micromanipulador utilizado para ICSI possibilita um aumento de 400 vezes para seleção do espermatozóide com melhor morfologia. O grupo do professor Benjamin Bartoov, bioquímico e andrologista israelense especialista em morfologia espermática, relataram que quanto mais alterações morfológicas no espermatozóide, maior a incidência de alterações genéticas nestes e, conseqüentemente, piores taxas de sucesso. Desenvolveram então o microscópio micromanipulador de Alta Magnificação ou Super-ICSI como é chamado no Brasil, e injeção intracitoplasmática de espermatozoides selecionados morfológicamente (*Intracytoplasmic Morphology Selected Sperm Injection* – IMSI) como é conhecido internacionalmente, que amplifica 6.000 vezes o espermatozóide possibilitando uma análise minuciosa para seleção da melhor morfologia (Bartoov et al., 2003). Outros avanços foram obtidos após inúmeras pesquisas. Durante o 23o Encontro anual da European Society of Human Reproduction and Embryology realizado em 2007, em Lyon – França, trabalhos apresentados enfatizavam a criopreservação de gônadas e gametas como um procedimento promissor (ESHRE, 2007). A maturação in vitro de oócitos (IVM – *In Vitro Maturation*) é uma técnica que consiste na maturação dos oócitos em laboratório, e os primeiros resultados brasileiros de sucesso aconteceram em 2007 (Frantz et al., 2010).

Houve também a evolução das técnicas de análises genéticas tanto para os pais quanto dos embriões em formação através do Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (PGD – *Pre-implantation Genetic Diagnosis*) ou triagem pré-implantação (PGS – *Pre-implantation Genetic Screening*). O núcleo de um blastômero é analisado para desordens genéticas, o que beneficia casais com alto risco genético de ocorrência de doenças de etiologia autossômica dominante ou recessiva. A constituição cromossômica destes blastômeros pode ser analisada por testes como a hibridização fluorescente in situ (FISH – *Fluorescent in situ hybridization*) ou a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). Os casais também podem procurar ajuda de profissionais em relação ao aconselhamento genético, que auxilia no esclarecimento sobre as chances de ocorrência das doenças genéticas.

### ATUAL SITUAÇÃO NO BRASIL

As TRAs são regulamentadas no Brasil pelas normas éticas definidas na resolução do Conselho Federal de Medicina (CFM), última atualização publicada em 06 de janeiro de 2011 no Diário Oficial da União. A versão anterior já apresentava grandes avanços e o CFM sentiu a necessidade de se adaptar à evolução tecnológica e modificações de comportamento social. Ponderou sobre a reprodução assistida post-mortem, desde que comprovada autorização prévia. Permite que as TRAs sejam desenvolvidas em todas as pessoas, independentemente de estado civil ou orientação sexual, já que a medicina não tem preconceitos e deve respeitar todos de maneira igual. Define o número máximo de embriões a serem transferidos, já que a recomendação dependerá da idade da paciente, não podendo ser superior a quatro embriões. E permanecem as diretrizes éticas como a proibição de

que as técnicas de reprodução sejam aplicadas com a intenção de selecionar sexo ou qualquer característica biológica do futuro filho.

Existem vários centros de Reprodução Humana no país, a grande maioria particular e poucos serviços públicos gratuitos, alguns cobram o custo do material utilizado e os pacientes também arcam com a medicação. Essa situação ainda se agrava quando se observa que além do insuficiente número de centros públicos 80% desses estão em São Paulo e distribuídos de maneira desigual no próprio Estado e no País como um todo (RedLara, 2006).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos grandes desafios para o século 21 é tornar as técnicas acessíveis àqueles que delas possam se beneficiar. Avanços marcantes ocorreram com a inclusão de novos equipamentos, meios de cultura e reagentes melhorados, técnicas modernas de transferência embrionária e a análise do DNA tanto dos gametas quanto do embrião já formado. Um dos desafios atuais é a redução do número de gestações múltiplas e aumento da taxa de gravidez. Todo avanço das Técnicas de Reprodução Assistida geram consequências que devem ser regulamentadas por órgãos competentes. Contudo, o código civil brasileiro ainda é insuficiente, não abrangendo as novas realidades como a formação dos novos laços sociais, ou a doação de gametas e embriões. Décadas se passaram desde o primeiro sucesso, mas o ideal continua sendo o mesmo até os dias atuais: realizar o sonho de constituir uma família!

## Correspondência:

Jalsi Tacon Arruda

Email: jalsitacon@gmail.com

Endereço para correspondências: Rua 208A, nº115, ap. 1403A, Vila Nova, Goiânia-GO, CEP. 74635-030

## REFERENCIAS

Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res.* 1951;4:581-596.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril.* 2003;80:1413-1419.

Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature.* 1959;184:466-467.

Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature.* 1951;168:697-698.

Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P. Transvaginal sonography controlled follicular puncture for oocyte retrieval. *Fertil Steril.* 1985;44:656-662.

Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1995;10:1457-1460.

Edwards RG, Gates AH. Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization, and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. *J Endocrinol.* 1959;18:292-304.

Edwards RG. Introduction: the beginnings of human in vitro fertilization. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z editors. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives.* 2nd ed. 2004. p.1-16.

Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet.* 1965;2:926-929.

ESHRE. 23 rd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embriology - 2007. Disponível em: [http://humrep.oxfordjournals.org/content/vol22/suppl\\_1/index.dtl](http://humrep.oxfordjournals.org/content/vol22/suppl_1/index.dtl) Acesso em: 07 junho 2012.

Fernandez E, Zegers F, Hess R, Roblero L, Ortiz ME, Guadarrama A, et al. Transferencia intratubaria de gametas (TITG, GIFT): comunicación del primer embarazo. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 1985;50(5):356-62.

Fowler RE, Edwards RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol.* 1957;15:374-384.

Frantz N, Ferreira M, Frantz G, Höher M, Oliveira N, Carvalho TG, Bos-Mikich A. Maturação in vitro de oócitos em ciclos não estimulados para pacientes portadoras de ovários policísticos. *J Bras Reprod Assist;* 2010;14(2):24-26.

Graciano LL. Reprodução humana assistida: determinação da paternidade e o anonimato do doador. In: X Seminário de Iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUC-PR. *Caderno de Resumos Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da PUC-PR,* 2002. p. 64.

Johnson MH. Robert Edwards: Nobel laureate in physiology or medicine. Nobel Lecture/Nobel Prize Symposium in Honour of Robert G. Edwards, December 7, 2010.

Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, et al. The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril.* 1982;38:14-21.

Kotecki JA. Desempenho de protocolos de estimulação ovariana para inseminação artificial. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 2004.

Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril.* 1988;49:835-842.

Lopata A, Johnston IW, Hoult IJ, Speirs AL. Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril.* 1980;33:117-120.

Lutjen PJ, Trounson AO, Leeton JF, Findlay JK, Wood EC, Renou PM. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature.* 1984;307:174-175.

McClellan D, Rowlands IW. Role of hyaluronidase in fertilization. *Nature.* 1942;150:627-628.

Menkin MF, Rock J. "In vitro" fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Am J Obstet Gynecol.* 1948;55:440-451.

Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CLK, Wong PC, et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet.* 1988;2:790.

Palermo G, Joris H, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1993;59:826-835.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992;340:17-18.

Passos EP. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. *Rev Gynaecol Pract.* 2004;4:199-202.

Pincus G, Enzmann EV. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J Morphol.* 1937;61:351-383.

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril.* 1985;44:493-498.

RedLara (2006). Registro Latinoamericano de Reprodução Assistida. Disponível em: <http://www.redlara.com> Acesso em: 26 setembro 2012.

Rohden F. O império dos hormônios e a construção da diferença entre os sexos. *Hist cienc saude-Manguinhos (online),* 2008;15(supl.):133-152.

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of human embryo. *Lancet.* 1978;312:366.

Steptoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.* 1976;1:880-882.

Trounson AO, Leeton JF, Besanko M, Wood EC, Conti A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilized in vitro. *Br Med J.* 1983;286:835-838.

Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Successful human pregnancies by in vitro fertilization and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science.* 1981;212:681-682.

Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.* 1976;15:467-472.

# Vesícula germinativa recorrente, resistente à maturação in vitro: relato de caso

## Recurrent germinal vesicle resistant to in vitro maturation: case report

Nícolas Thiago Nunes Cayres de Souza<sup>1</sup>, Hitomi Miura Nakagava<sup>1</sup>, Íris de Oliveira Cabral<sup>1</sup>, David Barreira Gomes Sobrinho<sup>1</sup>, Antônio César Paes Barbosa<sup>1</sup>, Bruno Ramalho de Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GENESIS – Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, DF

Trabalho apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida, Guarujá, São Paulo, 2012.

Os autores do presente estudo declaram que não têm nenhum conflito de interesse sobre o conteúdo discutido no texto, incluindo relações de trabalho, assessoria, honorários e direitos dos autores.

### RESUMO

A identificação da vesícula germinativa (VG) em oócitos obtidos após estimulação para fertilização in vitro (FIV) sugere interrupção da maturação na fase de prófase I da meiose, identificável pela observação de nucléolo compacto típico. O cancelamento de ciclos de FIV por persistência da VG constituiu frustração para o casal infértil e para a equipe que o assiste, além de caracterizar-se como desafio imprevisível em serviços de medicina reprodutiva, com poucos casos descritos na literatura. Relatamos um caso de reincidência de imaturidade em amostra total de oócitos após estimulação controlada para FIV, seguida de falha total de maturação in vitro (MIV), em paciente jovem portadora de endometriose. **Palavras chave:** Fertilização In Vitro, Oócitos, Meiose, Endometriose, Maturação in Vitro.

### ABSTRACT

The identification of the germinal vesicle (GV) of oocytes following stimulation for in vitro fertilization (IVF) suggests maturation arrest in prophase I stage of meiosis, identifiable by the observation of compact typical nucleolus. The cancellation of IVF cycles associated to persistence of GV is a frustrating experience for the infertile couple and the whole staff. It remains an unpredictable challenge for reproductive health services, with a few cases reported. We present a case of recurrent immature oocyte retrieval with all of them immature after controlled stimulation for IVF, followed by total failure of in vitro maturation (IVM), in a young patient with endometriosis.

**Keywords:** In Vitro fertilization, Oocytes, Meiosis, Endometriosis, in Vitro Maturation

### INTRODUCTION

Com o recrutamento folicular, o oócito retoma o processo de divisão meiótica que vinha quiescente desde o período embrionário. A vesícula germinativa (VG) corresponde a um dos estágios pelo qual o oócito imaturo passa após quebrar a fase de quiescência e caracteriza-se pela presença de um grande núcleo preenchido por um nucléolo compacto conhecido como corpúsculo nucléolo-like (NLB). Após o pico ovulatório de hormônio luteinizante (LH) o processo de divisão meiótica prossegue culminando com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, quando então o oócito atinge a maturidade, ou seja, metáfase II (MII), estado em que permanece até a fecundação (Escrich *et al.*, 2010).

Estima-se que cerca de 30% dos oócitos captados em ciclos de estimulação ovariana controlada seja imaturo, o que pode variar de acordo com a idade da paciente e o grau de assincronia folicular no momento do gatilho com gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Lee *et al.*, 2012). Mesmo assim, a imaturidade total dos oócitos após estimulação controlada para fertilização in vitro (FIV) é um fenômeno raro, com poucos casos descritos na literatura.

Inicialmente utilizada para oócitos captados em ciclos sem estimulação, como alternativa em pacientes com alto risco para desenvolver a síndrome de hiperestímulo ovariano (Jurema & Nogueira, 2006), a maturação oocitária in vitro (MIV) ganha espaço nos últimos anos como opção para recuperação oocitária em pacientes más respondedoras, pacientes oncológicas com contra-indicação para estimulação gonadotrófica ou mesmo como escolha por profissionais que questionam os efeitos adversos da sobrecarga hormonal a que são expostas pacientes candidatas a FIV (Melvin *et al.*, 1998; Oktay *et al.*, 2008).

