

Volume 14
Number 2
Apr-May-Jun 2010
ISSN 1517-5693

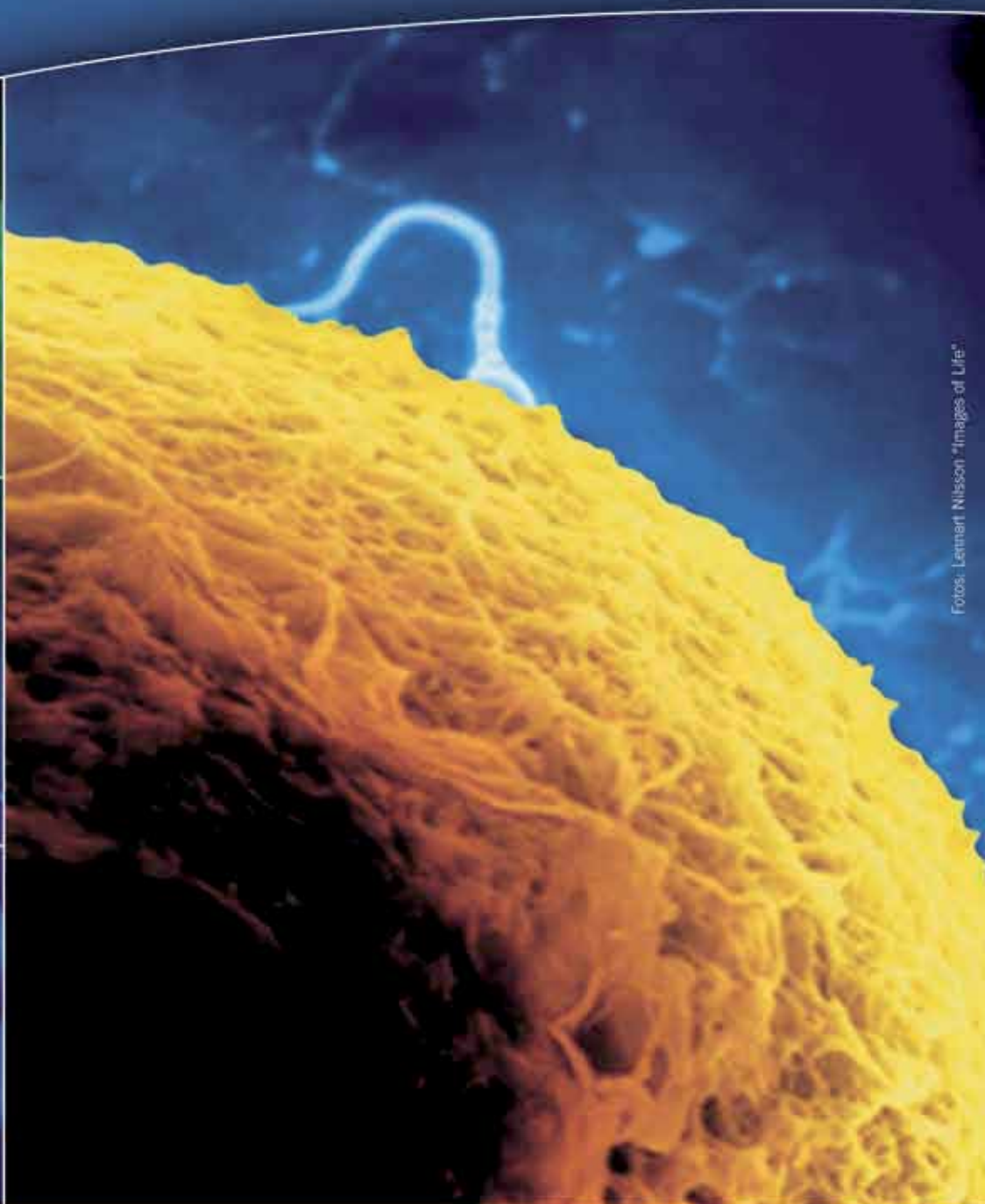
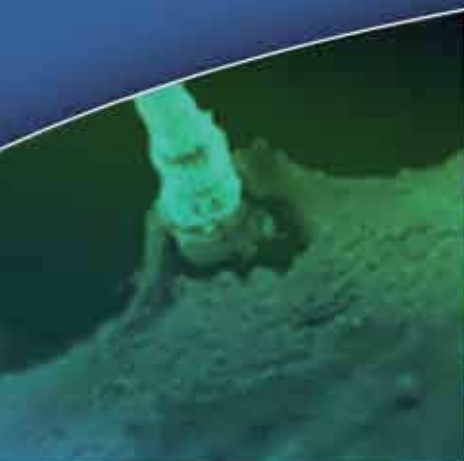
JBRA

Assisted Reproduction

SBR
SOCIETY OF BRAZILIAN
REPRODUCTIVE ASSISTANCE

JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

 *Sociedade Brasileira de
Reprodução Assistida*



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*

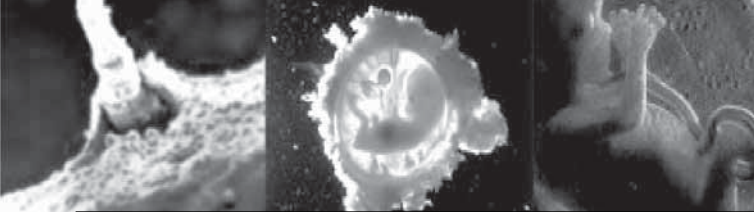


Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

0800.113320

Serviço de Atendimento ao Cliente

Merck Serono
Living science, transforming lives



JBRA

Assisted Reproduction

CORPO EDITORIAL

Editor	Instituição	Região/ País
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra/ UFRJ	RJ Brasil
Editor Adjunto		
Paulo Franco Taitson	IRH / PUC MG	MG Brasil
Consultor Editorial		
José Gonçalves Franco Jr	CRH	SP Brasil
Assistente Editorial		
Bruno Borges		RJ
Editores Associados		
Edson Borges Jr	Fertility / Inst Sapientiae	SP Brasil
João Batista A Oliveira	CRH	SP Brasil
Selmo Geber	Origen / UFMG	MG Brasil
Weydson Barros Leal	UFPE	PE Brasil

CONSELHO EDITORIAL

Adelino Amaral Silva	Gênesis	DF Brasil
Alessandro Schuffner	Conceber	PR Brasil
Álvaro Petracco	Fertilitat/ PUC RS	RS Brasil
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O Barra	RJ Brasil
Anne R Greenlee	OHSB	EUA
Aroldo Camargos	UFMG	MG Brasil
Bela Zausner	Gênese	BA Brasil
Bruno Scheffer	IBRRA	BH Brasil
Carlos André Henriques	G&O Barra	RJ Brasil
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		SP Brasil

Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR / UFRGS	RS Brasil
Ernesto Gallardo Lozano	IMER	México
Fabio Firmbach Pasqualotto	Conception	RS Brasil
Fernando Zegers-Hochschild	Clin Las Condes	Chile
Francisco Risquez	Clin La Trinidad	Venezuela
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT 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	Projeto Alfa	SP Brasil
Jorge Hallak	Androscience	SP Brasil
Juan Manuel Montoya	Conceptum	Colombia
Ivan Valencia Madera	CEMEFES	Equador
Karen Sermon	VUB	Bélgica
Leila Montenegro S Farah	Fertility	SP Brasil
Leticia Urdapilleta	Cegyr	Argentina
Lídio Jair Ribas Centa	Androlab/ UFPR	PR Brasil
Luiz Fernando Dale	C Medicina da Reprodução	RJ Brasil
Madalena Caldas	GERAR	PE Brasil
Marcos Sampaio	Origen	MG Brasil
Mariângela Badalotti	Fertilitat	RS Brasil
Marilena Correa	UERJ	RJ Brasil
Mario Cavagna	H Perola B/ I Sapientiae	SP Brasil
Marisa Decat de Moura	IBBRA/Mater Dei	BH Brasil
Newton E Busso	Unifert	SP Brasil
Paulo Serafini	Huntington/ USP	SP Brasil
Renzo Antonini Filho	I Saude da Mulher	MG Brasil
Ricardo Melo Marinho	Mater Dei	MG Brasil
Roberta Wonchockier	Projeto Alfa	SP Brasil
Roberto Coco	Fecunditas	Argentina
Rose Marie M Melamed	Fertility	SP Brasil
Sidney Glina	Hosp Albert Einstein	SP Brasil
Silvana Chedid	Chedid-Grieco	SP Brasil
Renato Fanchin		França

Diretoria da SBRA - 2009/2010**PRESIDENTE**

Adelino Amaral Silva
www.sbra.com.br

DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES**EDITORIA**

Maria do Carmo Borges de Souza

EDITOR ADJUNTO

Paulo Franco Taitson
e-mail: jornalsbra@cmb.com.br

PRESIDENTE

Adelino Amaral Silva

1º VICE PRESIDENTE

Bela Zausner

2º VICE PRESIDENTE

Condesmar Marcondes de Oliveira

1º SECRETÁRIO

Newton Eduardo Busso

2º SECRETÁRIO

Lídio Jair Ribas Centa

1º TESOUREIRO

Hitomi Miura Nakagava

2º TESOUREIRO

Marcelo de Pontes Rocha

Diretoria da REDLARA - 2009/2010**DIRETOR EXECUTIVO**

Dr. Ernesto Gallardo Lozano
México
E-mail: direjecutiva@redlara.com
www.redlara.com

VICE DIRETORA EXECUTIVA

Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
Brasil
E-mail: mariadocarmo@cmb.com.br

DIRETORES REGIONAIS

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

Dr. Carlos Félix Arce
México
carfelar@infosel.net.mx

REGIÃO: Bolívia, Chile & Peru

Dr. Fabrizio Vizcarra Alosilla
Peru
favizcarraredlara@gmail.com

REGIÃO: Colômbia, Equador & Venezuela

Dra. María Teresa Urbina
Venezuela
E-mail: mturbina@hotmail.com

REGIÃO: Argentina, Paraguai & Uruguai

Dr. Gabriel Fiszbajn
Argentina
E-mail: fiszbajn@cegyr.com

REGIÃO: Brasil

Dr. Selmo Geber
Brasil.
E-mail: selmogeber@origen.com.br

SECRETÁRIA EXECUTIVA

Marina Díaz
México
E-mail: info@redlara.com

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

RESUMO E ABSTRACT

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

Abood 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 sequência: *,†,‡,§,||,¶,**,††,‡‡.

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

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

GENERAL INFORMATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

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

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

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

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

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

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

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

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

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

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

TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

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

RESUMO AND ABSTRACT

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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

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

1. Journal Article

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

2. Book

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

3. Book Chapter

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

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

4. Electronic Journal Article

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

5. Article published in the Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABLES AND FIGURES

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

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

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

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

Graphs should be two-dimensional only.

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

MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

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

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

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

INFORMACIONES GENERALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARO DE LOS ORIGINALES

Utilice preferentemente Microsoft Word®. Los trabajos deben ser tecleados 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 sería: 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-clave 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 citaciones 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

Abood 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). 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
Escrever um artigo é difundir conhecimento

Paulo Franco Taitson

12

Artigo Original
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).

F. Zegers-Hochschild, G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, and S. Vanderpoel, for ICMART and WHO

14

Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)

F. Zegers-Hochschild, G. D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan, and S. Vanderpoel, for ICMART and WHO

19

Maturação in vitro de oócitos em ciclos não estimulados para pacientes portadoras de ovários policísticos

Nilo Frantz, Marcelo Ferreira, Gerta Frantz, Marcos Höher, Norma Oliveira, Talita Giacomet de Carvalho, Adriana Bos-Mikich

24

Embryo transfer based on previous uterine length measurement enhances ICSI outcomes when compared to standard ultrasonographic-guided embryo transfer.

Luiz Guilherme Louzada Maldonado, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Sérgio Aron Azjen, Rita Cássia Sávio Figueira, Assumpto Iaconelli Jr., Edson Borges Jr.

27

A síndrome do hiperestímulo ovariano não influencia os resultados clínicos após ciclos de descongelamento de embriões provenientes de ciclos de ICSI

Renata Cristina Ferreira, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Tsutomu Aoki, Assumpto Iaconelli Jr., Edson Borges Jr

32

Indução da foliculogênese em ovários congelados/descongelados e transplantados para o peritônio de ratas.

José Helvécio Kalil de Souza, Luis Felipe Victor Spyer Prates, Ana Carolina Ferreira Moreira, Marcos Sampaio, Selmo Geber

36

Artigo de Revisão
"Indução da ovulação nas pacientes más respondedoras: Uma revisão."

Luiz Eduardo Trevisan de Albuquerque, Fernanda Coimbra Miyasato, Gabriella Maciel Collier, Maria Cecília R. M. de Albuquerque, Litsuko Shimabukuro, Jacqueline Tiemi

41

Teria o HLA-E influência em reprodução humana?

Geórgia Fernanda Gelmini, Cynthia Hernandez Costa, Maria da Graça Bicalho, Valéria Maria Sperandio Roxo, Alessandro Schuffner.

50

Relato de Caso
Gestação quádrupla após IVF.

Höher M, Bos-Mikich A, Frantz G, Oliveira N, Dutra CG, Frantz N

55

Eventos

57

Escrever um artigo é difundir conhecimento

Por que é importante escrever? Qual a importância de estudiosos, cientistas e pesquisadores estarem produzindo artigos? Aquele que lê, não lê apenas, passivamente palavras. Mas, ao efetuar sua leitura, produz, no exercício da interpretação, um outro texto que lhe é próprio, que lhe é pertinente na sua interpretação. O leitor é, neste sentido, co-autor de uma obra que se perpetua, justamente, pela sua possibilidade de ser re-lido e, portanto, reescrito. Pode-se inferir que um texto publicado e lido é um texto que é destituído de seu caráter solitário (obra de um único sujeito) e se transforma em resultado de parceria entre autor e leitor, por um processo sutil de reescrita. Aqueles que produzem conhecimento, que investigam o real e o re-significam utilizando critérios e caminhos apropriados estão inseridos no locus científico. São personagens que difundem conhecimento, compartilham informações e orientam no tratar pacientes. E o que é a Ciência senão um modo de indagar e uma maneira de buscar respostas? A ciência alimenta-se e se perpetua pela sua capacidade de manter acesa perguntas e desafios frente a uma realidade que torna a perplexidade do ser humano a sua possibilidade de interferência, domínio e modificação do real. Assim, ao expor, publicar e divulgar um certo conjunto de proposições ou de dados resultantes de pesquisas efetuados, oportuniza-se a ampliação, enriquecimento ou refutação do trabalho em questão. Pois, a ciência e o saber produzido por ela é fruto de diálogos, concessões e adequações a métodos e paradigmas. Escrever um artigo científico não é muito diferente de produzir uma obra de arte. Igualmente, um pesquisador precisa de inspiração, idéias originais, conhecimento de técnica, um bom computador e um meio de divulgação de sua obra (eventos, livros, periódicos...). Sendo, pois, assim, necessário que o autor restrinja a sua terminologia e a adeque à compreensão de quem lê. Para tal, o pesquisador, a fim de garantir a exatidão e a clareza de seu texto, deve se exercitar na prática da descrição e da narração. É importante que, seja a descrição, seja a narração, devem ser completas e detalhadas, para que seja possível a perpetuação e a compreensão do conhecimento exposto e para que possa servir como um catalisador de novas produções. Escreva. Compartilhe com a SBRA a sua experiência.

Paulo Franco Taitson

Editor Adjunto do JBRA Assisted Reproduction

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

Fertilidade.

0800.113320
Serviço de Atendimento ao Cliente

Merck Serono
Living science, transforming lives

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).

Traduzido e Publicado pela Red Latinoamericana de Reproducción Asistida em 2010
© Red Latinoamericana de Reproducción Asistida 2010

O Diretor Geral da Organização Mundial da Saúde concedeu os direitos de tradução para uma edição em Português à Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, que é unicamente responsável pela edição em Português.

F. Zegers-Hochschild¹, G. D. Adamson², J. de Mouzon³, O. Ishihara⁴, R. Mansour⁵, K. Nygren⁶, E. Sullivan⁷, and S. Vanderpoel⁸, for ICMART and WHO

¹Unit of Reproductive Medicine, Clínica las Condes, Santiago, Chile;

²Fertility Physicians of Northern California, Palo Alto and San Jose, California, USA;

³INSERM U822, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre Cedex, Paris, France;

⁴Saitama Medical University Hospital, Moroyama, Saitama, Japan;

⁵Cairo, Egypt;

⁶IVF Unit, Sophiahemmet Hospital, Stockholm, Sweden;

⁷Perinatal and Reproductive Epidemiology and Research Unit, School of Women's and Children's Health, University of New South Wales, Sydney, Australia; and

⁸Department of Reproductive Health and Research and the Special Program of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization, Geneva, Switzerland

OBJETIVO

Muitas definições usadas em reprodução medicamente assistida variam, tornando difícil a padronização e a comparação dos procedimentos em diferentes países e regiões. Com a expansão mundial das intervenções em infertilidade, incluindo aqueles locais de menores recursos, a importância e o valor de nomenclatura comum é crítica. O objetivo é desenvolver um conjunto de definições internacionalmente aceito e continuamente atualizado, que seria utilizado para padronizar e harmonizar dados de coletas internacionais, ajudando à monitorização da viabilidade, eficácia e segurança da tecnologia reprodutiva assistida praticada em todo o mundo.

MÉTODO

Setenta e dois clínicos, cientistas de áreas básicas, epidemiologistas e cientistas sociais se reuniram na sede da OMS, em Genebra, em dezembro de 2008. Vários meses antes, três grupos de trabalho foram estabelecidos, sendo responsáveis pela terminologia em três áreas específicas: condições clínicas e procedimentos, procedimentos laboratoriais e avaliação de resultados. Cada grupo reviu o glossário existente do ICMART, fez recomendações para revisões e introduziu novos termos a serem considerados para a expansão.