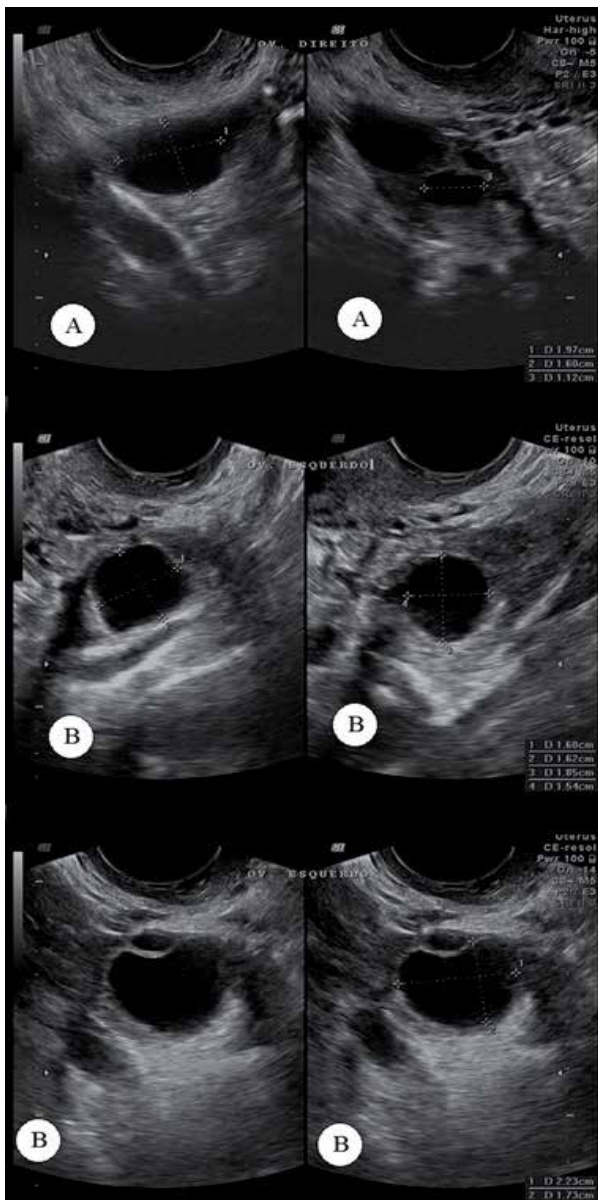
Os cancelamentos de ciclos de FIV constituem frustração para o casal infértil e para a equipe que o assiste e desafio em serviços de medicina reprodutiva, principalmente quando decorrentes de fatores pouco conhecidos e cuja abordagem é uma incógnita. Pouco se sabe atualmente a respeito do manejo da VG, mas a MIV se constituiria numa alternativa teórica para o problema. Relatamos um caso de reincidência da VG em amostra total de oócitos após estimulação controlada para FIV em paciente jovem, com falha total de MIV.

### DESCRIÇÃO DO CASO

Paciente de 32 anos, portadora de endometriose grau IV (*American Society for Reproductive Medicine*, 1997) com quadro de infertilidade primária e dor pélvica crônica há cinco anos. Havia sido submetida à primeira videolaparoscopia (VLP) três anos antes com adesiólise pélvica e se constatou obstrução tubária esquerda, e ao segundo procedimento um ano antes, para nova lise de aderências. Procurou a GENESIS – Centro de Assistência em Reprodução Humana em uso de goserelina por 18 meses, com melhora dos sintomas algícos. Marido com 57 anos, vasectomizado há 20 anos, saudável, com dois filhos de relacionamento anterior e sêmen criopreservado, obtido por aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA). A avaliação laboratorial do casal não revelou alterações.

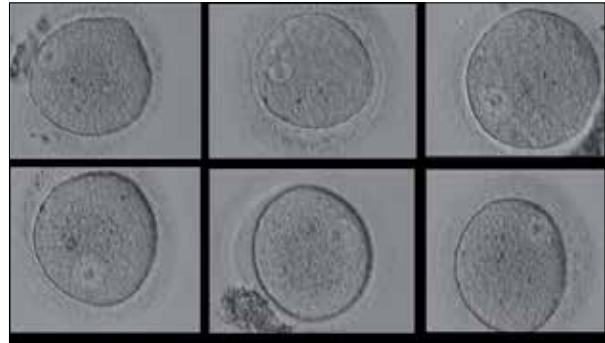
Aproveitou-se o bloqueio hipofisário obtido com a goserelina em uso e administrou-se nova dose do análogo para protocolo ultralongo (Nakamura *et al.*, 1992), no primeiro ciclo de indução. Passados 30 dias, a paciente evoluiu com fogachos, dismenorréia e sangramento uterino anormal; então, foi-lhe prescrito tibolona, na dose de 2,5 mg/dia por 30 dias, período após o qual se iniciou estimulação com folitrofina recombinante (FSHr) na dose de 225 UI/dia, porém o ciclo foi cancelado por resposta monofolicular.

Para uma nova tentativa terapêutica, foi prescrito desogestrel na dose diária de 75 µg durante sessenta dias, após os quais se instituiu novo ciclo com protocolo longo, utilizando-se acetato de leuprolida, na dose de 0,1 mL/dia, pela via subcutânea, reduzindo-se para 0,05 mL/dia ao início do FSHr, na dose de 200 UI/dia, associado a luteotrofina recombinante (LHr), 75 UI/dia. O controle ultrassonográfico do décimo primeiro dia de indução revelou três folículos em cada ovário, com diâmetros médios de 19mm, 18mm e 11mm em ovário direito e 20mm, 17mm e 16mm em ovário esquerdo (Figura 1).



**Figura 1.** Ovulograma no 11º dia de indução do 2º ciclo. Imagens ecográficas de ovários direito (A) e esquerdo (B). GENESIS, 2011- Banco de imagens.

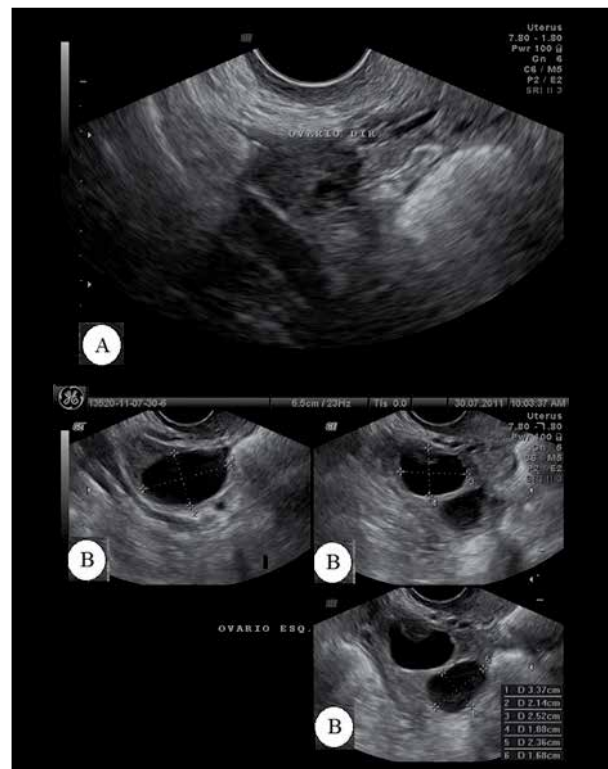
A maturidade oocitária final foi, então, induzida com hCG recombinante, em dose única subcutânea de 250 µg, e, após 35 horas, foram recuperados 6 óocitos em fase de VG, com ausência de maturação após 24 horas de cultivo em meio tamponado com bicarbonato contendo carboidratos e aminoácidos essenciais ao preparo de gametas, enriquecido com albumina humana (G-IVF™ Plus, Vitrolife, Göteborg, Suécia) - Figura 2.



**Figura 2.** Oócitos em fase de vesícula germinativa, captados após 2º ciclo de estimulação ovariana. GENESIS, 2011 Banco de dados do Laboratório de Reprodução.

Cinco meses depois, houve nova tentativa terapêutica com protocolo longo utilizando-se acetato de leuprolida, 0,05 mL/dia, associado a FSHr, 225 UI/dia e LHr, 75 UI/dia. A maturidade oocitária final foi induzida com hCGr, 250 µg, no décimo primeiro dia de indução, quando a monitoração ultrassonográfica revelou ausência de folículos em ovário direito e três folículos em ovário esquerdo, cujos diâmetros médios eram de 27mm, 22mm e 20mm (Figura 3).

Trinta e cinco horas depois, foram recuperados 3 óocitos em fase de VG (Figura 4), novamente sem MIV após 24 horas.



**Figura 3.** Ovulograma no 11º dia de indução do 3º ciclo. Imagens ecográficas de ovários direito (A) e esquerdo (B). GENESIS, 2011- Banco de imagens.





**Figura 4.** Oócitos em fase de vesícula germinativa, captados após 3º ciclo de estimulação ovariana.GENESIS, 2011 Banco de dados do Laboratório de Reprodução.

## DISCUSSÃO

A interferência negativa da idade sobre os resultados reprodutivos em técnicas de reprodução assistida (TRA) já foi extensamente demonstrada (Dunson *et al.*, 2002; Centers for Disease Control and Prevention, 2009; Zegers-Hochschild *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012a; Carvalho *et al.*, 2012b) e a idade avançada da mulher infértil apresenta significativa capacidade de prever a ocorrência de má resposta folicular (Gomes *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2010). Mas a demonstração de taxas altas de imaturidade oocitária em populações jovens submetidas a ciclos de estimulação ovariana demonstrada por outros autores (Moore *et al.*, 2007) é motivo de preocupação e gera interesse na pesquisa de fatores que justifiquem o problema.

Para alguns autores, extremos etários tendem a apresentar maiores taxas de oócitos imaturos. Lee *et al.* buscaram provar tal afirmativa ao avaliarem a taxa de imaturidade oocitária estratificada por idade em 195 ciclos de FIV com protocolo antagonista, em que as pacientes apresentavam características semelhantes no que concerne às causas de infertilidade, níveis basais de FSH e índices de massa corpórea. Observaram que, apesar do número total de oócitos captados diminuir de acordo com a faixa etária e, proporcionalmente, a quantidade absoluta de oócitos imaturos, os percentuais de oócitos em fase de VG foram de 37,9%, 32,4% e 23,3% para as faixas etárias com idade < 30 anos, de 31 a 35 anos e de 36 a 40 anos, respectivamente; em contrapartida, aumentou no grupo com idade superior a 40 anos (52,5%) (Lee *et al.*, 2010).

Em geral, espera-se que pacientes jovens sejam boas respondedoras, com base na crença de possuírem reserva ovariana abundante e de melhor qualidade (Carvalho *et al.*, 2012c). As principais hipóteses para as maiores taxas de imaturidade folicular em população jovem são: (a) heterogeneidade do desenvolvimento folicular a que as candidatas à FIV estão propensas e uso precoce do gatilho para maturidade sobre folículos jovens, para os quais o adiamento do momento da captação após a realização do gatilho com intervalo de 41 horas ao invés das 35 habitualmente adotadas poderia ser uma alternativa (Levrant *et al.*, 2002); (b) deficiência de hormônio luteinizante (LH), para os quais a suplementação da gonadotrofina associada ao FSH seria solução (Huddleston *et al.*, 2009). As estratégias apontadas seriam alternativas pertinentes para o manejo do caso em debate, mas a resposta folicular baixa nos três ciclos realizados, com 100% de imaturidade oocitária dos oócitos das captações e sem melhora no padrão de resposta mediante a associação de LH a partir do segundo ciclo, nos leva a questionar a existência de um fator oocitário (Hourvitz *et al.*, 2010) ou do ambiente folicular envolvido na gênese do quadro, e nos remete à reflexão sobre a qualidade dos meios utilizados para MIV.