RESULTADO

Chegou-se a um consenso em 87 dos termos, expandindo o glossário em 34 termos, que incluíram definições para numerosos procedimentos clínicos e laboratoriais. Ênfase especial foi buscada na descrição de resultados, como taxa cumulativa de partos e outros marcadores de segurança e eficácia em TRA.

CONCLUSÃO

A terminologia padronizada deverá ajudar na análise das tendências das intervenções em reprodução medicamente assistida e na comparação dos resultados de TRA em diferentes países e regiões. O glossário contribuirá para a comunicação padronizada entre profissionais responsáveis pela prática da TRA, assim como entre os responsáveis pelos registros nacionais, regionais e internacionais (Fertil Steril@2009;92:1520-4.©2009 by American Society for Reproductive Medicine.)

A necessidade de definições padronizadas é crítica para a aferição dos resultados dos procedimentos de TRA, em nível nacional ou internacional. O aumento da utilização de TRA mundialmente e as contínuas discussões, controvérsias e debates sobre as medidas de eficácia e segurança têm gerado interesse público e científico (1-4). Definições utilizadas em diferentes países são frequentemente resultado de adaptações a particularidades médicas, culturais e religiosas locais. Todavia, quando se realiza coleta de dados internacional, a padronização é necessária para a monitorização da eficácia, segurança e qualidade dos procedimentos, assim como para a realização de pesquisas multinacionais.

O Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART), entidade responsável pela coleta e disseminação de dados mundiais de TRA, publicou o primeiro glossário em terminologia de TRA em 2006 (5,6). Este primeiro glossário, em particular, resultou de discussões de participantes de um encontro internacional sobre "Aspectos médicos, éticos e sociais da Reprodução Assistida", organizado pela OMS em 2001 (7).

Em dezembro de 2008, a OMS com a assistência do ICMART, da Fundação Low Cost FIV (LCIVFF) e da Federação

ração Internacional das Sociedades de Fertilidade (IFFS), organizou um Encontro Internacional da OMS sobre "Tecnologias Reprodutivas Assistidas: terminologia em comum e gerenciamento em locais de poucos recursos". Membros do ICMART e da OMS foram responsáveis pela cuidadosa revisão e melhora dos extensos existentes no "Glossary on ART Terminology" (5,6). Eles foram guiados pelo objetivo de desenvolver um conjunto de definições que ajudaria a padronizar e harmonizar a coleta de dados internacionais para monitorizar a viabilidade, a eficácia e a segurança das intervenções de TRA, a fim de se obter dados de alta qualidade em todos os locais, inclusive os de menores recursos.

A OMS, em colaboração com o comitê organizador, reuniu profissionais de saúde de países desenvolvidos e em desenvolvimento, que foram selecionados por sua experiência e/ou representatividade nas maiores sociedades internacionais ou nacionais de saúde reprodutiva, incluindo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), a Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), o Comitê Internacional para Monitorização da Tecnologia Reprodutiva Assistida (ICMART), a Rede Latino-americana de Reprodução Assistida (REDLARA), a Federação Internacional das Sociedades de Fertilidade (IFFS), a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO), a Sociedade de Fertilidade do Oriente Médio (MEFS), a Sociedade Japonesa de Medicina Reprodutiva (JSRM), a Sociedade Japonesa de Ginecologia e Obstetria (JSOG), a Sociedade de Obstetria e Ginecologia de Burkina (SOGOB), a Sociedade Chinesa de Medicina Reprodutiva, a Sociedade Indiana de Reprodução Assistida, a Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA), a Sociedade Mundial de Endometriose (WES), a Sociedade de Fertilidade da Austrália (FSA), a Sociedade Internacional para *mild approaches* em Reprodução Assistida (ISMAAR), a Associação Russa de Reprodução Humana (RAHR), a Iniciativa Ásia Pacífico em Reprodução (ASPIRE), e a Fundação *Low Cost IVF* (LCIVFF), assim como os editores dos periódicos *Fertility and Sterility* e *Human Reproduction*.

METODOLOGIA DE TRABALHO

Esta versão revisada e aumentada do glossário do ICMART é o resultado da discussão e consenso entre 72 clínicos, cientistas de áreas básicas, epidemiologistas e cientistas sociais, que se reuniram na sede da OMS, em Genebra, Suíça, de 1 a 5 de dezembro de 2008. Meses antes, três grupos de trabalho foram estabelecidos, cada um deles responsável pela revisão do glossário existente, recomendando novas terminologias para procedimentos clínicos, laboratoriais e avaliação de resultados. Os profissionais facilitadores de cada grupo de trabalho foram, em ordem alfabética:

Clínicos: David Adamson, Thomas D'Hooghe, Osamu Ishihara, Fernando Zegers-Hochschild.

Laboratório: Trevor Cooper, Outi Hovatta, Arne Sunde, Alan Trouson.

Resultados: Maryse Bonduelle, Jacques de Mouzon, Orvar Finnström, Hassan Sallam.

Cada termo, com sua definição, foi apresentado pelo grupo de trabalho apropriado a todos os participantes, dentro das sessões do encontro da OMS de 2008. A versão final do glossário foi gerada pelos participantes a partir da discussão, revisão dos termos antigos e novos, assim como oportunidades para esclarecimentos e introdução de sugestões antes do consenso final para cada termo. Antecipamos que este glossário irá contribuir para uma comunicação mais fluida entre os profissionais responsáveis pela prática da TRA, assim como aqueles responsá-

veis pelos registros nacionais, regionais e internacionais dos dados de TRA. A terminologia padronizada deverá ajudar na análise das tendências das intervenções em reprodução medicamente assistida e na comparação dos resultados de TRA em diferentes países e regiões. Este glossário não inclui avaliações específicas de "sucessos", o que incluiria considerações de bem-estar dos bebês, assim como de suas mães, pais, carreadoras (*surrogates*) e/ou doadores de gametas.

GLOSSÁRIO

Abortamento espontâneo (*miscarriage*)- perda espontânea de gestação clínica antes da 20ª semana completa (18 semanas pós-fertilização) ou, se a idade gestacional não é conhecida, a perda de embrião/feto com menos que 400g.

Abortamento espontâneo recorrente (*miscarriage*)- perda espontânea de duas ou mais

gestações clínicas.

Abortamento induzido- o término de uma gravidez clínica, por interferência deliberada antes de 20 semanas completas de idade gestacional (18 semanas pós-fertilização) ou, se a idade gestacional é desconhecida, de um embrião/feto de menos de 400g.

Aborto retido- aborto clínico quando o embrião(ões) ou feto(s) não-viável(eis) não é /são expelido(s) espontaneamente do útero.

Anomalias congênitas- todas as anomalias estruturais, funcionais e genéticas, diagnosticadas nos fetos abortados, ao nascimento ou no período neonatal.

Assisted hatching - procedimento *in vitro* no qual a zona pelúcida (ZP) de um embrião é perfurada por método químico, mecânico ou por laser, para facilitar a extrusão do blastocisto.

Baixo peso ao nascer- peso ao nascer abaixo de 2500g.

Baixo peso acentuado ao nascer- peso ao nascer abaixo de 1500g.

Baixo peso extremo- recém-nato com menos de 1000g.

Blastocisto- um embrião, cinco ou seis dias pós-fertilização, com a massa interna, uma camada externa de trofotoderma e a blastocela e cavidade cheia de fluido.

Carreadora gestacional, Mãe-substituta ou Receptora da Gravidez (*Surrogate*)- mulher que carrega a gestação com a anuência de que dará o produto para o responsável(eis) contratante(s). Os gametas podem ser originários do(s) contratante(s) e/ou de terceira(s) pessoa(s).

Ciclo cancelado- ciclo de TRA no qual a estimulação ou a monitorização ovariana foram realizadas com a intenção do tratamento, mas não se procedeu à aspiração folicular ou, no caso de embriões descongelados, à transferência de embriões.

Ciclo de doação de oócitos- ciclo no qual oócitos são coletados de uma doadora para aplicação clínica ou pesquisa.

Ciclo de oócito congelado/descongelado- procedimento de TRA no qual a monitorização do ciclo é realizada com a intenção de fertilizar oócitos descongelados e realizar transferência embrionária.

Ciclo de recepção de embriões- ciclo de TRA no qual a mulher recebe zigoto(s) ou embrião(ões) de doadora(s).

Ciclo de recepção de espermatozoides- ciclo de TRA no qual a mulher recebe espermatozoides de um doador que não é o seu parceiro.

Ciclo de recepção de oócitos- ciclo de TRA no qual a mulher recebe oócitos de doadora.

Ciclo de transferência de embriões- ciclo de TRA no qual um ou mais embriões são transferidos para o útero ou tuba de Falópio.

Ciclo de transferência de embriões congelados/descongelados- procedimento de TRA no qual a monitorização do ciclo é realizada com a intenção de transferir um ou mais embrião/ões congelado(s)/descongelado(s).

Ciclo iniciado- ciclo de TRA no qual a mulher recebe medicações específicas para estimulação ovariana, ou monitorização no caso de ciclos naturais, com a intenção de tratar, independentemente se a aspiração será realizada ou não.

Ciclo natural modificado- procedimento de FIV no qual um ou mais oócitos são coletados dos ovários durante ciclo espontâneo. Medicações podem ser usadas apenas com o propósito de bloquear o pico endógeno do LH e/ou induzir a maturação oocitária final.

Cirurgia reprodutiva- procedimentos cirúrgicos realizados para diagnosticar, corrigir e/ou melhorar a função reprodutiva.

Criopreservação- congelamento ou vitrificação e estocagem de gametas, zigotos, embriões ou tecido gonadal.

Doação de embriões- é a transferência de um ou mais embriões, resultantes de gametas (espermatozoides e oócitos), que não são originários da receptora ou de seu marido/parceiro.

Embrião- produto da divisão do zigoto ao fim do estágio embrionário, 8 dias após a fertilização. (Esta definição não inclui tanto produtos derivados de partenogênese quanto produtos da transferência de células somáticas nucleares).

Estimulação ovariana controlada para TRA- tratamento farmacológico no qual mulheres são estimuladas para induzir o desenvolvimento de múltiplos folículos ovarianos, para obter múltiplos oócitos na aspiração folicular.

Estimulação ovariana controlada para ciclos sem TRA- tratamento farmacológico para mulheres, cujos ovários são estimulados para ovular mais de um oócito.

Fertilização- a penetração do óvulo pelo espermatozoide e a combinação do material genético, resultando na formação de um zigoto.

Feto- o produto da fertilização desde o desenvolvimento embrionário com 8 semanas completas após a fertilização até o abortamento ou nascimento.

FIV (fertilização *in vitro*)- procedimento de TRA que envolve fertilização extra-corpórea.

FIV com ciclo natural- procedimento de FIV onde um ou mais oócitos são coletados dos ovários durante ciclo espontâneo, sem qualquer intervenção hormonal.

FIV com estimulação leve (*mild ovarian stimulation*)- procedimento no qual os ovários são estimulados com gonadotrofinas e/ou outros compostos, com o propósito de se limitar o número de oócitos obtidos a menos de 7.

GIFT (*Gamete intrafallopian transfer*)- procedimento de TRA no qual ambos os gametas (oócitos e espermatozoides) são transferidos para as tubas uterinas.

Gravidez bioquímica (abortamento espontâneo pré-clínico, *miscarriage*)- gravidez diagnosticada somente pela detecção do HCG no soro ou urina e que não se desenvolve para uma gravidez clínica.

Gravidez clínica- gravidez diagnosticada por visualização ultra-sonográfica de um ou mais sacos gestacionais ou sinais clínicos definitivos de gravidez. Inclui a prenhez ectópica.

Nota: sacos gestacionais múltiplos são contados como uma gestação clínica.

Gravidez clínica com batimento cardíaco fetal- gravidez diagnosticada por visualização ultra-sonográfica ou documentação clínica de pelo menos um feto com batimento cardíaco. Inclui a prenhez ectópica.

Gravidez ectópica- gestação em que a implantação ocorreu fora da cavidade uterina.

Gravidez múltipla/nascimento- gestação/parto com mais de um feto/neonato.

Hatching (extrusão)- processo pelo qual o embrião no estágio de blastocisto se separa da zona pelúcida.

ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides)- procedimento no qual um único espermatozoide é injetado no citoplasma do oócito.

Idade gestacional- idade do embrião ou feto, calculada adicionando-se 2 semanas (14 dias) ao número de semanas completas desde a fertilização. *Nota: para transferências de embriões congelados/descongelados, a data estimada da fertilização é computada subtraindo-se a idade do embrião no congelamento da data da transferência do ciclo de transferência de embriões congelados/descongelados.*

Implantação- a adesão e posterior invasão pelo blastocisto livre da zona pelúcida, (geralmente no endométrio), que se inicia 5-7 dias pós-fertilização.

Indução da ovulação(10)- tratamento farmacológico de mulheres com anovulação ou oligo-ovulação com a intenção de induzir ciclos ovulatórios normais.

Infertilidade (definição clínica)- doença do sistema reprodutivo definida pela falha de se obter gravidez clínica após 12 meses ou mais de coito regular desprotegido.

MESA (*Microsurgical epididymal sperm aspiration*)- procedimento no qual espermatozoides são obtidos do epidídimo, através de aspiração.

MESE (*Microsurgical epididymal sperm extraction*)- procedimento no qual espermatozoides são obtidos do epidídimo, através de excisão cirúrgica.

Micromanipulação- tecnologia que permite procedimentos micro-operatórios realizados em espermatozoides, oócitos, zigotos ou embriões.

MicroTESE (*Microsurgical testicular sperm extraction*)- procedimento no qual espermatozoides são obtidos do testículo, através de excisão cirúrgica.

Mortalidade perinatal- morte fetal ou neonatal ocorrendo durante gestação tardia (às 20 semanas completas ou após), durante o nascimento ou até 7 dias completos após.

Múltiplos- gravidez ou parto com três ou mais fetos ou neonatos.

Nascido vivo- a completa expulsão ou extração da mãe, de um produto de fertilização, independentemente da duração da gravidez, o qual, após tal separação, respira ou exibe qualquer sinal de vida como batimento cardíaco, pulsação do cordão umbilical ou movimentos musculares voluntários definidos, independentemente se o cordão umbilical tenha sido cortado ou se a placenta esteja anexada.

Neomorto (Óbito neonatal)- morte de bebê nascido vivo, ocorrida até 28 dias do nascimento.

Nascimento pré-termo extremo- nascido vivo ou natimorto após pelo menos 20 semanas, mas menos do que 28 semanas completas de idade gestacional.

Nascimento a termo- nascido vivo ou óbito fetal (natimorto), que ocorre entre 37 e 42 semanas completas de idade gestacional.

Natimorto (Óbito fetal)- morte antes da completa expulsão ou extração da mãe, de um produto de fertilização, no curso ou após completadas 20 semanas de gravidez. O óbito é indicado pelo fato de que, após esta separação, o feto não respira ou exibe qualquer sinal de vida como batimento cardíaco, pulsação do cordão umbilical ou movimentos musculares voluntários definidos.

Neomorto- morte de bebê nascido vivo, ocorrida até 7 dias do nascimento.

Parto- a expulsão ou extração de um ou mais fetos da mãe após 20 semanas completas de idade gestacional.

Pequeno para a idade gestacional- peso ao nascer menor que 2 desvios padrão abaixo da média ou abaixo do percentil 10, de acordo com os gráficos locais de crescimento intrauterino.

Período neonatal- intervalo de tempo que se inicia no nascimento e termina com 28 dias completos do nascimento.

PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration)- aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo.

PGD (Preimplantation genetic diagnosis)- análise de corpúsculos polares, blastômeros ou trofotoderma de oócitos, zigotos ou embriões para detecção de alterações genéticas cromossômicas específicas, alterações cromossômicas estruturais e/ou outras.

PGS (Preimplantation genetic screening)- análises de corpúsculos polares, blastômeros ou trofotoderma de oócitos, zigotos ou embriões para detecção de aneuploidias, mutações e/ou rearranjo de DNA.

Pré-termo- nascido vivo ou natimorto após ao menos 20 semanas de gravidez, mas com menos de 37 semanas completas.

Pré-termo acentuado- nascido vivo ou natimorto após ao menos 20 semanas de gravidez, mas com menos de 32 semanas completas.

Pós-termo (serotínico)- nascido vivo ou natimorto após 42 semanas completas de idade gestacional.

Redução embrionária/fetal- procedimento para reduzir o número de embriões viáveis ou fetos numa gestação múltipla.

Reprodução medicamente assistida- reprodução obtida por meio da indução da ovulação, estimulação ovariana controlada, desencadeamento da ovulação, procedimentos de TRA, inseminação intrauterina, intra-cervical e intravaginal com sêmen do marido/parceiro ou doador.

Saco gestacional- estrutura de conteúdo líquido, associada a gestação precoce, que pode estar localizada dentro ou fora do útero (no caso de prenhez ectópica).

Síndrome de hiperestímulo ovariano (SHO)- resposta sistêmica exagerada à estimulação ovariana, caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas e laboratoriais. É classificada em leve, moderada e acentuada de acordo com o grau de distensão abdominal, aumento ovariano e complicações respiratórias, hemodinâmicas e metabólicas.

SHO severa- definida quando a hospitalização é indicada (ver definição de SHO).

Taxa de gravidez clínica- número de gestações clínicas expresso por 100 ciclos iniciados, ciclos aspirados ou ciclos com transferência de embriões. *Nota: quando taxas de gravidez clínica são dadas, o denominador (ciclos iniciados, aspirados ou com transferência de embriões) deve ser especificado.*

Taxa de implantação- é o número de sacos gestacionais observados, dividido pelo número de embriões transferidos.

Taxa de nascidos vivos- número de partos que resultaram em pelo menos um nascido vivo, expresso por 100 ciclos iniciados, ciclos aspirados ou por ciclos de transferência embrionária. Quando enunciado, o denominador (ciclos iniciados, ciclos aspirados ou por ciclos de transferência embrionária) deve sempre ser especificado.