Questiona-se a existência de pontos de controle da transição entre fases distintas do ciclo celular de oócitos, tal como existem em células somáticas; em oócitos imaturos o fator promotor de maturação (MPF), do qual depende a transição de VG para metáfase I e cuja atividade máxima ocorre normalmente nessa fase, estaria presente sob uma forma inativa fosforilada (Mrazek & Fulka, 2003; Beall *et al.*, 2010). Experiências com camundongos em que foi suprimida a expressão do gene *Cdc25B*, responsável pela atividade do MPF, demonstraram que gametas provenientes dessas cobaias eram incapazes de evoluir além do estágio de vesícula germinativa, mesmo quando cultivados *in vitro* (Lincoln *et al.*, 2002). Em humanos, contudo, sabe-se que a evolução do estágio de VG também é regida pelo MPF, porém até o momento não foram identificadas as alterações genéticas exatas envolvidas no processo (Mrazek & Fulka, 2003).

É importante salientar que não foi realizado qualquer tipo de suplementação ao meio de cultivo empregado para a incubação oocitária no caso em debate. Em relação a este aspecto, um estudo realizado em Israel, que avaliou o cultivo de oócitos imaturos em meio enriquecido com FSHr e Lhr, demonstrou-se promissor para MIV em pacientes previamente incapazes de produzir oócitos maduros em repetidos ciclos de estimulação ou que, mesmo após obtenção de oócitos em fase de MII, reincidiram na produção de embriões de baixa qualidade (Hourvitz *et al.*, 2010). Apesar da pequena amostra, os resultados obtidos pelo grupo israelense são encorajadores ao abordarem a problemática de pacientes com fator oocitário e, de forma geral, a literatura tem mostrado resultados promissores para MIV, com eficácia variando de acordo com a idade da paciente, meio de cultivo utilizado e comorbidades associadas. Entretanto, ainda há inúmeras lacunas referentes ao seu entendimento e se levantam controvérsias, já que oócitos imaturos provenientes de ciclos de estimulação ovariana já teriam sofrido exposição prévia *in vivo* a gonadotrofinas e sua suplementação em meios específicos não ofereceria maiores benefícios (Moschini *et al.*, 2011).

Há pouco menos de uma década, foi demonstrado que a estimulação ovariana com LH em camundongos leva à produção de ampiregulina (Areg) e epiregulina (Ereg), membros da família dos fatores de crescimento epidérmico que funcionam como mediadores parácrinos na modulação da resposta oocitária ao LH (Park *et al.*, 2004). A descoberta da expressão significativa da Areg no fluido folicular humano (Inoue *et al.*, 2009) motivou a intenção de se testar a suplementação de meios de cultivo com membro da família dos fatores de crescimento epidérmico; em estudo piloto com VG humanas obtidas após estimulação com gonadotrofinas, 75,5% dos gametas imaturos cultivados em meio adicionado de Areg e Ereg atingiram maturidade *in vitro*, enquanto que apenas 36,5% dos gametas foram maturados no mesmo meio sem adição dos fatores, diferença essa estatisticamente significativa (Ben-Ami *et al.*, 2011).

No caso em debate há que se considerar ainda a interferência da endometriose sobre a maturação in vivo dos gametas. Um grupo de pesquisadores brasileiros analisou por microscopia de fluorescência as características do fuso celular e cromossômicas dos oócitos classificados morfológicamente como MII de pacientes com endometriose e controles (fatores tubário e/ou masculino de infertilidade) após MIV e constatou tendência à ocorrência de proporção superior de oócitos em telófase I no grupo com endometriose (27,8% versus 9,1%), sugerindo que oócitos considerados maduros por critérios morfológicos, podem não ter concluído a primeira divisão meiótica (Barcelos *et al.*, 2008; Barcelos *et al.*, 2009). Diante do que foi exposto, fica claro que, apesar dos avanços na técnica de MIV, com registros de sucesso de ciclos, ainda existem lacunas referentes ao seu entendimento. O cancelamento de ciclos de FIV devido à persistência da VG constitui frustração para o casal infértil e a equipe que o assiste e um desafio para serviços de medicina reprodutiva. Até o momento, tivemos notícia de apenas 20 casos descritos na literatura referentes à falha total de maturação oocitária após regimes de estimulação ovariana (Beall *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010), o que reflete a necessidade de mais estudos sobre o tema, propiciando principalmente investimento em meios de cultivo que aperfeiçoem o processo, melhorias das taxas de gravidez e nascimentos, e, ainda, melhor compreensão do fator oocitário, que parece ser multifatorial, com ênfase para os mecanismos genéticos envolvidos, idade, reserva ovariana e possível associação com endometriose.

#### Correspondência:

Bruno Ramalho de Carvalho. GENESIS - Centro de Assistência em Reprodução Humana. SHLS 716, Bloco "L", Salas "L" 328/331 - Centro Clínico Sul -Ala Leste. Brasília, Distrito Federal, CEP: 70.390-907. Telefax: + 55 61 3345-8030 - E-mail: bruno@genesis.med.br.

#### REFERÊNCIAS

American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis:1996. *Fertil Steril.* 1997;65(5):817-21.

Banwell KM, Thompson JG. In vitro maturation of Mammalian oocytes: outcomes and consequences. *Semin Reprod Med.* 2008;26:162-174.

Ben-Ami I, Komsky A, Bern O, Kasterstein E, Komarovsky D, Ron-El R. In vitro maturation of human germinal vesicle-stage oocytes: role of epidermal growth factor-like growth factors in the culture medium. *Hum Reprod.* 2011;26(1):76-81

Barcelos IDEs, Vieira RC, Ferreira EM, Picinato MC, Araújo M, Martins WP, Ferriani RA, Albuquerque PA, Navarro S. Anomalias meióticas de oócitos de pacientes com endometriose submetidas à estimulação ovariana. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30(8):413-9.

Barcelos ID, Vieira RC, Ferreira EM, Martins WP, Ferriani RA, Navarro PA. Comparative analysis of the spindle and chromosome configurations of in vitro-matured oocytes from patients with endometriosis and from control subjects: a pilot study. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1749-52.

Beall S, Brenner C, Segars J. Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertil Steril.* 2010;94(7): 2507-13.

Carvalho BR; Cabral IO; Nakagava HM; Silva AA; Barbosa ACP. Woman's age and ovarian response in ICSI cycles. *JBRA - Assisted Reproduction.* 2010;14(1):24-27.

Carvalho BR; Silva AA; Cabral IO; Gomes Sobrinho DB; Nakagava HM; Barbosa ACP. Laboratory air quality upgrade from ISO class 7 to ISO class 5 improves ICSI outcomes in young infertile women. *JBRA - Assisted Reproduction.* 2012a;16(1):23-26.

Carvalho BR; Resende MPS; Nakagava HM; Cabral IO; Barbosa ACP; Silva AA. Outcomes of in vitro fertilization cycles, according with female age groups. *Brasília Med.* 2012b [In Press].

Carvalho BR, Gomes Sobrinho DB, Vieira ADD, Resende MPS, Barbosa ACP, Silva AA, Nakagava HM. Ovarian Reserve Assessment for Infertility Investigation. *ISRN Obstet Gynecol* 2012c, Article ID 576385. doi:10.5402/2012/576385.

Centers for Disease Control and Prevention. Assisted Reproductive Technology (ART) Report: 2009 National Summary. Available at: <http://apps.nccdc.gov/art/Apps/NationalSummaryReport.aspx>. Accessed: 2011 Jul 27.

Chen ZQ, Ming TX, Nielsen HI. Maturation of human oocytes at germinal vesicle stage. *J Hum Reprod Sci.* 2010; 3(3): 153-7.

Dunson DB, Colombo B, Baird DD. Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Human Reproduction.* 2002;17(5):1399-1403.

Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escrivá MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril.* 2010;93(8):2557-63

Gomes LMO, Canha AS, Dzik A, Novo NF, Juliano Y, Santos SIS, Cavagna M. The age as a predictive factor in in vitro fertilization cycles. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31:230-4.

Hourvitz A, Maman E, Brengauz M, Machtinger R, Dor J. In vitro maturation for patients with repeated in vitro fertilization failure due to "oocyte maturation abnormalities". *Fertil Steril.* 2010;94(2):496-501.

Huddlestone HG, Jackson KV, Doyle JO, Racowsky C. hMG in—creases the yield of mature oocytes and excellent-quality embryos in patients with a previous cycle having a high incidence of oocyte immaturity. *Fertil Steril.* 2009;92:946-9

Inoue Y, Miyamoto S, Fukami T, Shirota K, Yotsumoto F, Kawabayashi T. Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2009;91:1035-1041.

Jurema MW, Nogueira D. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2006;86:1277-91

Lee HJ, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Oocyte Maturity in Relation to Woman's Age in In Vitro Fertilization Cycles Stimulated by Single Regimen. *Yonsei Med J.* 2012; 53(1):181-85.

Levrán D, Farhi J, Nahum H, Glezerman M, Weissman A. Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility: case report. *Hum Reprod.* 2002;17:1604-9.

Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, DeMiguel MP, Tesarollo I, Donovan PJ. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genet.* 2002; 30(4): 446-9.

Mrazek M, Fulka J. Failure of oocyte maturation: Possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Human Reproduction.* 2003;18(11):2249-52.

Melvin H, Thornton MD, Mary M, Francis BS, Paulson RJ. Immature oocyte retrieval: lessons from unstimulated IVF cycles. *Fertil Steril.* 1998;70(4):647-50.

Moore AK, Arny MJ, Lynch K, Grow DR. Oocyte maturation arrest more common in younger patients undergoing IVF/ICSI. *Fertil Steril.* 2007;88(Suppl 1):S271

Moschini RM, Chuang L, Poleshchuk F, Sflifkin RE, Copperman AB, Barritt J. Commercially available enhanced in vitro maturation medium does not improve maturation of germinal vesicle and metaphase I oocytes in standard in vitro fertilization cases. *Fertil Steril.* 2011;30;95(8):2645-7

Nakamura K, Oosawa M, Kondou I, Inagaki S, Shibata H, Narita O, Suganuma N, Tomoda Y. Menotropin stimulation after prolonged gonadotropin releasing hormone agonist pretreatment for in vitro fertilization in patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet.* 1992;9(2):113-7.

Okday K, Demirtas E, Son WY, Lostritto K, Chian RC, Tan SL. In vitro maturation of germinal vesicle oocytes recovered after premature luteinizing hormone surge: description of a novel approach to fertility preservation. *Fertil Steril.* 2008;89(1):228e19 – e21

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004;303:682-684.

Vlaisavljevic V, Bombek LK, Vokac NK, Kovacic B, Cizec-Sajko M. How safe is germinal vesicle stage oocyte rescue? Aneuploidy analysis of in vitro matured oocytes. *Europ J Obst Gynecol and Reprod Biol.* 2007;134: 213-19

Wessel GM. "Origin" of the germinal vesicle. *Mol Reprod Dev.* 2010;77(4):preceding table of contents.

Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Musri C, Crosby J (Eds). *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida.* 2009.