Taxa de parto- número de deliveries por 100 ciclos iniciados, aspirados ou de transferência embrionária. Quando informada, o denominador da equação deve sempre ser especificado (ciclos iniciados, aspirados ou de transferência embrionária). Inclui partos que resultaram em um ou mais nascidos vivos e/ou natimortos. *Nota: o parto único, gemelar ou múltiplo é registrado como um parto.*

Taxa de parto após tratamento com TRA por paciente- número de partos com pelo menos um nascido vivo por paciente após um número específico de tratamentos com TRA.

Taxa de parto cumulativa com ao menos um nascido vivo- número estimado de partos com ao menos um nascido vivo resultando de um ciclo de TRA iniciado ou aspirado, incluindo o ciclo quando foram transferidos embriões frescos e subsequentes ciclos de embriões congelados/descongelados. Esta taxa é utilizada quando o número de embriões frescos e/ou congelados/descongelados utilizados é menor que o total de embriões de um único ciclo. *Nota: o parto único, gemelar ou múltiplo é registrado como um parto.*

Taxa total de partos com ao menos um nascido vivo- número estimado de partos com ao menos um nascido vivo, resultando de um ciclo iniciado ou aspirado de TRA. Inclui todos os ciclos de TRA a fresco e todos os congelados/descongelados. Este índice é utilizado quando todos os embriões a fresco e/ou congelados/descongelados foram utilizados a partir de um ciclo de TRA. *Nota: o parto de um bebê único, gêmeos ou múltiplos é registrado como um único evento.*

Técnicas de Reprodução Assistida (TRA)- todos os tratamentos ou procedimentos que incluem a manipulação in vitro tanto dos oócitos humanos quanto dos espermatozóides, ou embriões, com o propósito de se estabelecer uma gravidez. Inclui, mas não está limitado a, a fertilização in vitro com transferência de embriões, a transferência intratubária de gametas, a transferência intratubária de zigotos, a transferência intratubária de embriões, a criopreservação de gametas e embriões, a doação de oócitos e embriões e a cessão temporária de útero (*surrogacy*). TRA não inclui inseminação assistida (inseminação artificial) utilizando espermatozóides, sejam do parceiro da mulher ou de um doador.

TESA (Testicular sperm aspiration)- procedimento no qual espermatozóides são obtidos por aspiração testicular.

TESE (Testicular sperm extraction)- procedimento no qual espermatozóides são obtidos por excisão cirúrgica de tecido testicular.

Torsão ovariana- rotação completa ou parcial do pedículo vascular ovariano que causa obstrução do fluxo sanguíneo ovariano, potencialmente levando à necrose do tecido ovariano.

Transferência de embriões- procedimento no qual um ou mais embriões são colocados no útero ou tuba de Falópio.

Transferência eletiva de embriões- a transferência de um ou dois embriões, selecionados de uma coorte maior de embriões viáveis.

Vanishing sac(s) or embryo(s) (sacos ou embriões desaparecidos)- desaparecimento espontâneo de um ou mais sacos gestacionais ou embriões numa gestação em curso, documentados por ultra-sonografia.

Vitrificação- método de congelamento ultra-rápido, que previne a formação de gelo dentro da suspensão, que é convertida para um estado vítreo.

Zigoto- célula diplóide resultante da fertilização de um oócito por um espermatozóide, que subsequentemente se divide para formar um embrião.

ZIFT (zygote intrafallopian transfer)- procedimento em que zigoto(s) é/são transferido(s) para as tubas uterinas.

Referências

1. Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART). World collaborative report on in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000;2006(85):1586-622.
2. de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, et al.; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology. World collaborative report on in-vitro fertilization, 2004. *Hum Reprod*. In press.
3. Dickey RP. The relative contribution of assisted reproductive

technologies and ovulation induction to multiple births in the United States 5 years after the Society for Assisted Reproductive Technology/American Society for Reproductive Medicine recommendation to limit the number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2007;88:1554-61.

4. European IVF-Monitoring Consortium, European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756-71.

5. Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, Sullivan E. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies, The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) glossary on ART terminology. *Fertil Steril* 2006;86:16-9.

6. Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, Sullivan E. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod* 2006;21:1968-70.

7. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology. The ICMART glossary. Current practices and controversies in assisted reproduction. Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002:xix-xxi. 1524

Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Traducido y Publicado por la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida em 2010
© Organización Mundial de la Salud 2010

El Director General de la Organización Mundial de la Salud concedió los derechos de traducción para una edición em Español a la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, que es la única responsable por la edición en Español.

F. Zegers-Hochschild,¹ G. D. Adamson,² J. de Mouzon,³ O. Ishihara,⁴ R. Mansour,⁵ K. Nygren,⁶ E. Sullivan,⁷ and S. Vanderpoel,⁸ for ICMART and WHO

¹ Unit of Reproductive Medicine, Clinicas las Condes, Santiago, Chile;

² Fertility Physicians of Northern California, Palo Alto and San Jose, California;

³ INSERM U822, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre Cedex, Paris, France;

⁴ Saitama Medical University Hospital, Moroyama, Saitama, Japan;

⁵ Cairo, Egypt;

⁶ IVF Unit, Sophiahemmet Hospital, Stockholm, Sweden;

⁷ Perinatal and Reproductive Epidemiology and Research Unit, School of Women's and Children's Health, University of New South Wales, Sydney, Australia; and

⁸ Department of Reproductive Health and Research and the Special Program of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction, World Health Organization, Geneva, Switzerland

OBJETIVO

Muchas definiciones utilizadas en la reproducción médicamente asistida (MAR) varían en diferentes contextos, lo que hace difícil estandarizar y comparar los procedimientos entre los distintos países y regiones. Con la expansión de los tratamientos de infertilidad en todo el mundo, incluyendo los lugares de más bajos recursos, La importancia y el valor de tener una nomenclatura común son evidentes. El objetivo de este trabajo es desarrollar un glosario con definiciones aceptadas internacionalmente e ir continuamente actualizando estas definiciones, para uniformar y armonizar la colección de datos, y para ayudar en el control de la disponibilidad, la eficacia y la seguridad de las técnicas de reproducción asistida (TRA) que se practican en todo el mundo.

MÉTODO

Setenta y dos profesionales clínicos, científicos básicos y sociales, y epidemiólogos se reunieron en la sede de la Organización Mundial de la Salud en Ginebra, Suiza, en diciembre de 2008. Varios meses antes, tres grupos de trabajo se hicieron responsables de trabajar en la terminología en tres áreas específicas: condiciones y procedimientos clínicos, procedimientos de laboratorio y evaluación de los resultados. Cada grupo analizó el actual Glosario del International Committee for Monitoring ART (ICMART). Se formularon recomendaciones para su revisión y se propusieron nuevas terminologías para expandir el glosario.

RESULTADO

Se logró un consenso sobre 87 términos, ampliando el glosario original de 34 términos, que incluía las definicio-

nes de numerosos procedimientos clínicos y de laboratorio. Se hizo especial hincapié en la terminología destinada a evaluar resultados, tales como la tasa acumulativa de partos y otros marcadores de seguridad y eficacia em TRA.

CONCLUSIÓN

La terminología estandarizada debería ayudar en el análisis de tendencias em las intervenciones de MAR y en la comparación de resultados de las TRA entre los distintos países y regiones. Este glosario contribuirá a una comunicación más estandarizada entre los profesionales responsables de la práctica de las TRA, así como los responsables de los registros internacionales nacionales y regionales.

La estandarización de definiciones es crucial para la evaluación y comparación de los resultados de reproducción asistida (TRA) tanto a nivel nacional e internacional. El incremento en el uso de TRA en todo el mundo y las continuas discusiones, controversias, y debates sobre las medidas de eficacia y seguridad han generado interés tanto científico como público (1-4). Las definiciones utilizadas en reproducción asistida en los diferentes países, con frecuencia, son el resultado de las adaptaciones a asuntos médicos, culturales y religiosos particulares. Sin embargo, al realizar la recopilación de datos internacionalmente, la normalización es necesaria para que el seguimiento de la eficacia, seguridad y calidad de los procedimientos y la investigación multinacional puedan llevarse a cabo.

El International Committee for Monitoring ART (ICMART), entidad responsable de la colección y difusión de datos de TRA a nivel mundial, publicó el primer glosario de terminología de TRA en 2006 (5, 6). Ese glosario en particular

fue el resultado de las conversaciones de los participantes en una reunión internacional Sobre "Aspectos Médicos, Éticos y Sociales de la Reproducción Asistida", organizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2001 (7). En diciembre de 2008, la OMS, con la asistencia de ICMART, la Fundación Low Cost FIV (LCIVFF) y la Federación Internacional de Sociedades de Fertilidad (IFFS), organizó una reunión internacional sobre "Técnicas de Reproducción Asistida: Terminología común y El manejo en lugares de bajos recursos". Los miembros de ICMART y OMS fueron los responsables de dirigir una revisión extensa para mejorar la terminología del ya existente Glosario de TRA (5, 6). Fueron guiados por el objetivo de desarrollar un conjunto de definiciones internacionalmente aceptadas que ayudaran a estandarizar y armonizar la captura de datos para supervisar la disponibilidad, la eficacia y seguridad de las intervenciones de punta para lograr datos de alta calidad en todos los ámbitos, incluidos los de lugares de bajos recursos.

La OMS, en colaboración con el comité organizador, se reunió con profesionales de la salud de países desarrollados y países en desarrollo, que fueron seleccionados por su experiencia y / o como representantes de las principales organizaciones médicas de salud reproductiva internacionales y nacionales incluyendo American Society for Reproductive Medicine, European Society for Human Reproduction and Embryology, ICMART, Red Latino Americana de Reproducción Asistida, IFFS, International Federation of Gynaecology and Obstetrics, Middle East Fertility Society, Japan Society for Reproductive Medicine, Japan Society for Obstetrics and Gynaecology, Society of Obstetrics and Gynaecology of Burkina, Chinese Society of Reproductive Medicine, Indian Society for Assisted Reproduction, Brazilian Society of Assisted Reproduction, World Endometriosis Society, Fertility Society of Australia, International Society for Mild Approaches to Assisted Reproduction, Russian Association of Human Reproduction, Asia Pacific Initiative on Reproduction, and LCIVFF, así como con editores de las revistas Fertility and Sterility y Human Reproduction.

METODOLOGÍA DE TRABAJO

Esta versión revisada y mejorada del glosario ICMART es el resultado de la discusión y el consenso alcanzado entre 72 médicos, profesionales de ciencias básicas y sociales y epidemiólogos que se reunieron juntos en la sede de la OMS en Ginebra, Suiza, del 1 al 5 de diciembre de 2008. Tres grupos de trabajo se establecieron con varios meses de antelación. Cada grupo de trabajo se encargó de examinar el glosario existente y recomendar nuevas terminologías para definir términos clínicos, de laboratorio y de resultados.

Los profesionales que coordinaron cada grupo de trabajo, en orden alfabético, fueron:

Clínica: David Adamson, Thomas D'Hooghe, Osamu Ishihara, y Fernando Zegers-Hochschild.

Laboratorio: Trevor Cooper, Outi Hovatta, Arne Sundé, y Alan Trounson.

Resultados: Maryse Bonduelle, Jacques de Mouzon, Orvar Finnström, y Hassan Sallam.

Cada término, con su definición, fue presentado por cada grupo de trabajo a todos los participantes en las sesiones del 2008 de la reunión de la OMS. La versión final del glosario fue generada por los participantes en la reunión tras un debate profundo seguido de discusiones informales durante una semana, en relación a las definiciones nuevas y existentes. Las aclaraciones y sugerencias fueron capturadas por los grupos de trabajo antes de que un consenso final sobre cada término y definición se alcanzara.

Prevedemos que este glosario contribuirá a una comunicación más fluida entre los profesionales responsables de la práctica de TRA, así como de los responsables de los registros nacionales, regionales e internacionales. La terminología normalizada debería ayudar al análisis de las tendencias mundiales y la comparación de los resultados a través de países y regiones. Este glosario no incluye medidas específicas de "éxito" que podrían llevar en consideraciones variadas respecto del bienestar de bebés, madres, padres y donantes de gametos.

GLOSARIO

Aborto espontáneo: pérdida espontánea de un embarazo clínico antes de completadas las 20 semanas de edad gestacional (18 semanas después de la fecundación) o si la edad gestacional es desconocida, la pérdida de un embrión/feto de menos de 400 g.

Aborto inducido: La interrupción deliberada de un embarazo clínico que tiene lugar antes de completar las 20 semanas de edad gestacional (18 semanas después de la fecundación) o, si la edad gestacional es desconocida, de un embrión o fetos de menos de 400 g.

Aborto recurrente espontáneo: pérdida de dos o más embarazos clínicos.

Aborto retenido: aborto clínico donde el embrión o feto es no viable y no es expulsado espontáneamente del útero.

Anomalías congénitas: todas las anomalías estructurales, funcionales y genéticas diagnosticadas en fetos abortados, en bebés al nacer o en el período neonatal.

Bajo peso al nacer: peso al nacer menor a 2.500 g.

Blastocisto: embrión, 5 ó 6 días después de la fecundación, con masa celular interna, capa externa de trofocotodermo y cavidad o blastocelo lleno de líquido.

Ciclo cancelado: ciclo de TRA en el cual la estimulación ovárica y el monitoreo han sido llevados a cabo con la intención de hacer un tratamiento, pero no se procedió a la aspiración folicular o a la transferencia del embrión, en el caso de un embrión descongelado.

Ciclo de donación de ovocitos: ciclo en el cual los ovocitos de una donante son obtenidos para aplicación clínica o de investigación.

Ciclo de receptora de embriones: un ciclo de TRA en el cual la mujer recibe cigotos o embriones donados.

Ciclo de receptora de ovocitos: ciclo de TRA en el cual una mujer recibe ovocitos de una donante.

Ciclo de transferencia de embriones criopreservados/descongelados (TEC/D): procedimiento de TRA en el cual el monitoreo es llevado a cabo con la intención de transferir embriones criopreservados- descongelados. Nota: un ciclo de TEC/D ES iniciado cuando la medicación específica es indicada o el monitoreo del ciclo es iniciado con la intención de tratamiento.

Ciclo de transferencia de embriones: ciclo de TRA durante el cual uno o más embriones son colocados en el útero o en la trompa de Fallopio.

Ciclo de transferencia de ovocitos criopreservados/descongelados (TEC/D): procedimiento de TRA en el cual el monitoreo es llevado a cabo con la intención de fecundar ovocitos criopreservados/descongelados y transferir los embriones formados.

Ciclo iniciado: ciclo de TRA en el cual la mujer recibe medicación para estimulación ovárica, o monitoreo en el caso de ciclos naturales, con la intención de llevar a cabo un tratamiento, independientemente de si se realiza la aspiración de ovocitos.

Ciclo natural de FIV: procedimiento de FIV en el cual uno o más ovocitos son obtenidos de los ovarios durante un ciclo menstrual espontáneo sin uso de drogas.

Ciclo natural modificado: procedimiento de FIV en el cual uno o más ovocitos son obtenidos de los ovarios durante un ciclo menstrual espontáneo. Las drogas son administradas con el único propósito de bloquear el pico espontáneo de LH e inducir la maduración final del ovocito.

Ciclo para receptora de espermatozoides: ciclo de TRA en el cual una mujer recibe espermatozoides de un donante que no es su pareja.

Cirugía reproductiva: procedimientos quirúrgicos realizados para diagnosticar, conservar, corregir, y/o mejorar la función reproductiva.

Criopreservación: la congelación o la vitrificación y el almacenamiento de gametos, cigotos, embriones o tejido gonadal.

Diagnóstico genético preimplantación (DGP): análisis de cuerpos polares, blastómeras o trofoectodermo de ovocitos, cigotos o embriones para la detección de alteraciones específicas, genéticas, estructurales, y/o cromosómicas.

Donación de embriones: transferencia de embriones resultantes de gametos

(espermatozoides y ovocitos) que no se originaron de la receptora y su pareja.

Eclosión asistida: procedimiento *in vitro* mediante el cual la zona pelúcida de un embrión es adelgazada o perforada por métodos químicos, mecánicos o con láser para ayudar en la eclosión del blastocisto.

Eclosión: proceso mediante el cual un embrión en el estado de blastocisto se separa de la zona pelúcida.

Edad gestacional: edad de un embrión o feto calculada al sumar dos semanas (14 días) al número de semanas completadas después de la fecundación. Nota: para transferencia de embriones criopreservados/ descongelados, la fecha estimada de fecundación es calculada restando la edad del embrión en el momento de la criopreservación a la fecha de la transferencia de embriones criopreservados y descongelados.

Embarazo bioquímico (aborto espontáneo preclínico): embarazo diagnosticado sólo por la detección de HCG en suero u orina y que no se desarrolla en embarazo clínico.

Embarazo clínico con latido cardíaco fetal: embarazo diagnosticado con ecografía o por documentación clínica de al menos un feto con latido cardíaco. Esto incluye embarazo ectópico.

Embarazo clínico: embarazo diagnosticado por visualización ecográfica de uno o más sacos gestacionales o signos clínicos definitivos de embarazo. Esto incluye embarazo ectópico. Nota: múltiples sacos gestacionales son contados como un solo embarazo clínico.

Embarazo ectópico: un embarazo en el cual la implantación tiene lugar fuera de la cavidad uterina.

Embrio/feto reducción: procedimiento para reducir el número de embriones o fetos viables en un embarazo múltiple.

Embrión: producto de la división del cigoto hasta el fin del estadio embrionario (8 semanas después de la fecundación). (Esta definición no incluye partenotes –generados a través de partenogénesis– ni productos de la transferencia de núcleos de células somáticas.)

Estimulación ovárica controlada (EOC) para ciclos no de TRA: tratamiento farmacológico en el cual las mujeres son estimuladas para inducir el desarrollo de más de un ovocito.

Estimulación ovárica controlada (EOC) para TRA: tratamiento farmacológico en el cual las mujeres son estimuladas para inducir el desarrollo de múltiples folículos ováricos para obtener múltiples ovocitos en la aspiración folicular.

Estimulación ovárica suave para FIV: procedimiento mediante el cual los ovarios son estimulados con gonadotropinas y/o otros compuestos con la intención de limitar el número de ovocitos obtenidos para FIV a menos de siete.

Fecundación in vitro (FIV): Técnica de Reproducción Asistida (TRA) que involucra fecundación extracorpórea.

Fecundación: penetración de un ovocito por un espermatozoide y la combinación de SUS materiales genéticos, lo que resulta en la formación de un cigoto.

Feto: producto de la fecundación desde el fin del desarrollo embrionario, a las 8 semanas después de la fecundación, hasta el aborto o el nacimiento.

Gestación/ Nacimiento múltiple: embarazo/parto con más de un feto/bebé.

Gestante subrogada: mujer que lleva adelante un embarazo habiendo acordado que Ella entregará el bebé a los padres previstos. Los gametos pueden originarse de los padres previstos y/o de terceros.

Implantación: La unión y subsecuente penetración del blastocisto libre de zona pelúcida usualmente en el endometrio, que comienza 5 a 7 días después de la fecundación.

Inducción de ovulación (IO): tratamiento farmacológico de mujeres con anovulación u oligo-ovulación con la intención de inducir ciclos ovulatorios normales.

Infertilidad: enfermedad del sistema reproductivo definida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales no protegidas.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, por sus siglas en inglés): procedimiento mediante el cual un solo espermatozoide es inyectado en el citoplasma de un ovocito.

MESA (por sus siglas en inglés): aspiración microquirúrgica de espermatozoides epididimarios.

MESE (por sus siglas en inglés): extracción microquirúrgica de espermatozoides epididimarios.

Micromanipulación: tecnología que permite efectuar procedimientos microquirúrgicos en espermatozoides, ovocitos, cigotos o embriones.

MicroTESE (por sus siglas en inglés): extracción microquirúrgica de espermatozoides testiculares.

Mortalidad perinatal: muerte fetal o neonatal que ocurre durante el embarazo tardío (a las 20 semanas completas de edad gestacional o más tarde), durante el nacimiento, o hasta completados los siete días después del nacimiento.

Muerte fetal (mortinato): muerte que ocurre antes de la completa expulsión o extracción del producto de una fecundación, a partir de la semana 20 de edad gestacional. La muerte es determinada por el hecho de que el feto no respire ni muestre otra evidencia de vida, tal como latido fetal, pulsación del cordón umbilical, o movimiento definido de los músculos voluntarios.

Muerte neonatal temprana: muerte de un nacido vivo dentro de los primeros 7 días del nacimiento.

Muerte neonatal: muerte de un recién nacido vivo dentro de los 28 días del nacimiento.

Múltiples de alto orden: embarazo o parto con tres o más fetos o neonatos.

Muy bajo peso al nacer: peso menor a 1.500 g.

Nacimiento a término completo: nacimiento de un recién nacido vivo o mortinato que tiene lugar entre las 37 y 42 semanas de edad gestacional.

Nacimiento postérmino: nacimiento vivo o muerto que tiene lugar después de completadas las 42 semanas de edad gestacional.

Nacimiento prematuro extremo: parto de un nacido vivo o muerto que tiene lugar después de la semana 20 y antes de las 32 semanas completas de edad gestacional.

Nacimiento pretérmino (extremo): un nacimiento vivo o mortinato que sucede después de la semana 20 y antes de la semana 28 de edad gestacional.

Nacimiento pretérmino: nacimiento que tiene lugar después de 20 semanas y antes de completadas las 37 semanas de edad gestacional.

Nacimiento vivo: expulsión completa del cuerpo de su madre del producto de la fecundación, independientemente de la duración del embarazo, si después de la separación respira o muestra cualquier otra evidencia de vida, tales como latido del corazón, pulsación del cordón umbilical, movimiento definido de músculos voluntarios, independientemente de si el cordón umbilical ha sido cortado o si la placenta está unida.

Parto: la expulsión o extracción de uno o más fetos de la madre después de completadas 20 semanas de edad gestacional.

Pequeño para edad gestacional: peso al nacer menor a dos desviaciones estándares de la media o menor que el décimo percentil de acuerdo a los gráficos locales de crecimiento intrauterino.

Período neonatal: intervalo de tiempo que comienza con el nacimiento y termina con 28 días completados después del nacimiento.

PESA (por sus siglas en inglés): aspiración percutánea de espermatozoides epididimarios.

Peso bajo al nacer (extremo): peso al nacer inferior a 1.000 g.

Reproducción médicamente asistida (RMA): reproducción lograda a través de la inducción de ovulación, estimulación ovárica controlada, desencadenamiento de la ovulación, técnicas de reproducción asistida (TRA), inseminación intrauterina, intracervical o intravaginal, con semen del esposo/pareja o un donante.

Saco gestacional: estructura que contiene líquido asociada con un embarazo temprano, la cual puede estar localizada dentro o fuera del útero (en caso de un embarazo ectópico).

Saco(s) o embrión (es) evanescente(s): Documentación ecográfica de la desaparición espontánea de uno o más sacos gestacionales o embriones de un embarazo en marcha.

Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) severo: el SHO es severo cuando se tiene que indicar hospitalización (Ver definición de "Síndrome de hiperestimulación ovárica").

Síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO): respuesta sistémica exagerada a la estimulación ovárica caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de laboratorio. Se clasifica en suave, moderado o severo de acuerdo al grado de distensión abdominal, agrandamiento de los ovarios y complicaciones respiratorias, hemodinámicas y metabólicas.

Tamizaje genético preimplantation (PGS, por sus siglas en inglés): análisis de cuerpos polares, blastómeros o trofoectodermo de ovocitos, cigotos o embriones

para la detección de aneuploidías, mutaciones y/o rearrreglos del ADN.

Tasa acumulativa de partos con al menos un bebé nacido vivo: el número estimado de partos con al menos un bebé nacido vivo resultado de un ciclo de TRA iniciado o aspirado, incluyendo el ciclo en el cual se transfirieron embriones en fresco y los subsecuentes ciclos en los cuales se transfirieron embriones criopreservados y descongelados. Esta tasa es usada cuando se ha transferido menos del total de embriones en fresco y embriones criopreservados y descongelados de un solo ciclo de TRA. Nota: el nacimiento de un bebé único, o múltiples es registrado como un solo parto.¹

Tasa de embarazo clínico: el número de embarazos clínicos expresados por 100 ciclos iniciados, ciclos de aspiración o ciclos de transferencia de embriones. Nota: cuando se expresen las tasas de embarazo clínico, el denominador (iniciados, aspirados o transferencias) debe ser especificado.

Tasa de implantación: número de sacos gestacionales observados, dividido por el número de embriones transferidos.

Tasa de nacimientos vivos: número de nacimientos que hayan resultado en al menos un nacido vivo expresado por 100 ciclos iniciados, ciclos de aspiración, o ciclos de transferencia de embriones. Cuando se exprese la tasa de nacidos vivos el denominador (ciclos iniciados, aspirados o de transferencias) debe especificarse.

Tasa de parto después de TRA por paciente: número de partos con al menos un nacido vivo por paciente después de un número especificado de tratamientos de TRA.

Tasa de partos: el número de partos expresados por cada 100 ciclos iniciados, ciclos de aspiración o ciclos de transferencia de embriones. Cuando la tasa de partos es expresada, el denominador (iniciados, aspirados o transferencias) debe ser especificado. Esto incluye partos que resultaron en el nacimiento de uno o más nacidos vivos y/o mortinatos. Nota: el parto de un solo bebé único o múltiple, es registrado como un solo parto.

Tasa total de nacimientos con al menos un nacido vivo: número total estimado de partos con al menos un recién nacido vivo como resultado de un ciclo de TRA iniciado o aspirado incluyendo todos los ciclos en fresco y los ciclos criopreservados y descongelados. Esta tasa es usada cuando todos los embriones –en fresco y los criopreservados/descongelados - de un ciclo de FIV han sido usados. Nota: El parto de un bebé único o múltiple, ES registrado como un solo parto.

Técnicas de Reproducción Asistida (TRA): todos los tratamientos o procedimientos que incluyen la manipulación tanto de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos para el establecimiento de un embarazo. Esto incluye, pero no está limitado sólo a, la fecundación in vitro y la transferencia de embriones, la transferencia intratubárica de gametos, la transferencia intratubárica de cigotos, la transferencia intratubárica de embriones, la criopreservación de ovocitos y embriones, la donación de ovocitos y embriones, y el útero surrogado. TRA no incluye inseminación asistida (inseminación artificial) usando espermatozoides ni de la pareja ni de un donante.

TESA (por sus siglas en inglés): aspiración de espermatozoides testiculares.

TESE (por sus siglas en inglés): extracción de espermatozoides testiculares.

Torsión ovárica: rotación parcial o completa del pedículo

lo vascular ovárico que causa obstrucción del flujo sanguíneo ovárico, y puede llevar a la necrosis de tejido ovárico.

Transferencia de embriones (TE): procedimiento mediante el cual uno o más embriones son colocados en el útero o en la trompa de Fallopio.

Transferencia selectiva de embriones: transferencia de uno o más embriones, seleccionados a partir de una cohorte más grande de embriones.

Transferencia intratubárica de gametos: un procedimiento de TRA en el cual ambos gametos (ovocitos y espermatozoides), son transferidos a la trompa de Fallopio.

Transferencia intratubárica de cigoto: procedimiento mediante el cual uno o mas cigotos son transferidos a la trompa de Fallopio.

Vitrificación: método ultrarrápido de criopreservación que previene la formación de hielo dentro de una suspensión que se solidifica de manera similar al vidrio.

Zigoto: célula diploide resultante de la fecundación de un ovocito por un espermatozoide, la cual subsecuentemente se divide para formar un embrión.

References

1. Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART). World collaborative report on in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000;2006(85):1586-622.
2. de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, et al.; International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology. World collaborative report on in-vitro fertilization, 2004. *Hum Reprod*. In press.
3. Dickey RP. The relative contribution of assisted reproductive technologies and ovulation induction to multiple births in the United States 5 years after the Society for Assisted Reproductive Technology/American Society for Reproductive Medicine recommendation to limit the number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2007;88:1554-61.
4. European IVF-Monitoring Consortium, European Society of Human Reproduction and Embryology. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756-71.
5. Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, Sullivan E. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies, The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) glossary on ART terminology. *Fertil Steril* 2006;86:16-9.
6. Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, Sullivan E. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod* 2006;21:1968-70.
7. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology. The ICMART glossary. Current practices and controversies in assisted reproduction. Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002:xix-xxi. 1524

Maturação *in vitro* de oócitos em ciclos não estimulados para pacientes portadoras de ovários policísticos

In vitro maturation of oocytes in unstimulated cycles for patients with polycystic ovaries

Nilo Frantz¹, Marcelo Ferreira¹, Gerta Frantz¹, Marcos Höher¹, Norma Oliveira¹, Talita Giacomet de Carvalho¹, Adriana Bos-Mikich²

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

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

RESUMO

Introdução: A maturação *in vitro* (IVM) de oócitos coletados em ciclos não estimulados é uma opção atraente aos tratamentos clássicos de reprodução assistida (RA) sendo um procedimento indicado especialmente para pacientes portadoras da síndrome dos ovários policísticos (SOP) ou somente de ovários policísticos (OP). **Objetivo:** O presente estudo descreve nossa experiência com 34 ciclos de IVM aplicados a pacientes portadoras de SOP ou OP. **Métodos:** Complexos cumulus-oócitos foram coletados de pacientes portadoras de OP (n=7) ou SOP (n=27), 36h pós-hCG, em ciclos não estimulados. Após um período de maturação de 28 a 30 horas, os oócitos que atingiram MII foram inseminados por ICSI. Os embriões foram transferidos às pacientes no terceiro dia de cultivo. **Resultados:** Nesta série obtivemos uma média de 16,3 oócitos coletados por ciclo e uma taxa de maturação e fertilização *in vitro* de 63% e de 62%, respectivamente. A taxa de gestações clínicas foi de 32% (11/34). **Conclusões:** A metodologia de IVM reúne uma série de vantagens, como a ausência da síndrome de hiperestimulação ovariana, baixos custos e a simplicidade no manejo do ciclo. Acreditamos ser a IVM uma alternativa válida de tratamento da infertilidade, para um grupo específico de pacientes.

Palavras-chave: Maturação *in vitro* de oócitos, ovários policísticos, gestação.

ABSTRACT

Introduction: The *in vitro* maturation (IVM) of oocytes collected in unstimulated cycles is an attractive alternative to classic assisted reproduction (AR) treatments. The procedure is particularly indicated for patient with polycystic ovaries (PCO) or polycystic ovaries syndrome (PCOS). **Objective:** The present study reports our experience with 34 cycles of IVM applied to PCO (n=7) or PCOS (n=27) patients. **Methods:** Cumulus-oocyte complexes were collected 36h post-hCG in unstimulated cycles. After *in vitro* maturation for 28 to 30 hours, oocytes that reached MII were inseminated by ICSI. Embryos were transferred on day-3. **Results:** In the present series of IVM cycles, we obtained an average of 16.3 oocytes collected per cycle, 63% and 62% of *in vitro* maturation and fertilization, respectively. We obtained a clinical pregnancy rate of 32% (11/34). **Conclusion:** The IVM methodology combines several advantages, such as the absence of hyperstimulation, low costs and easiness to monitor the cycle. We believe that IVM represents a valid choice of infertility treatment for a specific group of patients.

Key words: Oocyte *in vitro* maturation, polycystic ovaries, pregnancy

INTRODUÇÃO

Os custos financeiros associados às técnicas de reprodução assistida representam uma barreira efetiva ao tratamento para muitos pacientes, especialmente em países em desenvolvimento como o nosso. Por outro lado, o uso de hormônios gonadotróficos para estimulação ovariana acarreta na possibilidade das pacientes virem a desenvolver a síndrome da hiperestimulação ovariana (SHO) especialmente aquelas jovens e portadoras de ovários policísticos (Practice Committee of the ASRM, 2003).

A maturação *in vitro* de oócitos coletados a partir de ciclos não estimulados representa uma alternativa onde o uso de gonadotrofinas exógenas e a maturação final dos oócitos *in vivo* são substituídos por um período prolongado de cultivo *in vitro*, até atingirem o estágio de metáfase II, aptos à inseminação. Assim, as vantagens do emprego da maturação *in vitro* de oócitos é poder dispensar o uso de hormônios estimulantes do crescimento e maturação folicular e bloqueadores da hipófise, diminuindo os custos do tratamento, além da ausência total do risco da síndrome da hiperestimulação ovariana (Tounson, 1994).

Apesar de a IVM ser uma técnica usada preferencialmente em pacientes com ovários policísticos, mulheres com ciclos ovulatórios também podem se beneficiar dela por evitarem os efeitos colaterais das injeções hormonais, além de diminuir os custos do tratamento. Assim, em alguns centros, a IVM tem sido oferecida a casais inférteis por fator tubário, fator masculino ou infertilidade sem causa aparente (Mikkelsen et al., 1999). Cabe ressaltar que, em alguns países como Canadá (Al-Sunandi et al, 2007), Finlândia (Sönderström-Anttila, 2006) e França (Lê Du et al., 2005) esta metodologia já propiciou centenas de nascimentos e em nosso país relatamos a primeira gravidez e nascimento após um ciclo de IVM em uma paciente portadora da síndrome dos ovários policísticos (Frantz et al., 2008). O presente trabalho representa a descrição dos resultados alcançados após uma série de 34 casos de infertilidade por síndrome dos ovários policísticos ou ovários policísticos tratados pela tecnologia de IVM.

MÉTODOS

Todas pacientes que concordaram participar do programa de IVM assinaram consentimento livre e esclarecido fornecido rotineiramente aos casais que desejam submeter-se à tratamento de infertilidade. Foram analisados 34 ciclos de IVM entre janeiro de 2007 e dezembro de 2009. Para

inclusão das pacientes foram utilizados os critérios publicados pelo consenso de Rotterdam ESHRE/ASRM (2004). As mulheres participantes tinham idades entre 25 e 36 anos (média de 28,8 anos), portadoras de ovários policísticos ($n=7$) ou da síndrome dos ovários policísticos ($n=27$). As pacientes com amenorréia receberam acetato de medroxiprogesterona para induzir sangramento de privação. Todas as pacientes foram monitoradas por ultra-sonografia no dia 2 do ciclo para assegurar a ausência de cistos ovarianos. Outra avaliação por ultra-sonografia foi executada nos dias 7 ou 8 de maneira a excluir-se a presença de um folículo dominante. Os oócitos imaturos foram coletados entre o 10º e o 14º dia do ciclo, 36h após injeção de hCG (Ovidrel/Serono ou Choriomon/Meizler, 10.000UI). Para aspiração dos pequenos folículos, utilizou-se uma agulha de 17-Gauge sob pressão de sucção de 75 a 80 mmHg. Todas as punções foram guiadas por ultra-sonografia transvaginal com sonda multifrequencial de 5 a 9 MHz (Ultrasonix OP, Sonix).

Os oócitos imaturos foram isolados e incubados em placas contendo meio de maturação (Oocyte Maturation Medium, Sage, USA ou MediCult, Sweden), já acrescido de fonte protéica (no caso de Meio MediCult) ou foi acrescido de 10% de Substituto de Soro Sintético (SSS, Irvine) e suplementado com 75UI de FSH, 75UI de LH (Menopour, Ferring, Suécia) a 37°C, 5% CO₂ em atmosfera úmida por 28 a 32 horas. Após o período maturação, os oócitos foram desnudados por exposição à hialuronidase em meio HTF (Sage, USA) e avaliados para a verificação da ausência de vesícula germinativa e presença do primeiro corpúsculo polar. Os oócitos que atingiram o estágio de MII foram inseminados por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), três a quatro horas após a denudação. Os zigotos obtidos foram cultivados em meio Embryo Maintenance Medium (Sage) por 72 horas antes da transferência, quando a avaliação morfológica foi executada (Veeck, 1999) e os embriões com melhores índices foram transferidos para as pacientes.