# PGD by aCGH and QF-PCR in a couple with recurring aneuploidies

Andressa G. Mondadori<sup>1,7</sup>, Maria Eugenia Ducatelli<sup>2,7</sup>, Judith Mincman<sup>3,7</sup>, Alicia Gallo<sup>4,7</sup>, Fabián Coco<sup>5,7</sup>, Roberto Coco<sup>6</sup>

<sup>1</sup> andressagmondadori@gmail.com

<sup>2</sup> mariaducatelli@yahoo.com.ar

<sup>3</sup> juka\_mi@hotmail.com

<sup>4</sup> aligalo@yahoo.com.ar

<sup>5</sup> fabiancoco@fecunditas.com.ar

<sup>6</sup> Corresponding Author\*

<sup>7</sup> Larrea 790, CABA, Postal Code 1030, Argentina

## ABSTRACT

This case report describes a PGS study performed on a blastocyst stage of a 44 year old female and 46 year old male couple with a history of recurrent aneuploid abortions. The main purpose of this report is to determine, by using STRs and QF-PCR, the parental origin of the aneuploidies found on the embryos aCGH karyotype. Only one blastocyst of the eight biopsied resulted cytogenetically normal and it was transferred in a deferred cycle. The patient achieved the pregnancy and delivered at term a normal male child. In 30 of the 38 aneuploidies identified we could determine the parental origin: eight maternal trisomies, eight paternal trisomies and 14 maternal monosomies. Five of the eight maternal trisomies showed an allelic pattern malsegregation 1:1:1 and three showed the pattern 2:1. The same segregation patterns were observed for the paternal origin trisomies. We conclude that the aneuploidies were contributed by both members of the couple in equal proportions. This outcome compels us to reflect that caution is required when we are offering oocyte donation in a women older than 40 years who has a partner of the similar age.

**Keywords:** PGS; trophoctoderm biopsy; advanced paternal age; recurrent abortions; aCGH.

## RESUMO

Trata-se de relato de PGS study realizado em blastocistos de mulher de 44 anos com marido de 46 anos, casal com história de abortamentos recorrentes. O principal objetivo deste é determinar, utilizando STRs e QF-PCR, a origem parental das aneuploidias encontradas no aCGH. Apenas um blastocisto dentre 8 biopsiados resultou citogeneticamente normal e foi transferido em ciclo diferido. A paciente teve gravidez e parto a termo, de criança do sexo masculino. Pudemos identificar 38 aneuploidias nos sete blastocistos restantes, determinando a origem parental: oito trissomias maternas, oito paternas e 14 monossomias maternas. Cinco das oito trissomias maternas mostravam má-segregação em alelo paterno 1:1:1 e três mostravam o padrão 2:1. Os mesmos padrões de segregação foram observados nas trissomias de origem paterna. Concluímos que as aneuploidias tiveram contribuição de ambos os membros do casal, em proporção igual. Este desfecho nos leva a refletir nas ovodoadões para mulheres acima de 40 anos, quando o companheiro tem idade similar.

**Palavras-chave:** PGS; biopsia de trofoderma; idade paterna avançada; aborto de repetição; aCGH.

## RESUMEN

Es el reporte de un procedimiento PGS realizado por CGH en una pareja de 44 y 46 años que consulta por abortos espontáneos con aneuploidías recurrentes. Solamente un blastocisto de ocho estudiados resultó tener un cariotipo molecular masculino normal, el cual fue transferido y dio

lugar a un recién nacido normal con cariotipo convencional normal en sangre de cordón umbilical. En los restantes siete blastocistos aneuploides se intentó determinar el origen de las mismas. Se hallaron 38 aneuploidias. Con la utilización de STRs marcados ligados a los cromosomas involucrados y posterior qf-PCR se logró determinar el origen parental de treinta de aneuploidias, de las cuales fueron: 8 trisomías maternas, 8 paternas y 14 monosomías maternas. Cinco de las ocho trisomías maternas mostraron un patrón alélico de segregación anormal 1:1:1 y tres un patrón 2:1. El mismo patrón de segregación se observó para las trisomías paternas. Por lo tanto, ambos miembros de la pareja contribuyeron con la misma proporción de aneuploidias. Este hallazgo nos obliga a reflexionar cuando se ofrece la alternativa de la ovodonación cuando su pareja es mayor de 40 años.

## INTRODUCTION

It is recognized that less than 50% of the fertilization in vivo may lead to baby born. The in vitro fertilization rate is much less; it is between 5% to 30% (Edmonds DK *et al.*, 1982). Several factors are responsible for this low reproductive efficiency, but the most important is the high rate of embryonic chromosome abnormalities of meiotic origin, which varies between 25% and 75% (Hassold T *et al.*, 2007). In women with normal karyotype, the oocyte aneuploidy rate is between 20% and 50% according to the women's age (Kuliev A and Verlinsky J, 2004; Sandalinas M *et al.*, 2002; Pelliester F *et al.*, 2003; Fraguoli E *et al.*, 2006; Guitierrez-Mateo C *et al.*, 2004; Hassold T *et al.*, 2007; Sheer G *et al.*, 2007) while in men with normal karyotype and normal spermiogram, aneuploidy is much lower, between 5% and 10% regardless the age (Fonseka KG and Griffin DK, 2011). The lethality of the chromosomal abnormalities is high and most embryos are lost in preimplantation stage. The ones that are not lost at this stage are responsible for chromosomal disorders in the newborn, being 0.67% prevalence (Hassold Tand Hunt P, 2001). Since the aneuploidies and polyploidies affect a large proportion of preimplantation embryos, the application of PGD for the screening of aneuploidies (PGS) should improve pregnancy rate and decrease abortion rate. The PGS was primarily performed by FISH analyzing five chromosomes and it was then extended to reach twelve or more chromosomes (Munné S *et al.*, 2005). Currently there is another technique available; the comparative genomic hybridization performed on a metaphase (m-CGH) or over a platform, which constitutes human chromosome fragments cloned in bacteria (BAC array CGH). This allows the enumeration of all chromosomes and also the detection of small imbalances in each one, with a resolution that might be better than the standard karyotyping. This technique however does not distinguish ploidy, balanced structural rearrangements, or the origin of the aneuploidies.

The combination of the aCGH with quantitative fluorescent PCR allows to partly solve the limitations of the aCGH.

A PGD is performed on a couple with iterative pregnancy loss by recurring aneuploidy using the embryonic molecular karyotyping, complemented with the study of polymorphic chromosome markers or STRs (single tandem repeats) in order to assert and identify the origin of aneuploidy.

## PATIENTS AND METHODS

This is a 44 year old female and 46 year old male couple that has been pursuing an ongoing pregnancy for the last six years. They have already completed seven ICSI procedures, as he has an astenozoospermia and bilateral varicocele. She, on the other hand, had no relevant history, presented normal hormonal dosages and normal antral follicle counts. The karyotype couple was normal. Out of the seven ICSIs performed, they achieved pregnancy five times, but ended in clinical abortions between the eighth and eleventh week of gestation. Four of them were cytogenetically studied, and all were diagnosed as aneuploidies: a trisomy 21, a trisomy 15, a trisomy 16 and another with an extra chromosome of the group G. The couple consulted us for a PGS and they went through six ICSIs, but decided not to carry out the PGS due to the quality of the few developed embryos. However two of them achieved pregnancy, but again finished in clinical abortions in the eighth week of pregnancy, one euploid and one with a trisomy 13. The couple decided to keep trying with ICSI procedures, but unlike the previous ones, it was suggested to culture the blastocysts stage and only when they achieved an adequate number, then perform the PGS by aCGH. Two ICSIs were performed and the couple produced four blastocysts in each one on day five. Each blastocyst underwent trophectoderm biopsy. On day three, all embryos with more than five cells received a hole in the pellucid zone with a single seven millisecond laser shot (Octax® 400x lense) to encourage the hatching and the protrusion of the trophectoderm to facilitate biopsy. The cutting and removal of the trophectoderm cells were performed by using two laser shots of 10 milliseconds on both sides of the protruded trophectoderm. Each blastocyst biopsied was then vitrified in a cryotop and the removed cells were washed three times in biopsy medium before being placed in a 2 ml Eppendorf tube with 1 µl of biopsy medium, which was kept in the freezer to make the array CGH with 24 Sure Aneuploidy V3 of BlueGnome®. The QF-PCR was performed in the amplified DNA from the trophectoderm cells with aneuploid chromosome STRs (# 1, # 2, # 5, # 6, # 7, # 8, # 9, # 10, # 11, # 12, # 13, # 14, # 15, # 16, # 18, # 19, # 20 and # 21). A number of STRs were tested and the ones informative were selected (table 1). The reaction mixture contained a buffer of PCR 5X, dNTPs 10 mM, STRs 0.5 µM and Taq polymerase 5 U/µl. The cycling conditions were 95 °C/5 min. followed by 35 cycles to 95°C/5 min., 55°C/30s, 72°C/30seg. and a final extension to 72°C/5 min. The amplicons obtained were analyzed by capillary electrophoresis in a 310 ABI-Prism and interpreted in accordance with Fig. 1.

The transfer was made in a subsequent cycle to the stimulation cycle. The endometrium was prepared with estrogens and progesterone. The only normal aCGH blastocyst was warmed and transferred to the uterus after culturing for four hours post thawing (Fig.2). The luteal phase was supplemented with estrogen and progesterone. The pregnancy test was done 10 days post transfer, which was positive, and was corroborated through a vaginal sonogram three weeks later. The woman delivery, at 39 weeks of pregnancy, a normal male child. The conventional karyotype in the blood of the umbilical cord corroborated the result obtained with the biopsy of trophoectoderm.

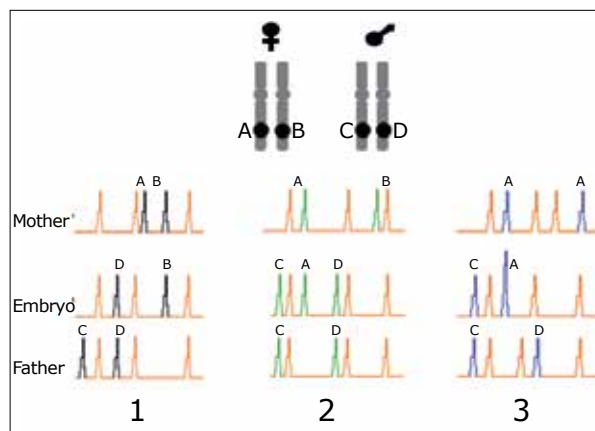
**Table 1.** Results of the biopsied blastocysts aCGH.

embryo #	aCGH
1	46,XX
2	43,XX,-2,-5,-6,-18,+15
3	46,XY,+9,-10,-11,+13
4	52,XX,+2,+7,+12,+13,+18,+20
5	51,XY,+8,-9,+11,+12,+15,+16,+17,+18,-22
6	45,XX,-14,-19,+20
7	47,XX,+1,-17,+19
8	44,XY,-2,+8,+9,-12,-13,-17,+20,-21

## RESULTS

Table 1 shows the results of embryonic karyotypes inferred by the aCGH. They all had multiple anomalies with the exception of embryo # 1. The one with the least anomalies had three and the ones with the most had nine aneuploidies (see fig.1). All chromosomes were involved in aneuploidies, with the exception of chromosomes #3, #4 and the sex chromosomes.