Para o preparo do endométrio, as pacientes receberam valerato de estradiol via oral (6mg), a partir do dia da coleta dos oócitos. Todas as pacientes apresentaram endométrio de espessura igual ou superior a 7 mm, adequado à transferência no 3º dia pós-inseminação. As transferências foram realizadas com cateteres Wallace® ou Sydney Cook® guiadas por ultra-som. As pacientes seguiram com a administração de estradiol, associado ao uso de progesterona micronizada (600mg/dia) para suporte lúteo, a partir do dia da fertilização.

Gestações químicas foram constatadas entre o 11º e 13º dia pós-transferência, a partir de um teste de hCG positivo, no entanto, sem a ocorrência de saco gestacional na ultra-sonografia. As gestações clínicas foram constatadas por ultra-sonografia transvaginal 4 semanas após o hCG positivo, com a presença de saco gestacional.

RESULTADOS

Nesta série de 34 ciclos de IVM foram coletados 556 oócitos, 16,3 em média por ciclo (Tabela I). Do total de oócitos coletados, 63% (350/556) atingiram o estágio de MII. Destes oócitos foram gerados 218 zigotos perfazendo um índice de fertilização de 62%. Deste total de zigotos, 95% (208/218) clivaram ao estágio de 2 células. Todas as pacientes obtiveram embriões para transferência. Foi transferido um total de 112 embriões no dia 3 de desenvolvimento embrionário, sendo a média de 3,3 embriões por ciclo. A maioria dos embriões foi classificada como G3 (61%) ou G4 (11%), principalmente devido a atrasos no desenvolvimento, o que contribuiu para sua classificação inferior. Dentre os embriões de boa qualidade, 6% foram classificados como grau 1 e 22%, como grau 2. Obtivemos um total de 11 gestações

clínicas (32%), das quais cinco múltiplas. Dentre as gestações múltiplas, quatro foram gemelares sendo que duas pacientes tiveram 2 embriões implantados inicialmente, porém somente um embrião permaneceu vivo e uma de quádruplos. Desta forma, o índice total de gestações múltiplas foi de 45% (5/11) e o índice de implantação de 16% (18/112).

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a coleta, maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos obtidos a partir de ciclos não estimulados é um procedimento factível para o tratamento de infertilidade em pacientes com ovários policísticos ou com a síndrome dos ovários policísticos. Na presente série de pacientes, obtivemos 11 gestações e um índice de implantação próximo ao alcançado em ciclos clássicos estimulados de IVF/ICSI.

Desde o trabalho pioneiro de Cha e colegas em 1991, diversos estudos em diferentes centros de reprodução humana descreveram o uso da maturação *in vitro* de oócitos coletados em ciclos não estimulados com resultados bastante variáveis em termos de gestação e implantações (Troupson et al, 1994; Tan & Child, 2002; Cha et al., 2000, 2005; Chian et al., 2000; Child et al., 2001; Mikkelsen & Lindenberg, 2001; Lê Du et al, 2005; Al-Sunadi et al., 2007; Ge et al., 2007; Zhao et al, 2009).

A média de aproximadamente 16,3 oócitos coletados por pacientes neste estudo está entre as médias apresentadas em trabalhos anteriores (entre 10 e 20/ciclo) (Troupson et al, 1994; Cha et al., 2000; Child et al., 2001; Cha et al., 2005; Lin et al., 2003; Lê Du et al., 2005; Al-Sunadi et al., 2006; Ge et al., 2008; Zhao et al, 2009). A coleta de oócitos imaturos, provenientes de folículos pequenos exige maior experiência do clínico que a realiza, tem uma duração cerca de três vezes maior do que a punção convencional de folículos, o que demanda um período mais prolongado de anestesia (Child et al., 2001). Nossa "curva de aprendizagem", durante a realização dos primeiros casos desta série de 34 ciclos de IVM, exemplifica claramente a importância da aquisição de experiência por parte do clínico para o sucesso do procedimento, visto que o número médio de oócitos obtidos por paciente foi crescente ao longo da realização dos casos. Em nossos ciclos iniciais, realizávamos a coleta com outra agulha, especialmente desenvolvida para a IVM, entretanto, nesta série de casos, usamos a mesma agulha da FIV convencional e concluímos ser esta última mais adequada para este procedimento. Sessenta e três por cento dos oócitos coletados imaturos atingiram o estágio de metáfase II após cultura indicando capacidade de maturação nuclear *in vitro* comparável a resultados publicados por outros grupos internacionais (Lê Du et al., 2005; Vlaisavljević et al., 2006; Ge et al., 2008; Zhao et al, 2009). O presente estudo utilizou hCG, 36h antes da coleta dos oócitos. Embora este uso seja controverso baseamos nosso protocolo em estudos (Chian et al, 2000; Son et al, 2002; Lê Du et al, 2005; Son et al, 2007) que demonstram taxas mais elevadas de desenvolvimento embrionário e gestações, a partir do uso de hCG (10.000 IU) antes da coleta dos gametas imaturos.

Dentre os zigotos obtidos no presente estudo, a taxa de clivagem ao segundo dia foi bastante satisfatória. O percentual total de embriões GI e GII transferidos foi de 28%, o que é uma taxa aceitável, entretanto, a qualidade dos embriões no terceiro dia foi, em geral, inferior àquela observada em ciclos estimulados. A grande maioria dos embriões (GIII e GIV) transferidos apresentou atraso no desenvolvimento, diferentes graus de fragmentação e blastômeros não homogêneos.

Se analisarmos a taxa de gestação clínica por oócito matu-

rado *in vitro* (3%) observa-se que ela é bastante semelhante e até superior aquela relatada em outros trabalhos de IVM da literatura internacional (Son et al., 2008; Zhao et al., 2009). Por outro lado, se compararmos este índice com os resultados obtidos em ciclos convencionais, em nossa clínica (5 %) e em outros centros mundiais (1.5 -5%; por ex., Ravhon et al., 2001; Prospt et al., 2006) para ciclos estimulados ficam claros os avanços consideráveis alcançados pela IVM como metodologia válida para o tratamento de infertilidade em pacientes portadoras de SOP ou OP.

Com exceção de um trabalho realizado em um país escandinavo (Sönderström-Anttila et al., 2005), onde a transferência de mais de dois embriões não é autorizada por lei, a maioria dos estudos relata a transferência de um número elevado de embriões (até 6 embriões: Cha et al., 2005; Al-Sunaidi et al., 2007; Ge et al., 2008). Também deve ser lembrado que a falta de sincronia inerente do procedimento, entre os processos de maturação citoplasmática e nuclear (Tounson, 2001; Combelles et al., 2002) pode estar influenciando as taxas de implantação e gestações levadas a termo.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a IVM é uma tecnologia promissora para o tratamento da infertilidade em um grupo específico de pacientes. Esta metodologia fornece uma alternativa de baixo risco e de menor custo, sendo os resultados obtidos comparáveis àqueles alcançados em ciclos estimulados, dentro dos padrões internacionais.

Tabela I- Resultados de 34 ciclos de IVM.

Variável	IVM
Idade (média ±DP)	28,88±4,67
No. oócitos imaturos coletados (média por ciclo)	556 (16,3)
No. oócitos em MII (taxa de maturação%)	350 (63)
No. oócitos fertilizados (%)	218 (62)
No. embriões clivados Dia-2(%)	208 (95)
No. embriões transferidos (média por transferência)	112 (3,3)
Taxa de gestações químicas (hCG) por transferência (%)	14/34 (41)
Taxa de gestações clínicas por transferência (%)	11/34 (32)
Taxa de gestações clínicas por oócito coletado (%)	11/ 556 (2)
Taxa de gestações clínicas por oócito maturado (%)	11/350 (3)
Taxa de gestações por embrião transferido (%)	11/112 (9.8)
Gestações múltiplas (%)	5/11 (45)
Aborto (%)	1/11 (9)
Taxa de Implantação (%)	18/112 (16)

Correspondência:

Adriana Bos-Mikich
Departamento de Ciências Morfológicas
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Sarmento Leite 500
Porto Alegre, RS
CEP: 90.050-170
adriana.bosmikich@gmail.com

Referências

Al-Sunaidi M, Tulandi T, Holzer H, Sylvestre C, Chian R-C, Tan SL Repeated pregnancies and live births after in vitro maturation treatment Fertil Steril. 2007; 87: 1212-eg1212.
Cha K, Koo JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril. 1991; 55: 109-113.

Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al., Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2000;73: 978-983.

Cha KY, Chung HM., Lee DR, Kwon H, Chung MK, Park LS, Choi DH, Yoon TK Obstetric outcome of patients with polycystic ovary syndrome treated by in vitro maturation and in vitro fertilization-embryo transfer Fertil Steril. 2005; 83: 1461-1465.

Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. Hum Reprod. 2000; 15: 165-170.

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

Combelles CM, N.A. Cekleniak, Racowsky C, Albertini DF. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. Hum Reprod. 2002; 17: 1006-1016.

Frantz N, Bos-Mikich A, Frantz GN, Höher M, Ferreira M. Maturação in vitro de oócitos obtidos de pacientes com a síndrome dos ovários policísticos sem estimulação ovariana: resultados iniciais. JBRA. 2007; 3: 39-42.

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

Le Du A, Kadoch I.J, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier M-C, Chevalier N., Et al., In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience Hum Reprod.. 2005; 20: 420-424.

Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. Hum Reprod. 1999; 14: 1847-1851.

Mikkelsen A, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. Reproduction 2001; 122: 587-592

Practice Committee of ASRM – The practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertil Steril. 2003; 80: 1309-1314.

Propst A, Bates GW, Robinson RD, Arthur NJ, Martin JE, Neal GS. A randomized controlled trial of increasing recombinant-follicle stimulating hormone afterinitiated a gonadotropin-releasing hormone antagonist for in vitro fertilization –embryo transfer. Fertil Steril 2006; 86: 58-63.

Ravhon A, Lavery S, Aurell R, Trew G, Margara R, Winston R. Clinical experience with recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) and urinary FSH: a retrospective case-controlled analysis. Fertil Steril 2001; 75: 920-925.

Rotterdam ESHRE/ASRM -2004 Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus ondiagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2004; 81: 19-25.

Son W-Y, Yoon S-H, Lee S-W, Ko Y, Yoon H-G, Lim J-H, Blastocyst development and pregnancies after IVF of mature oocytes retrieved from unstimulated patients with PCOS after in-vivo HCG priming: Case report . Hum Reprod. 2002; 17: 134-136.

Son W-Y, Lee S-Y, Yoon S-H, Lim J-H Pregnancies and deliveries after transfer of human blastocysts derived from in vitro matured oocytes in in vitro maturation cycles Fertil Steril. 2007: 87: 1491-1493.

Sönderström-Anttila V, Mäkinen S, Tuuri T, Suikkari AM Favorable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. Hum Reprod. 2005; 20: 1534-1540.

Tan SL, Child TJ. In vitro maturation of oocytes from unstimulated polycystic ovaries. Reprod Biomed Online. 2002; 4:18-23.

Tounson, A., Wood, C. and Kausche, A. (1994) In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil. Steril. 1994; 62: 353-362.

Tounson, A, Anderiesz, C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001; 121: 51-75.

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

Vlaisavljević V, Čížek-Sajko M, Vilma Kovac V. Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes. Fertil Steril. 2006; 86: 487-489.

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

Embryo transfer based on previous uterine length measurement enhances ICSI outcomes when compared to standard ultrasonographic-guided embryo transfer.

A transferência de embriões baseada na medida prévia do comprimento uterino melhora o prognóstico da ICSI quando comparada à transferência padrão guiada por ultra-sonografia

Luiz Guilherme Louzada Maldonado, M.D.¹, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, DVM, M.Sc.^{1,2}, Sérgio Aron Azjen, MD, PhD³, Rita Cássia Sávio Figueira, M.Sc.¹, Assumpto Iaconelli Jr, M.D.¹, Edson Borges Jr. M.D., PhD^{1,2,3}

DEPARTMENT AFFILIATIONS

¹Fertility – Assisted Fertilization Center

Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545.

São Paulo – SP, Brazil. Zip: 01401-002

²Sapientiae Institute – Educational and Research Center in Assisted Reproduction

Rua Vieira Maciel, 62.

São Paulo – SP, Brazil. Zip: 04503-040

³Department of Imaging Diagnosis, São Paulo Federal University.

Rua Napoleão de Barros, 421

São Paulo – SP, Brazil. Zip: 04503-040

ABSTRACT

OBJECTIVE: To test the hypothesis that embryo transfer based on previous uterine length measurement is a better method to improve pregnancy rates when compared to the standard ultrasonographic-guided embryo transfer method.

METHODS: Patients undergoing Controlled Ovarian Stimulation (COS) for Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles were allocated into two groups based on embryo transfer method used. Cycles in which embryo transfer was performed based on previous uterine length measurement (ULM group, n=50) and cycles in which embryo transfer was performed through standard ultrasonographic-guidance (Control group, n=150). The easiness of transfer, implantation and pregnancy rates were compared among the groups using the *Student's t* test and *Chi-squared* or *Fisher exact* tests as appropriate.

RESULTS: Similar results were found between groups regarding the easiness of transfer. Both implantation (11.9% vs 30.7% for Control and ULM groups respectively, $p < 0,001$) and pregnancy rates (26.0% vs 54.0% for Control and ULM groups respectively, $p < 0,001$) were significantly higher in the ULM group.

CONCLUSION: Ultrasound guided embryo transfer based on previous uterine length measurement is useful to increase the pregnancy and implantation rates in patients submitted to COS and ICSI cycles.

KEY-WORDS: Assisted Reproduction, Embryo Transfer, Ultrasonography, Implantation, Endometrium

RESUMO

OBJETIVO: Testar a hipótese de que a transferência de embriões guiada por ultra-sonografia e baseada na

avaliação prévia do comprimento uterino é melhor para os índices de gravidez quando comparada ao método ultra-sonográfico tradicional.

MÉTODOS: Pacientes sob estimulação ovariana controlada (COS) para ICSI foram alocadas em 2 grupos, baseados no método de transferência utilizado. Os grupos incluíram ciclos nos quais a transferência se baseou na avaliação prévia do comprimento uterino. (ULM, n=50) e ciclos nos quais a transferência se deu através do método usual com guia ultra-sonográfica (Grupo controle, n=150). Foram comparadas a facilidade da transferência, a implantação e as taxas de gravidez entre os grupos, através do teste t de Student e do qui-quadrado.

RESULTADOS: Os achados foram similares quanto à facilidade da transferência. Tanto a implantação (11.9% vs 30.7% para o grupo controle e ULM, respectivamente, $p < 0,001$) quanto as taxas de gravidez (26.0% vs 54.0% para os controles e ULM, $p < 0,001$) foram significativamente maiores no grupo de mensuração prévia.

CONCLUSÃO: a transferência de embriões guiada por ultra-sonografia, baseada na avaliação prévia do comprimento uterino é útil para aumentar os índices de gravidez e implantação em pacientes submetidas a estimulação controlada para ICSI.

KEY-WORDS: Assisted Reproduction, Embryo Transfer, Ultrasonography, Implantation, Endometrium

INTRODUCTION

Since the first successful childbirth resulting from *in vitro* fertilization (IVF) (Steptoe and Edwards 1978), remarkable improvements were achieved on the treatment of infertile couples through IVF. Throughout the years, the optimization of the several factors known to influence the

IVF success rate has been attempted in order to increase pregnancy rate. Embryo transfer (ET) is the last step on the IVF process, and despite major advances achieved on ovarian stimulation protocols, *in vitro* embryo development and embryo selection, few modifications have been made on the ET technique.

Despite high-quality embryos may be available for transfer, only a small proportion of patients undergoing IVF will ever achieve a pregnancy. In fact, previous studies indicate that up to 80% of the embryos that reaches the uterine cavity fails to implant (Edwards 1995). This may be attributed to multiple factors including embryo implantation potential, endometrial receptivity and the embryo transfer technique itself (Mansour and Aboulghar 2002).

Embryo transfer was originally performed by advancing the transfer catheter until contact with the uterine fundus, then withdrawing the catheter 5–10 mm and expelling the embryos into the uterine cavity. Previous study using ultrasound, however, showed that, during this 'blind' technique, the operator is frequently unaware that the catheter is poorly positioned (Strickler et al. 1985). Therefore, transabdominal ultrasound (Leong et al. 1986) and, more recently, vaginal ultrasound guidance (Anderson et al. 2002) have added more consistency to the procedure. The ultrasound guidance during the embryo transfer allows visual monitoring of the process, while navigating embryo placement within the uterine cavity with high precision (Allahbadia et al. 2008).

Besides the ultrasound guidance, Coroleu et al. (2002a) suggested that depth of the embryo insertion into the uterine cavity may influence implantation rates after IVF. For that, the length of the uterine cavity is measured by transvaginal ultrasonography before embryo transfer and based on this measurement, in the moment of transfer, the tip of the catheter is placed 1.5–2 cm below the fundus. Our goal for this study was to test the hypothesis that embryo transfers based on previous uterine length measurement would improve pregnancy rates in IVF programs when compared to the standard ultrasonographic-guided embryo transfer method.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

This study included 200 patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles for the first time, in a private assisted fertilization center, during January 2007 to December 2007. The study was approved by the local Institutional Review Board and an written informed consent was obtained, in which patients agreed to share the outcomes of their cycles for research purposes.

Cycles were divided into two groups based on embryo transfer method used. Each cycle in which the embryo transfer was based on previous uterine length measurement (ULM group, n=50) was age-matched with three cycles in which embryo transfer was performed through standard ultrasonographic-guidance (Control group, n=150).

The easiness of transfer (easy or difficult), presence of blood in the catheter, implantation rate and pregnancy rate were compared among groups.

Implantation rate was defined as the total number of gestational sacs with fetal heart activity divided by the total number of embryos transferred. Clinical pregnancy was defined as the presence of a gestational sac with fetal heart activity visualized by ultrasound.

Controlled ovarian stimulation

Controlled ovarian stimulation was achieved by long pituitary down regulation using a gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH, Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, France) followed by

ovarian stimulation with recombinant-FSH (Gonal-F®, Serono, Geneva, Switzerland). The follicular dynamic was followed by ultrasound (Echo Camera SSd-500, Aloka®, Tokio, Japan), starting on day 4 of gonadotropin administration. When adequate follicular growth and serum estradiol levels were observed, recombinant human chorionic gonadotrophin (r-hCG, Ovidrel™, Serono, Geneva, Switzerland) was administered to trigger final follicular maturation. Oocytes were collected 35 hours after hCG administration by transvaginal ultrasound ovum pick-up.

Preparation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection

After retrieval, oocytes were incubated in culture medium (G-MOPS™-V1, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) covered with mineral oil (Ovoil™, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) at 37°C and 6% CO₂ for 3 hours. Cumulus cells were removed with a 30 s exposure to Hepes-buffered medium containing 80 IU/mL hyaluronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, USA), after which coronal cells were manually removed using a finely drawn glass Pasteur pipette (Humagen Fertility Diagnostics, Charlottesville, Virginia, USA). Sperm injection was carried out on the heated stage (37°C) of an inverted microscope (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan) 40 hours after hCG trigger for MII stage retrieved oocytes or after 24 hours in culture for immature retrieved oocytes that had undergone nuclear maturation.

Assessment of fertilization and embryo quality

Fertilization was assessed 18 hours after ICSI, and normal fertilization was declared when two clearly distinct pronuclei were present. Embryo quality was evaluated under an inverted microscope (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan). The following parameters were recorded: (i) the number of blastomeres, (ii) the fragmentation percentage, (iii) variation in blastomere symmetry, (iv) the presence of multinucleation and (v) defects in the zona pellucida and the cytoplasm. High-quality embryos were defined as those having all of the following characteristics: either 4 to 6 cells on the second day or 8 to 10 cells on the third day of development, less than 15% fragmentation, symmetric blastomeres, absence of multinucleation, colorless cytoplasm with moderate granulation with no inclusions, absence of perivitelline space granularity and absence of zona pellucida dysmorphism.

Embryo Transfer

Two to three days after oocyte recovery, from one to three high-quality embryos per patient were transferred depending on patient's age. When no high-quality embryos were available for transfer, patient was excluded from the study.

For embryo transfer, patients with full bladder were placed in the lithotomy position and the cervix was exposed using a bivalve speculum. The mucus in the cervical canal was removed with a cotton swab and the exocervix was cleaned with a phosphate-buffered saline (PBS) solution (Dulbecco's PBS solution; Irvine Scientific, Santa Anna, California, USA). For patients in ULM group, during controlled ovarian stimulation, the distance from the external cervical os to the fundal endometrial surface was measured by transvaginal ultrasonography and this length was used for embryo replacement with the tip of the catheter achieving the half of the endometrial lumen (Figure 1).

For patients in Control group, during embryo transfer, abdominal ultrasound was performed to visualize the full length of the endometrium, the cervix and the uterine fundus. Under visualization, the tip of the catheter

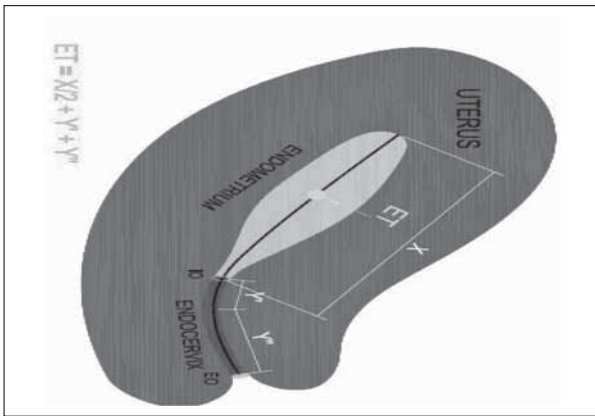


Figure 1: Schematic view of the embryo transfer site for patients in ULM groups

was positioned aiming to place the expelled embryo in the middle of the cavity length (Sallam 2005), according to the clinicians and sonographers' judgment. For ULM group the embryos' replacement was based on the previous uterus length measurement.

For all patients, a soft embryo transfer catheter (Wallace®, Smiths Medical International, Hythe, UK) was used. During the catheter insertion phase, the outer catheter did not touch the vaginal walls to avoid transferring any infection inside the uterus. As the outer sheath of the catheter was inserted into the cervix, a nurse encouraged the patient to notify the clinician upon feeling the catheter or period like pain. If that occurred, even by a slight amount, sheath insertion was postponed until the discomfort subsided.

When the clinician was satisfied that the outer catheter was in the correct position, the embryologist loaded the embryos and brought the inner catheter into the transfer room. The clinician inserted the inner catheter into the outer catheter and the embryos were gently expelled.

The catheter was carefully removed immediately after transfer and then checked under a stereomicroscope to ensure that all embryos had been transferred. At the end of the procedure, patients remained resting in bed for 30 min. All embryo transfer procedures were performed by the same person.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) for numeric variables and proportions (%) for categorical variables. Mean values were compared by *Student's t* test, and proportions were compared by the Chi-squared or Fisher exact test, where appropriate.

Power of test analysis was performed using the program Analyst of the software SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

Power of test analysis performed on implantation rates revealed a value of 0.88 based on a two-sided test. The causes of infertility were equally distributed among the groups (Table 1). No differences were found between groups on female age; number of aspirated follicles, number of MII retrieved oocytes, number of transferred embryos and endometrium thickness (Table 2).

The embryo transfers were classified as easy or difficult and the groups were equal regarding the presence of blood on the catheter (4.7% vs 4.3% for Control and ULM groups respectively, $p = 1.000$). and easiness of transfer (95.3% vs 96.0% for Control and ULM groups respectively, $p = 1.000$). The transfer was considered difficult when

the assistance of a more rigid catheter was required to successfully accomplish the embryo transfer.

Both the implantation (11.9% vs 30.7% for Control and ULM groups respectively, $p < 0.001$) and the pregnancy rates (25.3% vs 54.0% for Control and ULM groups respectively, $p < 0.001$) were significantly higher in the ULM group.

The total number of gestational sacs visualized by ultrasound, and the total number of embryos transferred for Control and ULM groups were respectively 43 vs. 37 and 361 vs. 120.

The incidence of multiple pregnancies were 3 twins and 1 triplets for control group and 10 twins and no triplets for ULM group.

TABLE 1 - Causes of infertility of the infertility in cycles in which the transfer were ultrasonographic-guided (CONTROL) or based on previous uterine length measurement.

Groups	CONTROL group	ULM group	P
N	150	50	
Male factor	14.6%(22/150)	10.0%(5/50)	0.403
Ovarian disorders	12%(18/150)	8.0%(4/50)	0.434
Endometriosis	6.0%(9/150)	4.0%(2/50)	0.591
Tubal- uterine factor	6.6%(10/150)	6.0%(3/50)	0.868
Polycystic ovarian syndrome	4.0%(6/150)	4.0%(2/50)	1.000
Idiopathic causes	44.6%(67/150)	48.0%(24/50)	0.682
Combined causes	12.0%(18/150)	16.0%(10/50)	0.158

TABLE 2 - General characteristics and outcomes of the cycles in which the transfer were ultrasonographic-guided (CONTROL) or based on previous uterine length measurement.

Groups	CONTROL group	ULM group	P
N	150	50	
Female age	35.1 \pm 4.66	35.0 \pm 4.09	0.879
Retrieved oocytes	11.8 \pm 8.9	10.9 \pm 8.3	0.292
MI retrieved oocytes	8.44 \pm 6.60	9.12 \pm 7.32	0.274
Embryos transferred	2.57 \pm 0.93	2.50 \pm 0.84	0.425
Endometrium thickness	12.0 \pm 2.27	12.4 \pm 1.95	0.131
Easiness of transfer	95.3%	96.0%	1.000
Implantation Rate	11.9%	30.7%	< 0,001
Pregnancy Rate	26.0%	54.0%	< 0,001

DISCUSSION

Embryo transfer is a crucial tool on assisted reproduction treatment. Here, we tested the hypothesis that embryo transfers based on previous uterine length measurement would increase ICSI outcomes when compared to the standard ultrasonographic-guided embryo transfer method. Results of the present study indicate that the embryo transfer based on previous uterine length measurement do not result on an easier transfer; however increased pregnancy and implantation rates can be achieved using this technique.

Clinical perception of the embryo transfer difficulty is a commonly used marker for the optimum performance of embryo transfer. However, although previous studies indicate that a traumatic embryo transfer technique may result in damage to the endometrium (Cevrioglu et al. 2006), the impact of easiness or difficulty of embryo transfer on subsequent pregnancy rates is controversial. While, decreased pregnancy rates has been reported with difficult embryo transfer (Englert et al. 1986; Mansour et al. 1990), such significant detrimental effect has not been

noted by others (Tur-Kaspa et al. 1998; De Placido et al. 2002; Silberstein et al. 2004).

In the present study, although embryo transfers based on previous uterine length measurement did not affect the difficulty of embryo transfer, a significant impact on the clinical outcomes could be observed. In fact, in our trial, difficult embryo transfers were observed in less than five percent of the cases, independently on the embryo transfer method. Therefore it would be surprising to find any improvement with the embryo transfers based on previous uterine length measurement.

The increased pregnancy and implantation rates observed in our study, when embryo transfers based on previous uterine length measurement were performed instead of standard ultrasonographic-guided embryo transfer, raise the questions on whether the ultrasonographic guidance may avoid injury to the endometrium.

Some potential advantages of the ultrasonographic guidance have been reported. The placement of soft catheters and the positioning of the tip is facilitated (Allahbadia et al., 2008). Some authors argue that the real benefit of ultrasound guidance lies in the ability to increase the clinical appreciation of the pelvic anatomy during transfer (Abou-Setta 2007).

In fact, previous studies indicate that ultrasonographic-guided embryo transfers are easier if compared to the clinical manipulation alone, however the superiority of this technique is still under debate. While some studies show an improvement on IVF outcomes (Coroleu et al. 2000; Matorras et al. 2002; Li et al. 2005), others demonstrate a lack of differences (Coroleu et al. 2002b; Garcia-Velasco et al. 2002; Isaza et al. 2002; Flisser et al. 2006; Kosmas et al. 2007).

Even though ultrasonography may confirm the position of the catheter within the uterus, it may not ease the entry into the uterine cavity when negotiating a tortuous endocervical canal, retroverted uterus and obese patients, when the transduction visualization is difficult. The speculum may also interfere with visualizing the initial catheter placement by scattering or interfering with the acoustic signal. Visualizing the entire catheter track may not always be possible; aligning the canal and endometrial stripe within the narrow acoustic window of the transducer may be technically difficult if the route traversed by the catheter falls wide of this path (Flisser et al., 2006). Moreover, a recent meta analysis conducted to determine whether ultrasound-guided embryo transfer improved clinical pregnancy rates and live birth rates in assisted conception did not demonstrate a difference (Drakeley et al. 2008).

Conversely, in another meta-analysis, it was concluded that the use of transabdominal ultrasound to guide catheter placement during embryo transfer may be beneficial and should become routine for all patients (Abou-Setta et al. 2007). Instead, in our trial we demonstrated that embryo transfer based on previous uterine length measurement could potentially improve implantation rate, avoiding the ultrasound guidance available during the embryo transfer.

Nevertheless, some catheters have an additional feature, due to an echodense tip or echogenicity extending along the catheter. It was hypothesized that these echogenic catheters could minimize disruption of the endometrium with improvement in implantation rates (Letterie et al. 1999). A prospective, randomized study concluded that the use of these echodense catheters simplifies ultrasound-guided embryo transfer and the need to move the catheter for identification, but no differences in success rates were observed when compared with non-echodense

catheters (Karande et al. 2002). Moreover, Coroleu et al. (2006) reported similar pregnancy rates among groups with embryo replacement through echodense and non-echodense catheters. Thus, even with the advent of echogenic catheters, pregnancy rates do not seem to be higher with the use of ultrasound-guided embryo transfer. Previous studies already investigated the influence of transfer distance from the fundus on clinical outcomes. Oliveira et al., (2004) demonstrated that the pregnancy rate is significantly affected by the transfer distance from the uterus fundus. Frankfurter et al. (2004) showed that both pregnancy and implantation rates are positively affected by directing embryo placement to the lower to middle uterine segment. Coroleu et al. (2002a) concluded that applying the fixed distance of 15–20 mm away from the fundus might optimize the results of embryo transfers.

In a previous study designed to determine the location of the physiological embryo implantation site using a three dimensional transvaginal ultrasound, results indicated that the part of the endometrium suitable for human blastocyst implantation, under physiological conditions, is located at the uterine fundus, especially near the uterotubal junction (Minami et al. 2003). Conversely, Frankfurter et al. (2003; 2004) suggested that higher pregnancy rate could be achieved when the site of embryo replacement was more distant from the uterine fundus, from the middle to lower segments of the uterus compared to the upper segment. Moreover, through a logistic regression analysis, Pope et al. (2004) demonstrated that for each additional millimeter that embryos are deposited away from the fundus, as noted by abdominal ultrasound, the odds of clinical pregnancy increased by 11% (Pope et al. 2004).

In our trial, the embryos were deposited in the middle of the cavity length, and, in comparison with the standard ultrasonographic-guided embryo transfer, a significant improve on implantation and pregnancy rates was observed. These findings suggest that the endometrial location may provide a more favorable region for embryo deposition and the embryo transfer based on previous uterine length measurement may be useful to determine the depth beyond which catheter insertion should occur.

CONCLUSION

In conclusion, our findings suggest that embryo replacement in the middle of the cavity length can significantly improve pregnancy and implantation rates, with no additional costs, and therefore embryo transfer based on previous uterine length measurement should be performed during the follicular growth control in controlled ovarian stimulated cycles.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marcílio Nichi, PhD for the critical reading and evaluation of this manuscript.

Corresponding author:

Edson Borges Jr., M.D., PhD

E-mail: edson@fertility.com.br

Address: Av. Brigadeiro Luis Antonio, 4545. Zip: 01401-002

São Paulo – SP, Brazil

Phone: (55 11) 3018-8181

References

- Abou-Setta, A. M. (2007). "What is the best site for embryo deposition? A systematic review and meta-analysis using direct and adjusted indirect comparisons." *Reprod Biomed Online* 14(5): 611-9.
- Abou-Setta, A. M., R. T. Mansour, H. G. Al-Inany, et al. (2007). "Among women undergoing embryo transfer, is the probability of pregnancy and live birth improved with ultrasound guidance

over clinical touch alone? A systemic review and meta-analysis of prospective randomized trials." *Fertil Steril* 88(2): 333-41.

Allahbadia, G. N., G. Gandhi, K. Kadam, et al. (2008). "Anti-bubble trajectory during embryo transfers in donor egg IVF does not predict success." *Reprod Biomed Online* 16(6): 881-5.

Anderson, R. E., N. L. Nugent, A. T. Gregg, et al. (2002). "Transvaginal ultrasound-guided embryo transfer improves outcome in patients with previous failed in vitro fertilization cycles." *Fertil Steril* 77(4): 769-75.

Cevrioglu, A. S., I. Esinler, G. Bozdogan, et al. (2006). "Assessment of endocervical and endometrial damage inflicted by embryo transfer trial: a hysteroscopic evaluation." *Reprod Biomed Online* 13(4): 523-7.

Coroleu, B., O. Carreras, A. Veiga, et al. (2000). "Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization." *Hum Reprod* 15(3): 616-20.

Coroleu, B., P. N. Barri, O. Carreras, et al. (2002a). "The influence of the depth of embryo replacement into the uterine cavity on implantation rates after IVF: a controlled, ultrasound-guided study." *Hum Reprod* 17(2): 341-6.

Coroleu, B., P. N. Barri, O. Carreras, et al. (2002b). "The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: a prospective randomized clinical trial." *Hum Reprod* 17(11): 2885-90.

Coroleu, B., P. N. Barri, O. Carreras, et al. (2006). "Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study." *Hum Reprod* 21(7): 1809-15.

De Placido, G., M. Wilding, I. Stina, et al. (2002). "The effect of ease of transfer and type of catheter used on pregnancy and implantation rates in an IVF program." *J Assist Reprod Genet* 19(1): 14-8.

Drakeley, A. J., A. Jorgensen, J. Sklavounos, et al. (2008). "A randomized controlled clinical trial of 2295 ultrasound-guided embryo transfers." *Hum Reprod* 23(5): 1101-6.

Edwards, R. G. (1995). "Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation." *Hum Reprod* 10 Suppl 2: 60-6.

Englert, Y., F. Puissant, M. Camus, et al. (1986). "Clinical study on embryo transfer after human in vitro fertilization." *J In Vitro Fert Embryo Transf* 3(4): 243-6.

Flisser, E., J. A. Grifo, L. C. Krey, et al. (2006). "Transabdominal ultrasound-assisted embryo transfer and pregnancy outcome." *Fertil Steril* 85(2): 353-7.

Frankfurter, D., C. P. Silva, F. Mota, et al. (2003). "The transfer point is a novel measure of embryo placement." *Fertil Steril* 79(6): 1416-21.

Frankfurter, D., J. B. Trimarchi, C. P. Silva, et al. (2004). "Middle to lower uterine segment embryo transfer improves implantation and pregnancy rates compared with fundal embryo transfer." *Fertil Steril* 81(5): 1273-7.

Garcia-Velasco, J. A., V. Isaza, J. Martinez-Salazar, et al. (2002). "Transabdominal ultrasound-guided embryo transfer does not increase pregnancy rates in oocyte recipients." *Fertil Steril* 78(3): 534-9.

Isaza, V., J. A. Garcia-Velasco, M. Aragonés, et al. (2002).

"Oocyte and embryo quality after coasting: the experience from oocyte donation." *Hum Reprod* 17(7): 1777-82.

Karande, V., D. Hazlett, M. Vietzke, et al. (2002). "A prospective randomized comparison of the Wallace catheter and the Cook Echo-Tip catheter for ultrasound-guided embryo transfer." *Fertil Steril* 77(4): 826-30.

Kosmas, I. P., R. Janssens, L. De Munck, et al. (2007). "Ultrasound-guided embryo transfer does not offer any benefit in clinical outcome: a randomized controlled trial." *Hum Reprod* 22(5): 1327-34.