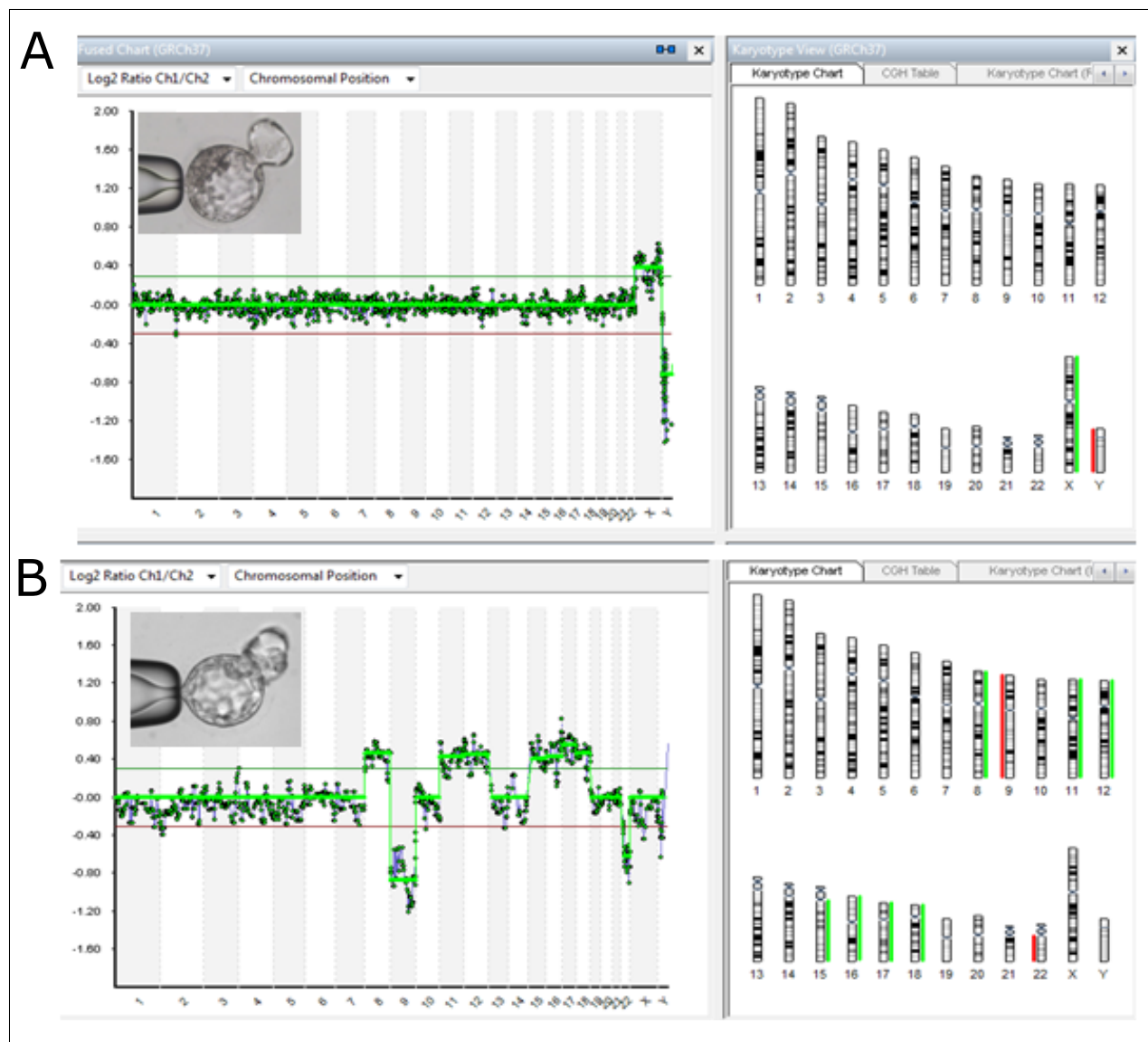
Table 2 lists the alleles of the STRs linked to abnormal chromosomes found in the aneuploid blastocysts studied by fluorescent quantitative PCR (QF-PCR). The alleles found revealed the parental aneuploidy origin, and according to the allelic pattern, we could identify in which meiosis phase the error possibly occurred



**Figure 1.** Schematic representation of quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) using a polymorphic marker (STR) linked to a particular chromosome.

When both members of the couple have different alleles for a given STR, one can identify the parental origin of aneuploidy and furthermore infer in which meiotic anaphase the error occurred, assuming non allelic exchange. In column 1 a normal meiotic division is represented, where each parent contributes a single allele of the STR, the B of the mother and the D of the father (pattern 1:1). Column 2 represents a meiotic error occurred in the first division of the spermatocyte in which the father contributed two alleles of the STR, the C and D, and the mother with the A allele (trisomy of paternal origin that occurred in the first meiotic division, pattern 1: 1: 1). Column 3 represents a meiotic error that occurred in the second division of the oocyte, in which the mother contributed with two equal chromosomes with the A allele (isodisomy) and the father with the chromosome having the allele C (trisomy of maternal origin originated in the second meiotic division of the oocyte, pattern 2: 1).





**Figure 2.** Blastocysts with a normal and an abnormal aCGH  
 (A) The aCGH performed in the removed herniated trophoctoderm cells shows a female normal karyotype.  
 (B) The aCGH performed in the removed herniated trophoctoderm cells shows nine aneuploidies. Seven of them are trisomies of chromosomes 8, 12, 15, 16, 17, 18, and two are monosomies of chromosomes 9 and 22.

with the exception of the alleles of the STR of chromosome 15 (embryo # 2), 7-18 (embryo # 4), 15 (embryo # 5) and the 19 in the # 7 embryo, as well as the abnormalities of chromosome 17 (see fig.2). The origin of the embryonic aneuploidies detected with the aCGH is summarized in table 3. It can be seen that both members of the couple contributed disomies produced by probable errors in both parents during meiosis, but there were no paternal nullisomies.

## DISCUSSION

It is known that with the increasing age of women, the ovarian follicular reserve is reduced and/or the response to ovarian stimulation becomes inadequate. The couple, due to their age, had a high chromosome risk during fertilization, mainly because of the oocyte aneuploidies. We can say that the patient, despite her age, still has a good follicular reserve with a good response to ovarian

stimulation. The women's response has not been compromised yet since two cycles of stimulation produced eight blastocysts. However the intrinsic quality of majority of the oocytes was compromised, as well as the spermatozoa that gave origin to the embryos. Out of the eight achieved blastocysts, only one had a normal aCGH. The high rate of aneuploidy found in the present case report has also been communicated by other authors (Alfarawati *S et al.*, 2011). It was widely accepted that the blastocyst aneuploidy rate is much lower than in cleaved embryos. However, the experience gained recently with aCGH in blastocyst biopsy shows that there is a significant rate of aneuploidy, which increases with the age of the woman (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011).

In the present study we have determined the parental origin of the aneuploid chromosomes and we are trying to establish in which meiotic division the error occurred, according to previous communications that



**Table 2.** Informative STRs linked to abnormal chromosomes involved in the embryonic aneuploidies.

STRs chrom. aneuploidies	D2S126	D5S2494	D6S510	D18S386	D15S386
Mother	M1/M2	M1/M2	M1/M2	M1/M2	M1/M2
Father	P1/P2	P1/P2	P1/P2	P1/P2	M1/P2
Embryo #2	P1	P2	P2	P1	uninformative

STRs Chrom. aneuploidies	D9S166	D10S1248	TH01	D13S258
Embryo #3	M1/P1/P2	P2	P2	M1/M2/P1

STRs Chrom. aneuploidies	D2S1338	D7S820	D12S391	D13S258	D18S391	D20S916
Embryo #4	M1/P1/P2	uninformative	M1/P2/P2	M1/M1/P1	uninformative	M1/M1/P1

STRs Chrom. aneuploidies	D8S1179	D9S176	TH01	D12S2078	D15S643	D16S539	D18S386	D22S1045
Embryo #5	M1/M2/P2	P2	M1/M1/P2	M1/P1/P2	uninformative	M1/P1/P2	M1/P1/P1	P1

STRs Chrom. aneuploidies	D14S1434	D14S1434	D20S478
Embryo #6	P2	P1	M1/M2/P2

STRs Chrom. aneuploidies	D1S1656	D19S219
Embryo #7	M1/P1/P2	uninformative

STRs Chrom. aneuploidies	TPOX	D8S1179	D9S302	VWA	D13S317	D20S481	D21S11
Embryo #8	P2	M1/M2/P2	M1/P1/P2	P2	P1	M1/M2/P1	P2

**Table 3.** Summary of the origin of the aneuploidies.

# Embryo	Maternal trisomy		Paternal trisomy		Maternal monosomy
	1:1:1 Allelic pattern	2:1 Allelic pattern	1:1:1 Allelic pattern	2:1 Allelic pattern	
2					Chrs 2, 5, 6, 18
3	Chr 13		Chr 9		Chrs 10, 11
4		Chrs 13, 20	Chr 2	Chr 12	
5	Chr 8	Chr 11	Chrs 12, 16	Chr 18	Chrs 9, 22
6	Chr 20				Chrs 14, 19
7				Chr 1	
8	Chrs 8, 20		Chr 9		Chrs 2, 12, 13, 21

The proportion of oocytes and spermatozoa with probable disomies in meiosis I was equal. The monosomies could also be meiotic or post fertilization; but since they all were of maternal origin, they most likely occurred in meiosis II post ICSI procedure.

used QF-PCR for aneuploidy screening (Katz-Jaffe MG *et al.*, 2004; Diego-Alvarez *et al.*, 2005; Machatkova M, *et al.*, 2005; Diego-Alvarez *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2010; Vahad *et al.*, 2010). We used STRs linked to chromosomes with numerical abnormalities, similar to those used in tests for paternity (see table 4). Without doubt this methodology is a good tool to determine the parental origin of the aneuploidies, but its use to determine if the error occurred in the first or second meiotic division is controversial.

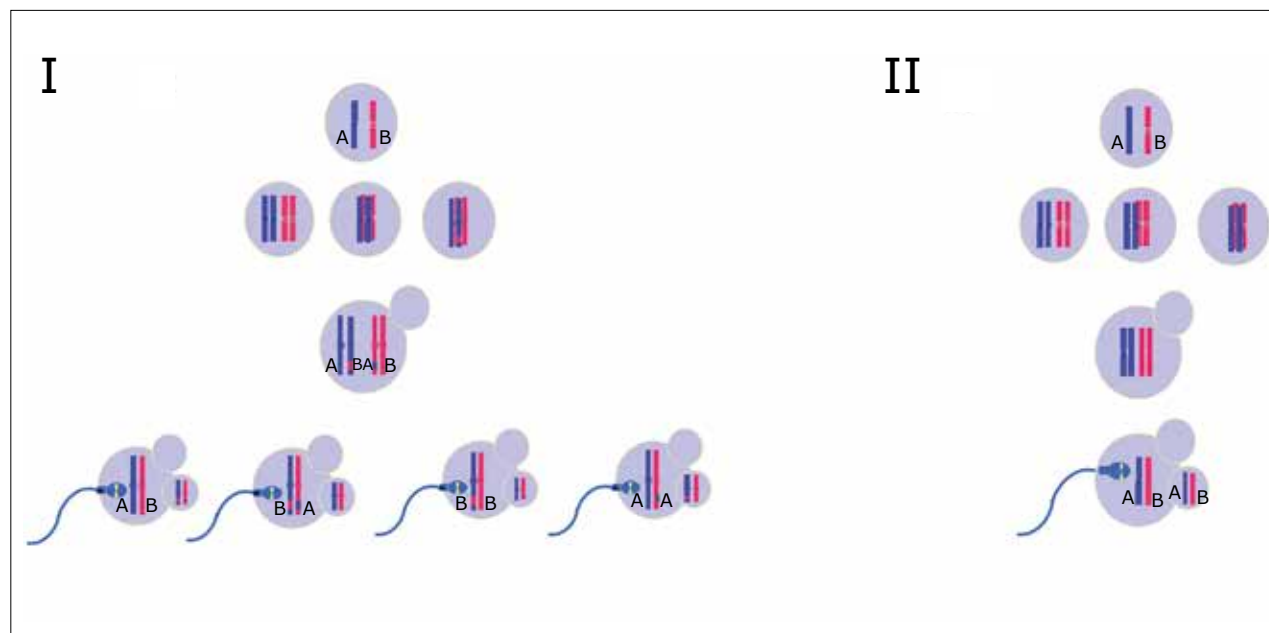
**Table 4.** STRs linked to aneuploid chromosomes

embryo #	STRs
1	D1S1656; D1S3721
2	TPOX; D2S1338; D2S126; D2S172
5	D5S818; D5D2494; CSF1PO
6	D6S1609; D6S510
7	D7S820
8	D8S1179; D8S1179
9	D9S176; D9S302; D9S199; D9S162
10	D10S1248; D10S1213; D10S1435
11	TH01
12	D12S391; D12S2078; vWA
13	D13S258; D13S317; D13S631
14	D14S1434; D14S128
15	D15S643; D15S211; D15S201; Penta E
16	D16S539; D16S539
18	D18S391; D18S386; D18S461; D18S51
19	D19S433; D19S219; D19S559
20	D20S916; D20S478; D20S481; D20S470
21	D21S11; Penta D
22	D22S1045; D22S280; D22S423

If one assumes that non allelic exchanges occurred between chromatids and the mechanism of malsegregation is the classical non disjunction, one can infer in which division the error occurred. But if the malsegregation is due to a precocious separation of sister chromatids, we can not affirm in which meiotic division the error occurred. If no allelic exchanges occurred, the allele pattern 1:1:1 indicates that the trisomy was caused by a malsegregation during anaphase I, by classical non disjunction or by a premature separation of one chromatid (see fig. 3 and 4). On the other hand, if an allele exchange occurred, the pattern 1:1:1 may indicate an error in the first anaphase, by non-disjunction or premature separation of sister chromatid, or by non disjunction during the second meiotic division (see fig 3, 4, 5 and 6). When the trisomy shows an allele pattern 2:1 several mechanisms may explain the pattern: 1) a non disjunction during second meiotic anaphase without alleles interchanged, 2) a non disjunction after fertilization and 3) a precocious separation of sister chromatid with or without alleles interchanged (see fig. 4, 5, 6 and 7). Taking into account the aforementioned limitations, a way to bypass them is through the use of several STRs to determine in which division the error occurred. In the present study, the use of polymorphic markers of aneuploid chromosomes allowed us to identify most of the maternal or paternal origin of aneuploidy as described in Fig.1. In some embryos, it was not possible to identify the aneuploidies of chromosomes 7, 15, 18 and 19 because the results were inconclusive. The study of chromosome 17 was not possible because of the lack of an informative marker.