Leong, M., C. Leung, M. Tucker, et al. (1986). "Ultrasound-assisted embryo transfer." *J In Vitro Fert Embryo Transf* 3(6): 383-5.

Letterie, G. S., L. Marshall and M. Angle (1999). "A new coaxial catheter system with an echodense tip for ultrasonographically guided embryo transfer." *Fertil Steril* 72(2): 266-8.

Li, R., L. Lu, G. Hao, et al. (2005). "Abdominal ultrasound-guided embryo transfer improves clinical pregnancy rates after in vitro fertilization: experiences from 330 clinical investigations." *J Assist Reprod Genet* 22(1): 3-8.

Mansour, R., M. Aboulghar and G. Serour (1990). "Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization." *Fertil Steril* 54(4): 678-81.

Mansour, R. T. and M. A. Aboulghar (2002). "Optimizing the embryo transfer technique." *Hum Reprod* 17(5): 1149-53.

Matorras, R., E. Urquijo, R. Mendoza, et al. (2002). "Ultrasound-guided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers." *Hum Reprod* 17(7): 1762-6.

Minami, S., K. Ishihara and T. Araki (2003). "Determination of blastocyst implantation site in spontaneous pregnancies using three-dimensional transvaginal ultrasound." *J Nippon Med Sch* 70(3): 250-4.

Oliveira, J. B., A. M. Martins, R. L. Baruffi, et al. (2004). "Increased implantation and pregnancy rates obtained by placing the tip of the transfer catheter in the central area of the endometrial cavity." *Reprod Biomed Online* 9(4): 435-41.

Pope, C. S., E. K. Cook, M. Arny, et al. (2004). "Influence of embryo transfer depth on in vitro fertilization and embryo transfer outcomes." *Fertil Steril* 81(1): 51-8.

Sallam, H. N. (2005). "Embryo transfer: factors involved in optimizing the success." *Curr Opin Obstet Gynecol* 17(3): 289-98.

Silberstein, T., S. Weitzen, D. Frankfurter, et al. (2004). "Cannulation of a resistant internal os with the malleable outer sheath of a coaxial soft embryo transfer catheter does not affect in vitro fertilization-embryo transfer outcome." *Fertil Steril* 82(5): 1402-6.

Steptoe, P. C. and R. G. Edwards (1978). "Birth after the reimplantation of a human embryo." *Lancet* 2(8085): 366.

Strickler, R. C., C. Christianson, J. P. Crane, et al. (1985). "Ultrasound guidance for human embryo transfer." *Fertil Steril* 43(1): 54-61.

Tur-Kaspa, I., Y. Yuval, D. Bider, et al. (1998). "Difficult or repeated sequential embryo transfers do not adversely affect in-vitro fertilization pregnancy rates or outcome." *Hum Reprod* 13(9): 2452-5.

A síndrome do hiperestímulo ovariano não influencia os resultados clínicos após ciclos de descongelamento de embriões provenientes de ciclos de ICSI

The ovarian hyperstimulation syndrome does not influence clinical outcome post embryo thawing cycles originating from ICSI cycles.

Renata Cristina Ferreira¹, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga², Tsutomu Aoki³, Assumpto Iaconelli Jr.⁴, Edson Borges Jr⁵

¹Embriologista do Fertility - Centro de Fertilização Assistida. Mestre em Imunologia pela Universidade de São Paulo

²Coordenadora do Departamento de Pesquisa Científica do Fertility - Centro de Fertilização Assistida e Coordenadora da Disciplina de Laboratório em Reprodução Humana Assistida do Instituto Sapientiae - Pesquisa e Ensino em Reprodução Humana Assistida. Mestre em Reprodução Animal pela University of Queensland, Austrália

³Chefe de Clínica "step 01" - Diretor de Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

⁴Diretor do Fertility - Centro de Fertilização Assistida. Especialista em Ginecologia e Obstetrícia pela Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia

⁵Diretor do Fertility - Centro de Fertilização Assistida e Coordenador Geral do Instituto Sapientiae - Ensino e Pesquisa em Reprodução Assistida. Doutor em Urologia pela Universidade Estadual de São Paulo. Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste estudo foi avaliar se a criopreservação de embriões provenientes de ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de pacientes com SHO pode influenciar os resultados clínicos quando comparado às pacientes que receberam oócitos doados e, por não estarem com o endométrio preparado, tiveram seus embriões criopreservados.

Métodos: Cinquenta e oito casais foram submetidos a ciclos terapêuticos de ICSI sendo, 26 com manifestações clínicas de SHO (grupo SHO) e 32 casais que receberam oócitos de doadoras (grupo controle). Os embriões foram congelados no dia +2 ou dia +3 de desenvolvimento. Todas as pacientes incluídas neste estudo tiveram seus embriões criopreservados antes da transferência, e no momento do descongelamento, submetidas ao preparo endometrial. As taxas de embriões sobreviventes, implantação, gestação, e abortamento foram avaliadas nos ciclos de descongelamento embrionário.

Resultados: Não houve diferença entre os grupos em relação a taxa de fertilização (SHO: 71.89% ± 15.45, Controle: 79.75% ± 21.68, p= 0.234), taxa de embriões sobreviventes (SHO: 68.85 ± 21.10, Controle: 59.53 ± 36.79, p= 0.233), taxa de embriões de alta qualidade (SHO: 25.20 ± 23.90, Controle: 27.40 ± 30.30, p= 0.760), taxa de implantação (SHO: 17.9 ± 26.9, Controle: 12.5 ± 23.7, p= 0.435), taxa de gestação (SHO: 38.50, Controle: 28.60, p= 0.441) e taxa de abortamento (SHO: 40.00, Controle: 25.00, p= 0.332).

Conclusão: nossos dados sugerem que os resultados clínicos de ciclos de congelamento e descongelamento não são afetados pela presença de manifestações clínicas da síndrome do hiperestímulo ovariano após o estímulo ovariano controlado.

Palavras-chave: Síndrome de hiperestimulação ovariana, Injeções de espermatozoides intracitoplásmicas, Taxa de gravidez, Implantação do embrião

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was evaluate if the embryos cryopreservation from OHSS patients Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles could be influen-

ce the clinical outcomes when compared to patients who receive oocytes from donors but the endometrium was not prepared and the embryos were cryopreserved.

Methods: Fifty eight couples submitted to ICSI cycles in which 26 with OHSS clinical manifestation (OHSS group) and 32 couples who have received oocytes from donors (control group). The embryos were frozen on day+2 or +3 of development. All patients included in this study had embryos cryopreserved before the transfer, and in the thawing cycle, only the endometrium preparation was performed. The embryo survival, implantation, pregnancy and miscarriage rates were evaluated in the embryo thawing cycle.

Results: There was no difference among the groups in relation to fertilization rate (OHSS: 71.89% ± 15.45, Control: 79.75% ± 21.68, p= 0.234), survival embryos rate (OHSS: 68.85 ± 21.10, Control: 59.53 ± 36.79, p= 0.233), high quality embryos rate (OHSS: 25.20 ± 23.90, Control: 27.40 ± 30.30, p= 0.760), implantation rate (OHSS: 17.9 ± 26.9, Control: 12.5 ± 23.7, p= 0.435), pregnancy rate (OHSS: 38.50, Control: 28.60, p= 0.441) and miscarriage rate (OHSS: 40.00, Control: 25.00, p= 0.332).

Conclusion: Our findings suggest that clinical outcomes in freeze and thawing cycles were not affected by the presence of ovarian hyperstimulation syndrome clinical manifestation after controlled ovarian stimulation.

Key words: Ovarian hyperstimulation syndrome; Sperm injections, intracytoplasmic; Pregnancy rate; Embryo implantation

INTRODUÇÃO

A síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO) foi definida pelo Comitê Prático da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva como "uma resposta exagerada a terapia de indução ovulatória". Esta síndrome, por complicação da estimulação ovariana com gonadotrofinas exógenas, representa um risco à vida das pacientes (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2006). A apresentação clínica pode ser dividida em três categorias: leve, moderada e grave (Elchalal, Schenker, 1997). A incidência de SHO é de 20 ± 33%

para a forma leve, $3 \pm 6\%$ para a forma moderada, e de $0.1 \pm 2\%$ para a forma grave da doença (Delvigne, Rozenberg 2002).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de SHO são: idade (pacientes jovens), baixo peso corpóreo, síndrome dos ovários policísticos (SOP), altas doses de gonadotrofinas exógenas, nível sérico de estradiol (E_2) elevado ou rapidamente aumentado, e episódios prévios de SHO (Practice Committee of the American Society for Reproduction Medicine, 2006). Os sinais clínicos podem incluir rápido ganho de peso, oligúria ou anúria, hemoconcentração, leucocitose, hipovolemia, desequilíbrio eletrolítico (tipicamente hiponatremia e hipercalemia), ascite, efusão pleural e pericárdica, síndrome do desconforto respiratório adulto e hipercoagulabilidade com sequelas tromboembólicas (Whelan ^{3rd}, Vlahos 2000, Chang, Ginsberg, 2006), entre outros, podendo estes retroceder espontaneamente após 10–14 dias (Whelan ^{3rd}, Vlahos, 2000).

Os efeitos da SHO na qualidade oocitária ou embrionária são controversos. Fábregues et al (2004) não encontraram qualquer diferença na taxa de fertilização, implantação, gestação ou abortamento entre pacientes que apresentam SHO e o grupo controle. Por outro lado, Aboulghar et al (1997) sugerem que tanto a qualidade oocitária como a taxa de fertilização são piores nestas pacientes.

A criopreservação de embriões tem sido usada como ferramenta na prevenção da SHO e para melhorar os resultados dos ciclos de reprodução humana assistida (RHA) em pacientes com risco de SHO (Chen et al 2003, Orvieto 2005). Entretanto, a criopreservação pode ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos embriões, principalmente quando estes apresentam defeitos citoplasmáticos (Balaban et al 2008). O principal problema durante a criopreservação dos embriões está na formação de cristais de gelo no ambiente intracelular, que pode levar ao dano celular e à parada de desenvolvimento embrionário (Liebermann et al, 2003). Edgar et al (2000) sugerem que o impacto negativo da criopreservação é limitado à perda de blastômeros, sendo a taxa de implantação de embriões descongelados e intactos similares aos embriões frescos. Entretanto, ainda foi pouco investigado se o possível dano causado aos embriões provenientes de pacientes com SHO, somado aos efeitos da criopreservação, pode ocasionar piores resultados clínicos do ciclo de descongelamento. O objetivo deste estudo foi avaliar se a criopreservação de embriões provenientes de ciclos de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) de pacientes com SHO pode influenciar os resultados clínicos quando comparado à pacientes que receberam oócitos doados e por não estarem com o endométrio preparado, tiveram seus embriões criopreservados.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Este estudo de caso controle foi realizado em 58 casais submetidos a estímulo ovariano controlado para ciclos de ICSI. Todos os pacientes concordaram com que os resultados de seus ciclos fossem utilizados para pesquisas científicas, e para isso assinaram o termo de consentimento informado. Além disso, as pacientes que receberam os oócitos de doadoras assinaram termo de consentimento Livre e Esclarecido referente ao recebimento e transferência dos embriões provenientes destes oócitos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local/ institucional.

Foram inclusos neste estudo 58 ciclos de descongelamento de embriões sendo estes divididos em dois grupos: 26 ciclos em que as pacientes apresentaram manifestação clínica de SHO, com o valor de estradiol acima de 3000pg/mL e necessidade de parectese após a punção (grupo SHO); e 32 ciclos onde as pacientes receberam oócitos maduros doados, sendo submetidos à ICSI no dia da punção folicular da doadora, utilizando o sêmen do cônjuge da receptora (grupo controle). Neste estudo não incluímos doação de oócitos congelados.

A principal indicação para a realização de ciclo de ICSI nas pacientes do grupo SHO foi fator masculino, e nas pacientes do grupo controle foi o fator ovariano, devido a baixa reserva ovariana.

Os embriões das pacientes que receberam oócitos doados inclusas neste estudo foram criopreservados, pois estas não se encontravam com endométrio preparado para a transferência dos embriões. Em ambos os grupos um ciclo de descongelamento de embriões foi realizado posteriormente. Todas as pacientes foram submetidas a preparo endometrial para a realização da transferência dos embriões criopreservados. Os valores médios da idade materna e concentração de E_2 descritos no grupo controle são referentes à doadora dos oócitos. As taxas de embriões sobreviventes, implantação, gestação, e abortamento foram avaliadas nos ciclos de descongelamento de embriões de ambos os grupos.

Foram considerados embriões sobreviventes e íntegros ao congelamento-descongelamento quando 50% ou mais dos blastômeros mostravam membranas morfológicamente normais e citoplasma claro. Quando 100% dos blastômeros mostravam membranas morfológicamente normais e citoplasma claro, os embriões foram considerados intactos. A taxa de implantação foi definida como o número de sacos gestacionais dividido pelo número de embriões transferidos para cada paciente. A gestação clínica foi definida como a presença de saco gestacional, visibilizado por ultra-sonografia (USG) e presença de batimento cardíaco, de 4 a 6 semanas após a transferência embrionária. Por fim, o abortamento foi definido como perda espontânea da gestação antes da 24ª semana.

Preparo das amostras seminais para a realização da ICSI

Seguidos de 3-5 dias de abstinência ejacutória, as amostras seminais foram analisadas quanto ao volume, concentração, motilidade, aglutinação, presença de células redondas e morfologia espermática, segundo os critérios estritos de Kruger e da Organização Mundial da Saúde (OMS). As amostras foram preparadas por gradiente descontínuo de densidade ou por "swim up" sob meio, para serem utilizadas na ICSI. Para a seleção do método de processamento seminal foi levado em consideração o volume e a concentração seminal. Amostras com concentração $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ e motilidade $\geq 50\%$ foram processadas pelo método de "swim up". Entretanto, as amostras com valores abaixo dos acima descritos foram processadas por gradiente descontínuo de densidade.

Estimulação ovariana controlada

A estimulação ovariana controlada foi alcançada por bloqueio pituitário longo usando um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRHa - Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, France), seguido de estimulação ovariana com hormônio foliculo estimulante (r-FSH - Gonal-F®, Sero- no, Genève, Switzerland) recombinante. As doses de FSH administradas foram ajustadas conforme a resposta folicular de cada paciente. A dinâmica folicular foi acompanhada por dosagens séricas de E_2 e USG. Quando observado um folículo com diâmetro superior a 18mm ou dois folículos com diâmetro superior a 16mm a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG - Ovidrel™, Sero- no, Genève, Switzerland) foi administrada para maturação folicular final. Trinta e seis horas após a administração do r-hCG, os oócitos foram coletados por folículo-aspiração transvaginal guiada por USG.

Preparação dos oócitos, avaliação da fertilização e qualidade embrionária

Após a recuperação, os oócitos foram incubados em meio de cultura (HTF - Irvine Scientific, Santa Ana, USA) suplementado com 10% de albumina humana sintética (HSA, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) coberto por óleo mineral (Ovoil™ - Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) por 4-5

horas a 37°C e 6% de CO₂. A porcentagem de CO₂ utilizada nas incubadoras foi regulada de acordo com o pH do meio de cultivo utilizado. Esta medição foi realizada uma vez por semana como controle de qualidade. As células do cópulo foram removidas por exposição durante 30s ao meio tamponado com HEPES contendo 80 IU/mL de hialuronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, USA). Posteriormente, as células restantes do cópulo foram cuidadosamente removidas por denudação mecânica usando pipetas Pasteur de vidro afiladas manualmente.

Os óocitos denudados foram então avaliados quanto a sua maturação nuclear. Óocitos que apresentavam a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II), observados em microscópio invertido (Eclipse TE 300, Nikon®, Tokyo, Japan), foram utilizados para ICSI. Os óocitos que apresentavam a vesícula germinativa (prófase I) ou que não apresentavam vesícula germinativa ou extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase I) permaneceram em cultura e não foram injetados.

A fertilização foi avaliada 16 a 20 horas após a ICSI, e esta foi considerada normal quando 2 pró-núcleos claramente distintos estavam presentes. Para avaliar a qualidade embrionária foram considerados os seguintes parâmetros: (i) número de blastômeros, (ii) porcentagem e localização de fragmentação, (iii) variação na simetria dos blastômeros, (iv) presença de multinucleação, e (v) defeitos na zona pelúcida e citoplasma.

Embriões de alta qualidade foram definidos como os que apresentavam 4 células no segundo dia ou oito células no terceiro dia de desenvolvimento, com menos de 10% de fragmentação, simetria entre os blastômeros, ausência de multinucleação, citoplasma com granulosidade moderada e sem inclusões, ausência de granulosidade no espaço perivitelínico, e ausência de dismorfismo de zona pelúcida.

Preparo endometrial

O preparo endometrial foi realizado com administração de E₂ para todas as pacientes que realizaram a transferência de embriões congelados-descongelados (200mg/dia a partir do 5º dia do ciclo menstrual; Estradot - Novartis, Dase, Switzerland). Para o suporte da fase lútea foi utilizada rotineiramente progesterona micronizada (600mg/dia a partir do 14º dia do ciclo menstrual; Utrogestan® - FQM, Rio de Janeiro, Brasil) e/ou conjuntamente E₂ (Estradot - Novartis, Dase, Switzerland) dependendo da idade e espessura endometrial de cada paciente. As transferências foram realizadas quando o endométrio apresenta-se espessura maior ou igual a 8,0 mm em ambos os grupos, e não houvesse manifestações clínicas de hiperestímulo nas pacientes do grupo de estudo.

De maneira geral, os embriões das pacientes com SHO foram transferidos cerca de 6 meses após o desaparecimento das manifestações clínicas.

Congelamento e descongelamento de embriões

A criopreservação foi realizada utilizando protocolo de congelamento lento em câmara de congelamento biológico programado (Cryochamber CL8800, Cryologic, Mulgrave, Victoria, Australia), utilizando propanodiol (PROH) como crioprotetor. Os meios para congelamento embrionário e descongelamento embrionário (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) foram utilizados conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Os embriões foram congelados no dia+2 ou dia+3 de desenvolvimento, contendo de 6 a 12 blastômeros.