All aneuploid embryos had several trisomies coexisting with monosomies, except embryo # 2 which did not have any trisomies but instead four monosomies, and

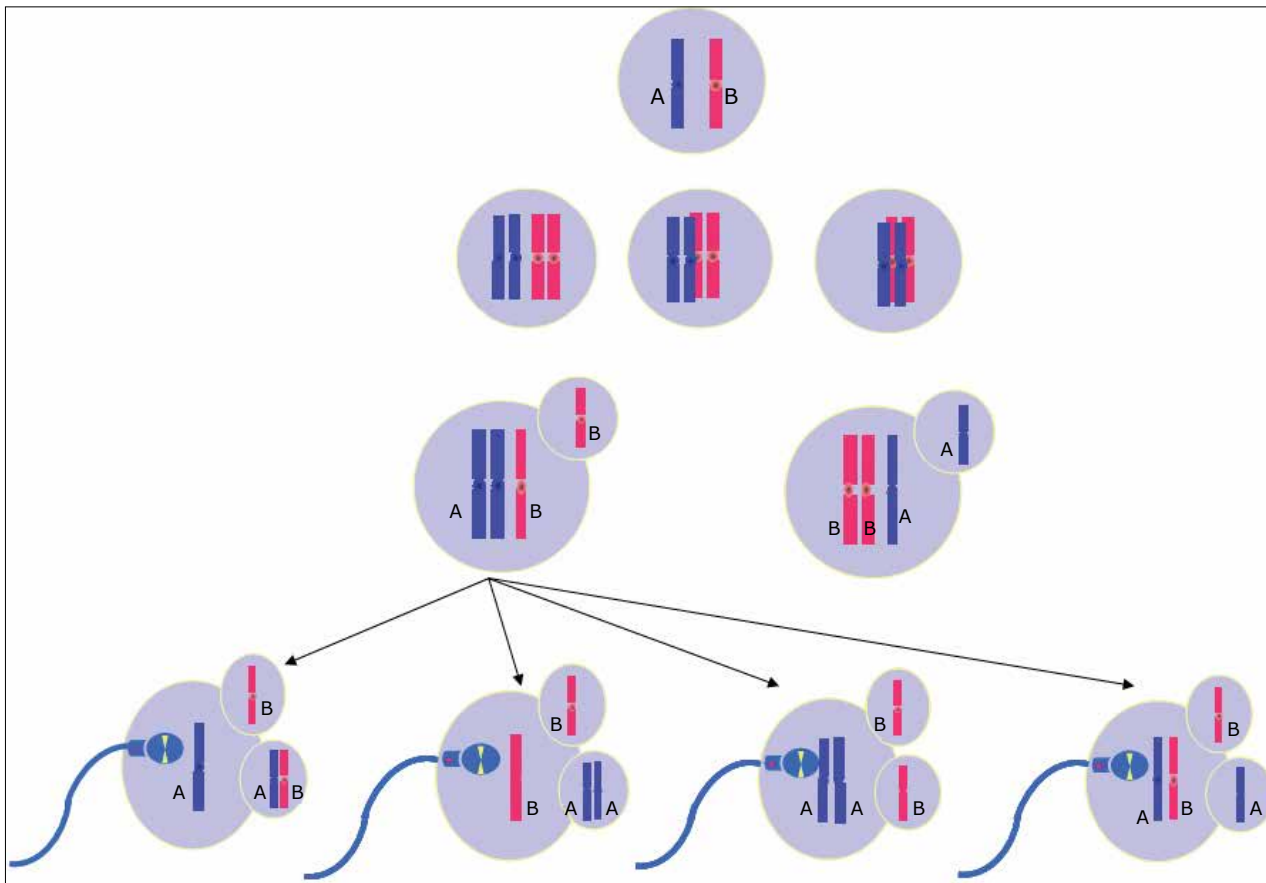
embryo # 7 that only showed a trisomy. As you can see in table 3, embryo # 2 presented four (2, 5, 6 and 18) monosomies of maternal origin; embryo # 3 had a maternal trisomy of chromosome 13 with a 1:1:1 allelic pattern, a paternal trisomy 9 with an allelic pattern 1:1:1 and two monosomies (10 and 11) of maternal origin. Embryo # 4 presented a maternal trisomy 13 and 20 with an allelic pattern 2:1, a paternal trisomy 2 with a 1:1:1 pattern and a paternal trisomy 12 with a pattern 2:1. Embryo # 5 showed a maternal trisomy 8 with a 1:1:1 allelic pattern, a maternal trisomy 11 with an allelic pattern 2:1, a paternal trisomy 12 and 16 that presented an allelic pattern 1:1:1, a paternal trisomy 18 with an allelic pattern 2:1 and the monosomies 9 and 22 of maternal origin; embryo # 6 showed a maternal trisomy 20 with an allelic pattern 1:1:1 and two monosomies of maternal origin (chromosomes 14 and 16); embryo # 7 showed a trisomy 1 of paternal origin with an allelic pattern 2:1; and embryo # 8 showed maternal trisomies 8 and 20 that presented a 1:1:1 allelic pattern, a paternal trisomy 9 with an allelic pattern 1:1:1, and four monosomies of maternal origin (chromosomes 2, 12, 13 and 21). The coexistence of trisomies and monosomies could be attributed to the increased susceptibility of the aneuploid zygotes, producing more mitotic errors than normal zygotes or, due to suboptimal conditions of in vitro development, from fertilization to the blastocyst stage or an inadequate competence of the oocyte cytoplasm. While clinical embryologists always overestimate that the IVF laboratory suboptimal conditions are the cause of aneuploidies, we should not forget that most of the chaotic abnormalities are found in dysmorphic or arrested embryos. In spite of our study being performed on blastocysts, the majority of the embryos had chaotic chromosomal abnormalities.



**Figure 3.** Non-disjunction during meiosis I of the oocyte with (I) and without (II) alleles interchanged

The oocyte is disomic (retains the two chromosomes), while the first polar body is nullisomic.

To the left (I) is shown an allelic exchange. When the oocyte is penetrated by sperm and resumes the meiosis II, three possibilities of segregation can occur: A: B (or B: A), A: A and B: B, which originate an allelic pattern 1:1:1 or 2:1 in the zygote, respectively. To the right (II) meiosis I nondisjunction without allelic exchange is observed. When the oocyte resumes the meiosis II generates a disomic oocyte (A:B), which leads a 1:1:1 trisomic zygote.



**Figure 4.** Premature separation of sister chromatids with alleles exchanged during prophase I. The diagram illustrates the four possibilities of segregation during meiosis I and then six possibilities of segregation during the second meiosis for every primary oocyte. Three of the ova correspond to an euploidy rescue, which originate a normal euploid zygotes; two disomic secondary oocytes with an allelic pattern 1: 1, which lead a trisomic zygotes with a 1:1:1 allelic pattern; and finally a disomic ovum, but with a double dose of only one allele, which originates a trisomic egg with a 2:1 allelic pattern.

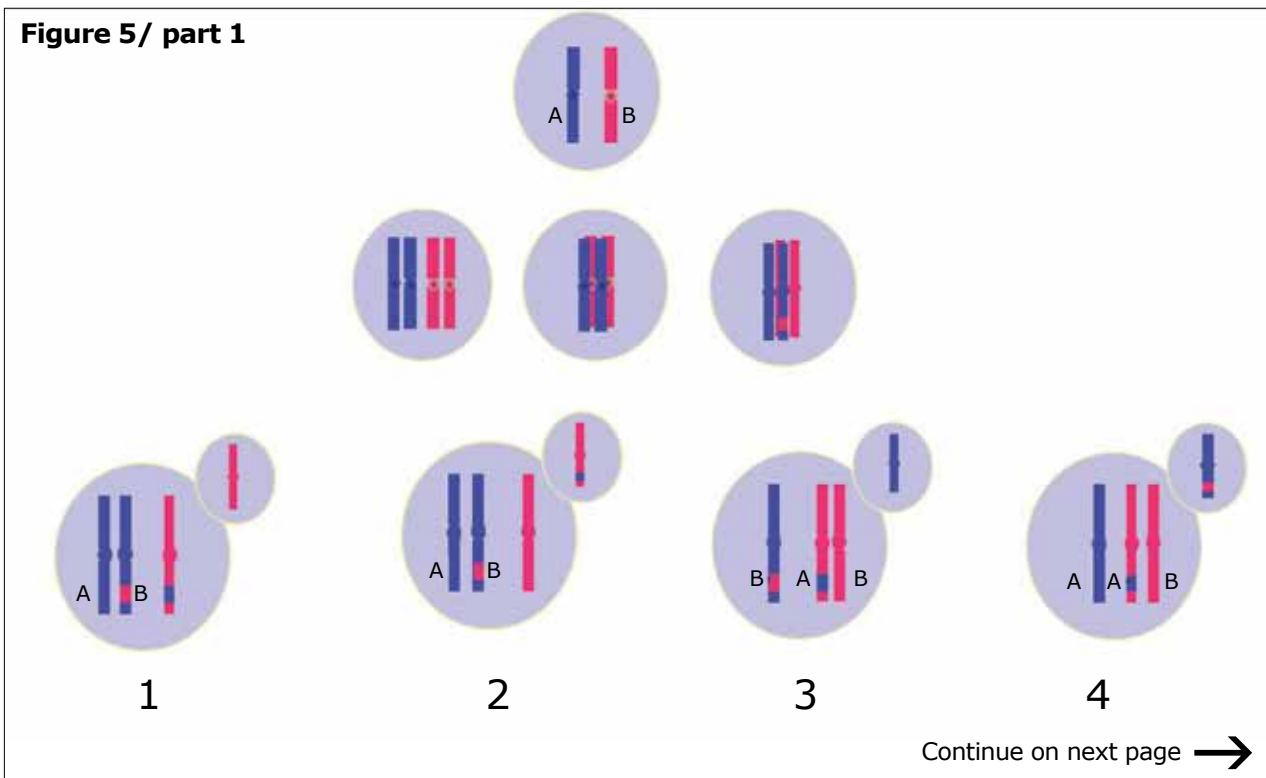
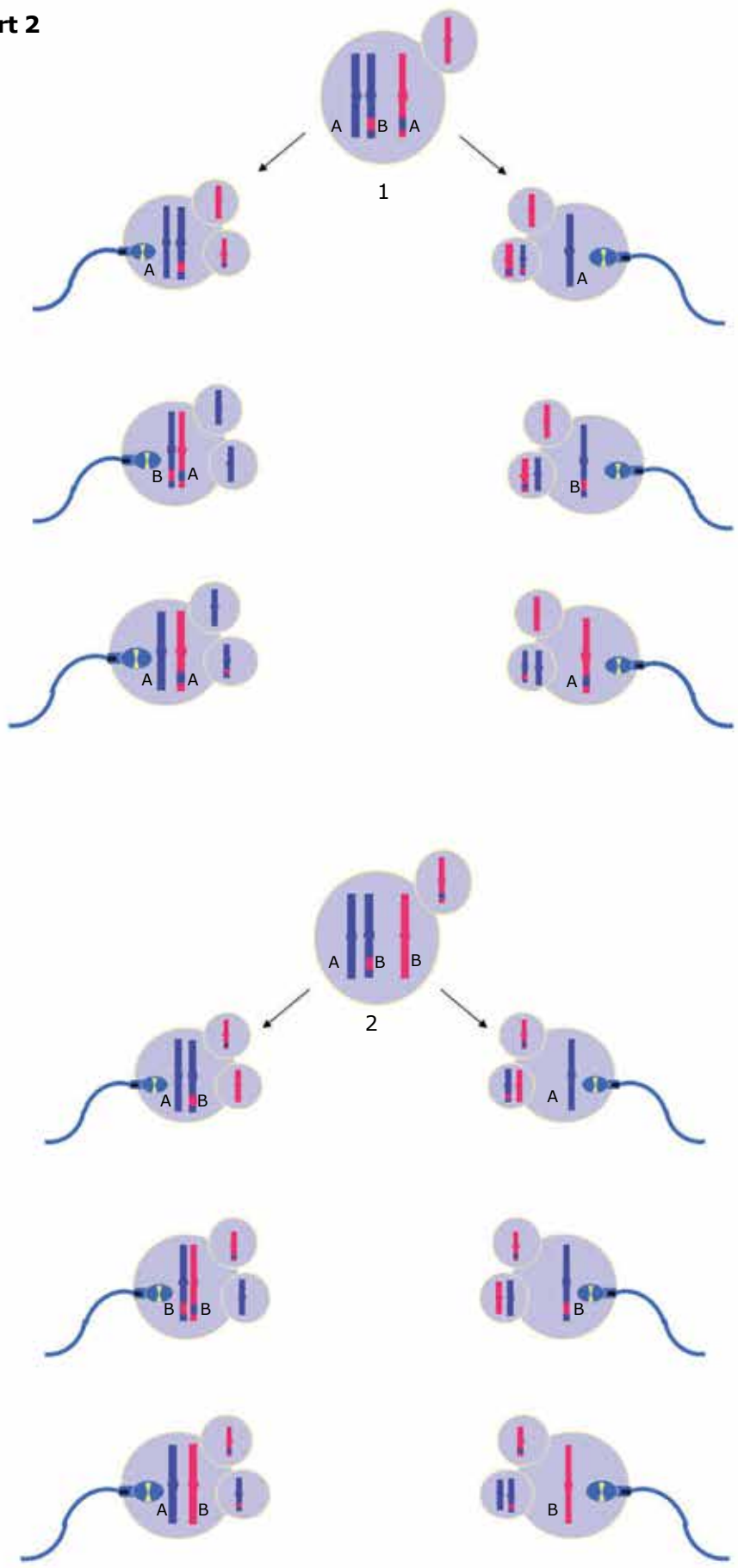
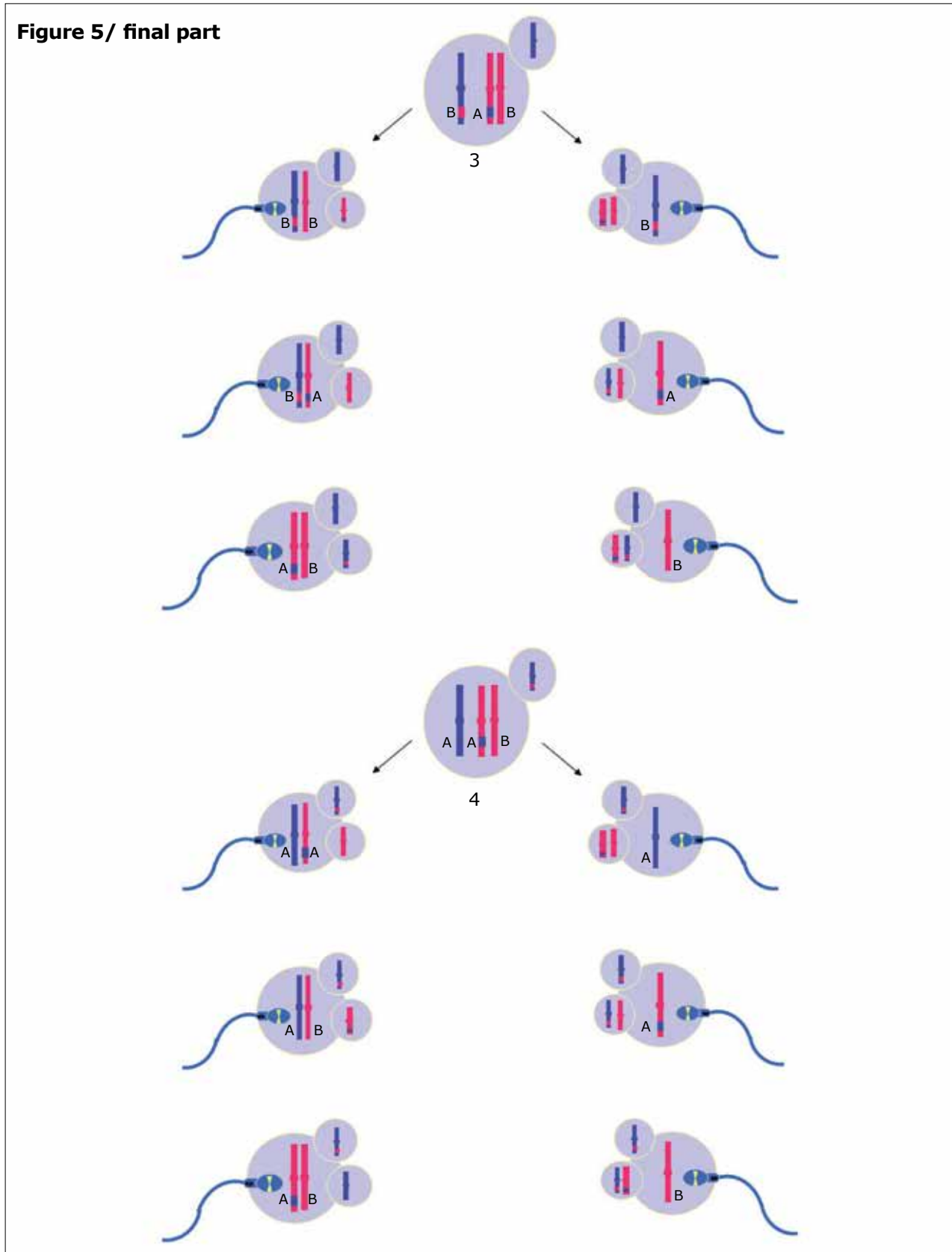


Figure 5/ part 2

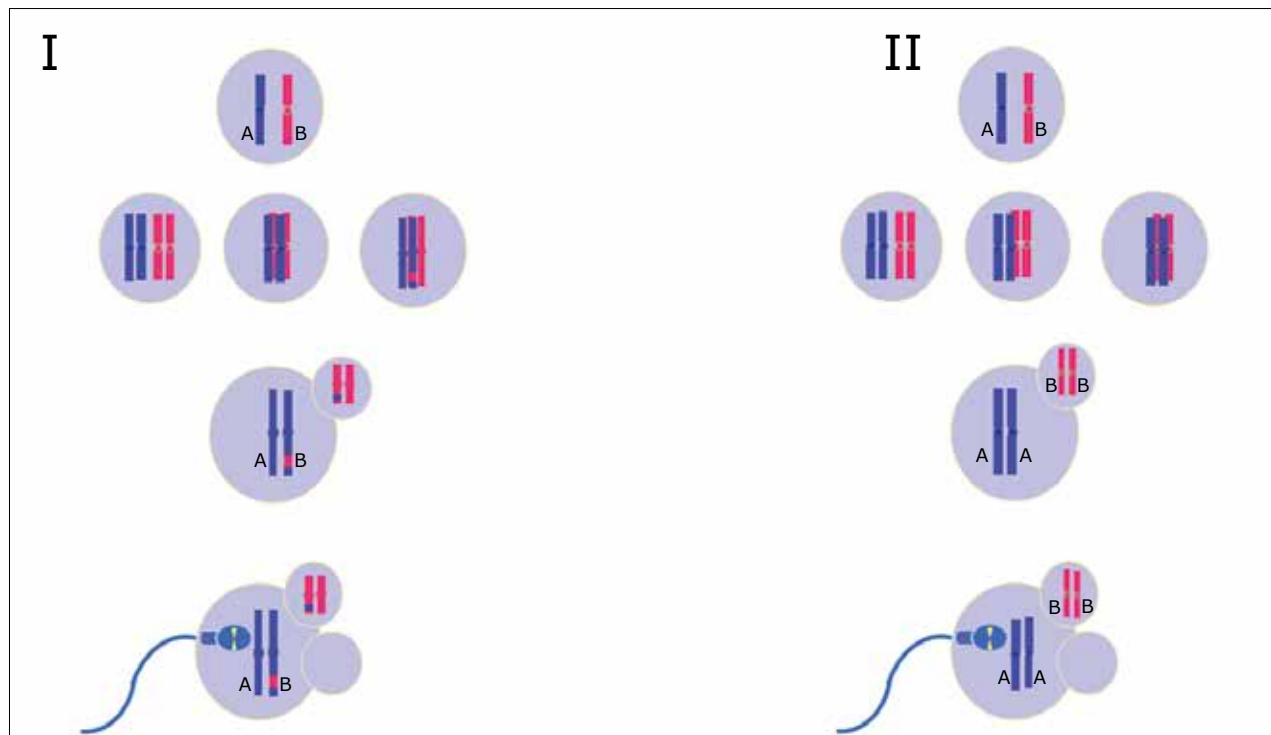


Continue on next page →

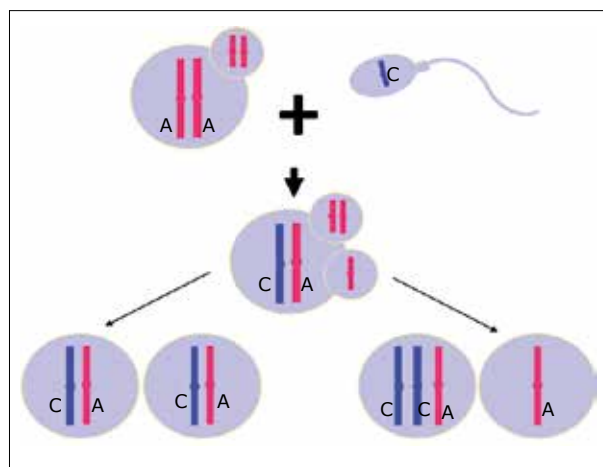


**Figure 5:** Precocious separation of sister chromatids without alleles exchanged during meiosis I  
 The diagram illustrates the four possibilities of segregation during meiosis I and then the 24 possibilities of segregation during the second meiosis for every primary oocyte. Twelve ova correspond to an euploidy rescue, which lead a normal euploid zygotes, eight disomic ova with an allelic pattern 1:1, which originate a trisomic zygotes with a 1:1:1 allelic pattern; and four also disomic but with a double dose of only one allele, which create a trisomic zygotes with a 2:1 allelic pattern.





**Figure 6:** Non-disjunction during the second meiotic division of the oocyte with (I) or without (II) alleles interchanged. When the oocyte resumes the meiosis II, the gamete retains the two chromatids (isodisomic) and the second polar body is nullisomic. On the left side (I), an allelic interchange has occurred (between alleles A and B), so the zygote will present an allelic pattern 1:1:1. On the right side (II), the alleles exchange doesn't occur and the zygote allelic pattern observed will be 2:1.



**Figure 7:** Mitotic Division Post Fertilization

Column 1 shows a normal mitotic division that has a STR allele from each parent (A:C). A non disjunction is represented in column 2, having two chromosomes of the same parent, similar to an error in meiosis II (without alleles exchange), originating an allelic pattern 2:1 (A:A:C).

Another surprising fact was that all monosomies found were from maternal origin.

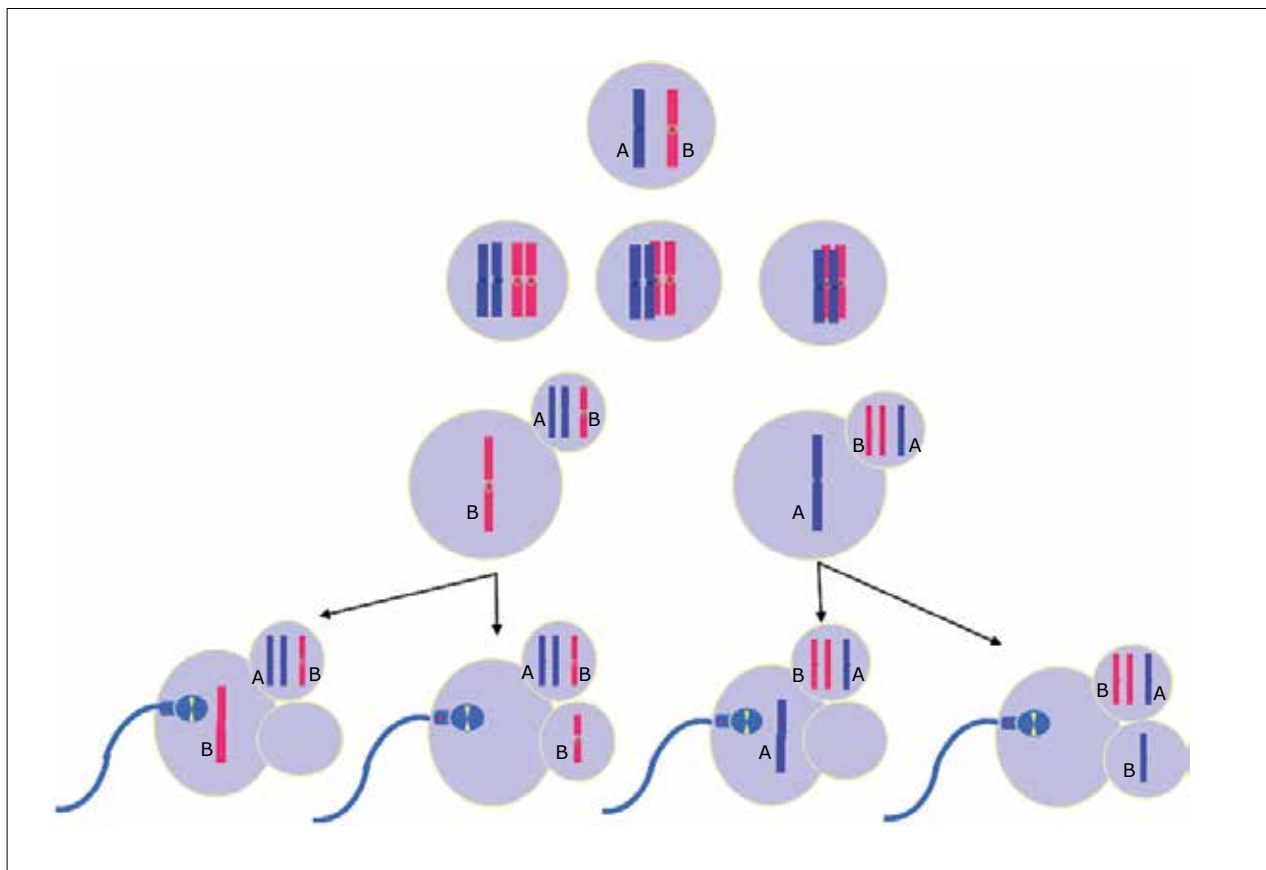
Such monosomies could be originated by a premature separation of maternal chromatids (fig.8) as well as the result of post fertilization errors. Since absent chromosomes corresponded to the woman, and in the present case the IVF procedure was an ICSI, we can also speculate that the monosomies could be originated during the second meiotic division of the oocyte as a result of the ICSI "trauma".

It is well recognized that most of the autosomic trisomies are from maternal origin, while most of the sex chromosomes anomalies are from paternal origin (Martin RH and Rademaker AW, 1992; Hassold *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). In this case no sex chromosome abnormalities were identified and several autosomic trisomies were found.

The reason for this communication was to show the equal contribution of parental aneuploidies in most blastocyst studied. There are contradictory papers about the increase risk of aneuploidies with the advanced paternal age. The majority of the authors suggest that the rate of aneuploidy in spermatozoa is not related to age but rather to the spermatozoa quality (Wiener-Megnazi Z *et al.*, 2012; Martin RH *et al.*, 1995). The patient at the time of ICSI was 46 years old and the only altered semen parameter was motility, presumably due to bilateral varicocele. Seven out of the eight blastocysts originated by the couple had chaotic aneuploidies (87.5%). In five of seven blastocysts the anomalies were from paternal origin and four of them were probably originated during the meiosis I.

The high percentage of aneuploidies found may be due to; the advanced age of both members of the couple, to a chromosomal instability, to a meiotic mutation in the male which contributes to a higher rate of non-disjunction, to suboptimal conditions of in vitro development or to the ICSI per se that could promote the loss of chromosomes during anaphase II.

It is very difficult to speculate with the experience of a single case, but the significant paternal contribution found in this report should make us consider the single indication of oocyte or sperm donation in couples more than 40 year old.



**Figure 8:** Monosomies originated by Premature separation of sister chromatids  
The diagram illustrates the two possibilities of segregation during meiosis I and then the two possibilities of segregation during the second meiosis for every primary oocyte. Two ova result nullisomic and two euploids.

**Acknowledgments:** The authors thank Soledad Aylward and Karen Jury for the translation of the document.

**\*Corresponding Author**

Roberto Coco  
Larrea 790, CABA  
Postal Code 1030, Argentina  
robertococo@fecunditas.com.ar  
Phone: 5411 4962 6309  
Fax: 5411 496

**REFERENCES**

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D., 2011. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* . 26(6):1560-74. Epub 2011 Mar 29.

Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillio MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Rodriguez de Alba M, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez, 2005. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* . 20(5): 1235-43.

Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, Vallespin-Garcia E, Ayuso C, Lorda-Sanchez I., 2006. *Hum Reprod* . 21(4):958-66.

Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E, Wood PJ., 1982. Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* . 38: 447-53.

Faas BH, Cirigliano V, Bui TH., 2011. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 16(2):81-7. Review.

Fiorentino F, Kokkali G, Biricik A, Stavrou D, Ismailoglu B, De Palma R, Arizzi L, Harton G, Sessa M, Pantos K., 2010. Polymerase chain reaction-based detection of chromosomal imbalances on embryos: the evolution of preimplantation genetic diagnosis for chromosomal translocations. *Fertil Steril*. 94:2001-11.

Fonseka KG, Griffin DK., 2011. Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenet Genome Res* . 132(2-4): 289-91.

Fragouli E, Wells D, Thornhill A, Serhal P, Faed MJ, Harper JC, Delhanty JD., 2006. Comparative genomic hybridization analysis of human oocytes and polar bodies. *Human Reprod*. 21: 2319-28.

Freeman SB, Yang Q, Allran K, Taft LF and Sherman SL., 2000. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with down syndrome. *American Journal of Human Genetics* 66: 1680-1683.

Gutiérrez-Mateo C, Benet J, Wells D, Colls P, Bermúdez MG, Sánchez-García JF, Egozcue J, Navarro J, Munné S., 2004. Aneuploidy study of human oocytes first polar body comparative genomic hybridization and metaphase II fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Reprod* . 19:2859-68.

Gutiérrez-Mateo C, Colls P, Sánchez-García J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munné S., 2011. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 95(3):953-8.

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K et al., 1996. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28: 167-175.

Hassold T, Hunt P., 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. 2(4): 280-91.

Hassold T, Hall H, Hunt P., 2007. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*. 16 (Spec no. 2): R203-8.

- Katz-Jaffe MG, Trounson AO, Cram DS., 2004. Mitotic errors in chromosome 21 of human preimplantation embryos are associated with non-viability. *Molecular Human Reproduction* 10(2): 143-147.
- Kuliev A, Verlinsky J., 2004. Meiotic and mitotic no disjunction: lessons from preimplantation genetics diagnosis. *Human Reproduction Update* 10(5): 401-07.
- Machatkova M, Brouckova M, Matejckova M, Krebsova A, Sperling K, Vorsanova S, Kutsev S, Zerova T, Arbuzova S, Krejci R, Petersen M, Macek M Sr., 2005. QF-PCR Examination of Parental and Meiotic Origin of Trisomy 21 in Central and Eastern Europe. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 53(3): 371-373.
- Martin RH and Rademaker AW., 1992. A study of parental age and sex ratio in sperm chromosome complements. *Human Heredity* 42:333-336.
- Martín RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW., 1995. The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *AmJ Hum Genet*. 57: 1395-99.
- Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, Escudero T, Oter M, Schoolcraft B, Simpson JL et al., 2005. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril*. 84:331-35.
- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J., 2003. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet*. 112(2): 195-203.
- Sandalinas M, Márquez C, Munné S., 2002. Spectral karyotyping of fresh non inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* . 8: 580-85.
- Sher G, Keskinetepe L, Keskinetepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, Baltaci V, Kotze D, Unsal E., 2007. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multi-phase study. *Fertil Steril* . 87:1033-40.
- Vahad Saadi A, Kushtagi P, Gopinath PM, Satyamoorthy K., 2010. Quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR) for prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies. *Int J Hum Genet*.10(1-3):121-129.
- Wiener-Megnazi Z, Auslender R, Dirnfeld M., 2012. Advanced paternal age and reproductive outcome. *Asian Journal of Andrology* 14: 69 -76.

# RED CONGRESSO GERAL

Westin Playa Bonita Hotel  
Panamá  
May 02-04, 2013

## Simposia

Merck Serono  
Panamanian Society of Gynecology and Obstetrics  
IFFS  
Genetics

## Round tables

Ovarian Stimulation  
Andrology  
Implantation

## Practical Demonstration

IVM  
Blastocyst Biopsy

## Conferences

And much more!!!

Registration: [www.redlara.com/congresso\\_panama\\_ing/default.asp](http://www.redlara.com/congresso_panama_ing/default.asp)



*Red Latinoamericana de  
Reproducción Asistida*

**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/ICSI) 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 RESULTADOS<sup>1-7</sup>



## O TRATAMENTO COM MENOPUR® PROMOVE:

 Maior proporção de embriões de alta qualidade quando comparado ao rFSH<sup>1,2</sup>

 Menores níveis de progesterona ao final da estimulação vs. rFSH, o que pode resultar em melhor receptividade endometrial para a implantação do embrião<sup>8,9</sup>

 Taxas de gravidez em curso e de nascidos vivos significativamente maiores comparado com rFSH<sup>3-7,10</sup>



 FALEFERRING  
0800 772 4656

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

**FERRING**  
PHARMACEUTICALS