Após o procedimento de descongelamento, os embriões foram transferidos para o meio de cultivo onde a clivagem e a qualidade embrionária foram avaliadas em microscópio invertido. Os embriões foram cultivados em atmosfera umidificada à 6% de CO₂ e 37°C, por 2-4 horas até o momento da transferência embrionária. Imediatamente antes da transferência, os embriões foram submetidos a uma pequena abertura na zona pelúcida utilizando a técnica de "Assisted hatching" com laser diodo (OCTAX PolarAIDE™, Herborn, Germany).

Este procedimento foi realizado de maneira rotineira para todos os ciclos de descongelamento. Para cada casal, de um a quatro embriões foram transferidos dependendo da qualidade embrionária e da idade materna.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Para comparação das médias de variáveis numéricas, o teste t-Student's foi utilizado. Já para variáveis categóricas, os grupos foram comparados por teste de qui-quadrado. Foram considerados significantes os resultados com nível crítico de 5% ($P \leq 0.05$). A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Minitab (versão 14).

RESULTADOS

A média de idade das pacientes foi similar entre os grupos (SHO: 29.65 ± 3.05, Controle: 30.68 ± 3.64, $p = 0.253$). Entretanto, a concentração de E₂ sérico alcançou, no dia da administração do hCG, 3720 ± 3502 pg/ml no grupo SHO e 2753 ± 1873 pg/ml no grupo controle ($p = 0.214$). Não houve diferença em relação à taxa de fertilização entre os grupos (SHO: 71.89% ± 15.45, Controle: 79.75% ± 21.68, $p = 0.234$). Em adição, a taxa de embriões sobreviventes e de embriões intactos foi similar entre os grupos (tabela 1).

Embora as pacientes do grupo SHO tivessem maior número de embriões, e por essa razão, maior número de embriões de alta qualidade no dia do congelamento, a taxa de embriões de alta qualidade não diferiu entre os grupos (tabela 1). As taxas de implantação, gestação e abortamento também não foram significativamente diferentes entre os grupos (tabela 2).

Tabela 1: Qualidade embrionária antes e após o descongelamento

Qualidade embrionária	SHO (n= 26)	Controle (n= 32)	Valor de P
Antes do congelamento			
Número de embriões	17.27 ± 10.16	4.75 ± 1.55	<0.0001
Número de embriões de alta qualidade	4.88 ± 6.73	1.38 ± 1.60	0.015
Taxa de embriões de alta qualidade (%)	25.20 ± 23.90	27.40 ± 30.30	0.760
Após o descongelamento			
Número de embriões viáveis	4.19 ± 2.30	2.38 ± 1.70	0.002
Taxa de embriões sobreviventes (%)	68.85 ± 21.10	59.53 ± 36.79	0.233
Taxa de embriões intactos (%)	26.83 ± 28.13	21.46 ± 28.53	0.475

SHO – Pacientes com síndrome do hiperestímulo ovariano

Tabela 2: Resultados clínicos de pacientes dos grupos SHO e Controle

	SHO (n= 26)	Controle (n= 32)	Valor de P
Taxa de implantação (%)	17.9 ± 26.9	12.5 ± 23.7	0.435
Taxa de gestação (%)	38.50	28.60	0.441
Taxa de abortamento (%)	40.00	25.00	0.332

SHO – Pacientes com síndrome do hiperestímulo ovariano

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que óocitos de pacientes com SHO apresentam similar habilidade de fertilização e desenvolvimento embrionário que óocitos de doadoras. Além disso, não foi observado efeito prejudicial da criopreservação na sobrevivência embrionária após descongelamento, e nas taxas de implantação e gestação.

A implantação de embriões congelados-descongelados pode ser influenciada por vários fatores, como idade das pacientes, protocolo de congelamento e descongelamento, critério usado para criopreservação, e o estágio da clivagem do embrião no momento do congelamento (Lahav-Baratz et al, 2003; Gabrielsen et al, 2006). Alguns autores sugerem que a qualidade e a maturidade dos oócitos de pacientes com SHO são significativamente piores (Aboulghar et al 1997; Akagbosu et al 1998). Esta pior qualidade oocitária pode influenciar os resultados pós-descongelamento. Entretanto, embora tenha sido discutido que a qualidade do oócito/embrião pode estar prejudicada em pacientes com SHO, estas pacientes apresentam maior número de oócitos a serem fertilizados e por consequência um maior número de embriões. Usualmente, os melhores embriões são selecionados para a transferência e somente os embriões de boa qualidade são selecionados para a criopreservação.

A viabilidade de cada embrião depende da qualidade biológica dos gametas. Embora esteja bem reconhecido que a qualidade do espermatozoide apresente um importante papel durante a fertilização (Swann et al 2006, Saunders et al 2007), a expressão do genoma embrionário, que consiste da combinação do material genético do espermatozoide e do oócito, começa no segundo ciclo de divisão embrionária, no estágio de 4 a 8 células do desenvolvimento embrionário humano (Tesarik et al, 1986 e 1988). Os eventuais efeitos nos genes derivados dos espermatozoides estão de maneira pouco provável manifestados entre a fertilização e o estágio de 4 células. O estágio de 4 células é normalmente observado antes da 50ª hora de desenvolvimento, e o estágio de 8 células é usualmente notado antes da 72ª hora (Veeck, 1991). No presente estudo, o congelamento de embriões foi realizado no segundo dia (quando a ativação do genoma embrionário provavelmente não ocorreu) ou terceiro dia de desenvolvimento (de 48 a 72 horas após ICSI). Consequentemente, sugere-se que fatores derivados dos oócitos poderiam ser responsáveis pelo controle pré-implantacional até o congelamento.

No presente estudo, obtivemos, no protocolo de congelamento-descongelamento, a mesma sobrevivência embrionária e resultados clínicos similares em pacientes do grupo SHO, que em pacientes do grupo de controle. Apesar de não haver diferenças estatísticas, as pacientes com SHO apresentaram um aumento na taxa de abortamento. Raziel e cols (2002) mostraram que a taxa de abortamento em pacientes com SHO grave era significativamente maior quando comparada a pacientes sem o desenvolvimento da síndrome. Por outro lado, alguns estudos sugerem não haver influência da SHO nos resultados de RHA (Aboulghar et al, 1997; Fabregues et al, 2004; Urman et al, 2007). Portanto, nossos achados, juntamente com os estudos acima descritos, sugerem que embriões de alta qualidade provenientes de pacientes com SHO têm a mesma capacidade de sobrevivência após descongelamento e desenvolvimento que embriões de grupos controle.

CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que os resultados dos ciclos de congelamento-descongelamento não são afetados pela presença de SHO. Estes resultados indicam que embriões obtidos de ciclos de ICSI de pacientes com SHO sobrevivem à criopreservação de maneira similar aos gerados por outras pacientes submetidas ao mesmo tipo de tratamento.

Endereço para correspondência

Edson Borges Jr., M.D., Ph.D.
Av. Brigadeiro Luis Antônio, 4545. CEP: 01401-002
Fone/fax: 55-11-38859858
e-mail: science@sapientiae.com.br

Referências bibliográficas

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Ramzy AM, Amin YM. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 1997; 68(6):1017-21.
- Akagbosu F, Marcus S, Abusheikha N, Avery S, Brinsden P. Does ovarian hyperstimulation syndrome affect the quality of oocytes? *Hum Reprod*. 1998; 13(9):2583-4.
- Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Hum Reprod*. 2008; 23(8):1778-85.
- Chan WS, Ginsberg JS. A review of upper extremity deep vein thrombosis in pregnancy: unmasking the 'ART' behind the clot. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(8):1673-7.
- Chen D, Burmeister L, Goldschlag D, Rosenwaks Z. Ovarian hyperstimulation syndrome: strategies for prevention. 2003; *Reprod Biomed Online*. 7(1): 43-9.
- Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (SHO): a review. *Hum Reprod Update*. 2002; 8(6):559-77.
- Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod*; 2000; 15(1):175-9.
- Elchalal U, Schenker JG. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome--views and ideas. *Hum Reprod*. 1997; 12(6):1129-37.
- Fabregues F, Penarrubia J, Vidal E, Casals G, Vanrell JA, Balasch J. Oocyte quality in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome: a self-controlled clinical study. *Fertil Steril*. 2004; 82(4): 827-33.
- Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I. Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online*. 2006; 12(1): 70-6.
- Lahav-Baratz S, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, Dirmfeld M. Analyzing factors affecting the success rate of frozen-thawed embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2003; 20(11): 444-8.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 2003;7(6):623-33.
- Orvieto R. Can we eliminate severe ovarian hyperstimulation syndrome? *Hum Reprod*. 2005; 20(2): 320-2.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2006; 86(5 Suppl):S178-83.
- Raziel A, Friedler S, Schachter M, Strassburger D, Mordechai E, Ron-El R. Increased early pregnancy loss in IVF patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. 2002; (17): 107-110.
- Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp*. 2007; (74): 23-36.
- Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca2+ oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 2006; 17(2): 264-73.
- Tesarik J, Kopečný V, Plachot M, Mandelbaum J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. *J Reprod Fertil*. 1986; 78(2): 463-70.
- Tesarik J, Kopečný V, Plachot M, Mandelbaum J. Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. *Dev Biol*. 1988. 128(1): 15-20.
- Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. *Fertil Steril*. 2007; 87(2): 310-5.
- Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Baltimore, William and Wilkins; 1991. 420p.
- Whelan JG 3rd, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2000; 73(5): 883-96.

Indução da foliculogênese em ovários congelados/descongelados e transplantados para o peritônio de ratas.

Folliculogenesis in transplanted rat ovaries after freezing/thawing

José Helvécio Kalil de Souza¹, Luis Felipe Victor Spyer Prates¹, Ana Carolina Ferreira Moreira², Marcos Sampaio², Selmo Geber^{1,2}

¹Pós Graduação em Saúde da Mulher - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - Minas Gerais

²ORIGEN - Centro de Medicina Reprodutiva - Belo Horizonte - Minas Gerais

RESUMO

Objetivo: Avaliar, através de análise histológica, a capacidade do ovário de ratas congelados/descongelados e posteriormente transplantados para o peritônio, responder à indução da foliculogênese com hormônio folículo-estimulante recombinante.

Métodos: Um total de 30 ratas da raça Holtzman, da mesma idade, foi dividido em 3 grupos, sendo o grupo I submetido a indução da foliculogênese com FSH após congelamento/descongelamento e transplante do ovários; grupo II teve indução com FSH após transplante; grupo III teve indução da ovulação (controle) após laparotomia. O congelamento foi feito pela técnica de congelamento lento, com crioprotetor DMSO. O descongelamento foi feito à temperatura ambiente no dia do transplante. A indução foi realizada no 15º dia após a cirurgia. Os ovários de todas as ratas foram removidos no 4º dia do ciclo estral para análise histológica.

Resultados: Os ovários do grupo I apresentaram um total de quatro folículos primários, oito pré-antrais e 13 antrais; no grupo II, sete folículos primários, 11 pré-antrais e 10 antrais; e o grupo III, um folículo primário, 14 pré-antrais e 16 antrais. Os ovários congelados/descongelados e transplantados para o peritônio responderam ao estímulo com FSH de forma semelhante a ovários em sítio natural e em relação aos transplantados sem congelamento.

Conclusões: A criopreservação, descongelamento e transplante do tecido ovariano de ratas, sem reanastomose vascular para o peritônio, não prejudicou o desenvolvimento folicular após a administração do hormônio folículo-estimulante.

Palavras-chave: ovários / transplante / congelamento / câncer / foliculogênese / indução

ABSTRACT

Objective: Evaluate the capacity of transplanted rat ovaries to respond to ovulation induction with follicular stimulation hormone, after freezing/thawing.

Methods: A total of 30 Holtzman rats at the same age, were included in the study and split in 3 groups. In group I ovulation induction with FSH was performed after Freezing/Thawing and transplantation of the ovary to the peritoneum; in group II ovulation induction with FSH was performed after transplantation of the ovary to the peri-

toneum; in group III, ovulation induction with FSH was performed after laparotomy was performed (shame operation). Slow freezing was performed in all groups using DMSO and thawing was performed at room temperature at the day transplantation was performed. Ovulation induction was performed on day 15 after surgery. Ovaries were removed on day 4 of the oestral cycle for histological analyses.

Results: Ovaries of group I had four primary follicles, eight pre-antral follicles and 13 antral follicles; group II, seven primary follicles, 11 pre-antral follicles and 10 antral follicles; and group III one primary follicle, 14 pre-antral follicles and 16 antral follicles. Frozen/thawed and transplanted ovaries did respond to ovulation induction with FSH similar to normal and non-frozen ovaries.

Conclusion: Cryopreservation, thawing and transplantation of rat ovarian tissue, with no vascular anastomosis, to the peritoneum, did not jeopardize follicular development after ovulation induction with follicular stimulation hormone.

Key words: ovary / transplant / cryopreservation / cancer / folliculogenesis / induction

INTRODUÇÃO

As mulheres portadoras de patologias malignas apresentam, atualmente, longa expectativa de vida proporcionada pelos tratamentos disponíveis (Ries *et al.*, 1999). Com a redução dos índices de mortalidade e crescimento das taxas de sobrevida, as consequências dos tratamentos em termos de resultados sobre a capacidade reprodutiva tornaram-se fatores importantes a serem levados em consideração (Agarwal & Said, 2004). Os tratamentos com agentes quimioterápicos, radioterapia e com cirurgias, entretanto, estão associados a significativa dano gonadal. Assim, vários métodos de preservação da função gonadal têm sido propostos (Howell & Shalet, 2002).

Algumas opções estão disponíveis para preservar a fertilidade em pacientes oncológicas e dar-lhes a oportunidade de se tornarem mães após o tratamento. O congelamento de embriões, a criopreservação oocitária e a criopreservação de tecido cortical ovariano estão entre as mais recentes opções (Gosden, 2005; Meirou *et al.*, 2005; Prates & Geber, 2009). A escolha do método a ser utilizado depende de diferentes parâmetros: do tipo e da urgência do tratamento, do tipo de tumor, da idade da

paciente e da existência de parceiro (Kim, 2006). Para as pacientes a serem submetidas ao tratamento cirúrgico (ooforectomia), o congelamento do tecido ovariano seria o mais recomendado. Uma vez findo o tratamento oncológico, o ovário pode ser descongelado e transplantado novamente para a paciente (Demestree *et al.*, 2006). A criopreservação tem sido realizada em estudos experimentais, com resultados bastante satisfatórios, mantendo a viabilidade do tecido germinativo (Hovatta, 2005). Mais ainda, a recuperação do tecido ovariano após o descongelamento vem sendo demonstrada por análises morfológica, imunohistoquímica e funcional (Newton *et al.*, 1996; Candy *et al.*, 2000; Fabbri *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Segino *et al.* 2003).

O transplante ovariano fresco, para a cavidade peritoneal, sem reanastomose vascular, em ratas, foi descrito com sucesso por Barros *et al.*, 2008. Lee *et al.* (2005) descreveram desenvolvimento folicular após transplante subcutâneo de tecido ovariano criopreservado, em ratas. Em ovários de ratas congelados/descongelados, e posteriormente transplantados sem reanastomose vascular, Prates *et al.*, (2008) também descreveram retorno à função reprodutiva. Em ovelhas, Gosden *et al.* (1994) descreveram gestações, a partir de transplante autólogo de tecido ovariano fresco e após congelamento. Salle *et al.* (1998) mostraram desenvolvimento normal de folículos em fragmentos de ovário de ovelhas transplantados para o hilo ovariano contralateral após congelamento. Gunasena *et al.* (1997) obtiveram gestações em camundongos após transplante autólogo de ovário fresco e após congelamento.

O uso de indutores da foliculogênese após congelamento/descongelamento e transplante de tecido ovariano, foi inicialmente descrito por Wang *et al.* (2002). Os autores descrevem crescimento folicular nos ovários de fêmeas de camundongos induzidas com gonadotrofina da mulher menopausada superior ao observado no grupo sem indução.

Em humanos, apenas um número limitado de mulheres foi submetida à indução da foliculogênese após transplante de ovários congelados/descongelados, com resultados limitados. Um total de 25 mulheres foram submetidas ao tratamento com um pequeno número de oócitos captados, com baixa taxa e fertilização e desenvolvimento embrionário e apenas uma gestação descrita após uso da técnica de reprodução assistida (Oktay & Sonmeyer, 2004; Schmidt *et al.*, 2005; Dolmans *et al.*, 2009; Sanchez-Serrano *et al.*, 2010).

O objetivo do estudo foi avaliar, através de análise histológica, a capacidade do ovário de ratas congelados/descongelados e posteriormente transplantados para o peritônio, responder à indução da foliculogênese com hormônio foliculo-estimulante recombinante.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo experimental controlado que utilizou ratas da raça Holtzman, nuligestas e com idade superior a 12 semanas de vida, cujo peso mínimo era de 200 gramas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (101/05). A abordagem dos animais foi feita de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque e com as Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Cooper, 1985). As ratas foram mantidas em regime de luz/escurecimento de 12/12 horas com água e ração *ad libitum*.

Um total de 30 ratas foi dividido em três grupos com 10 ratas cada sendo: Grupo I (estudo) indução da foliculogênese,

após ooforectomia, criopreservação e transplante do tecido ovariano; Grupo II (controle) indução da foliculogênese após o ooforectomia e transplante do tecido ovariano e Grupo III (controle - laparotomia branca), indução da foliculogênese.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram operados em dois conjuntos de 15, todos pertencendo à mesma ninhada, sendo cinco para cada um dos grupos de estudo, escolhidos de forma aleatória. Foram realizadas as cirurgias seguindo-se a seguinte ordem: congelamento (Grupo I), transplante peritoneal (Grupo II), controle (Grupo III), completando-se, desta forma, as 15 cirurgias. Os três grupos foram emparelhados quanto à idade das ratas e quanto à habilidade do cirurgião (a mesma equipe) no decorrer de todo o experimento.

Inicialmente foi realizada analgesia e anestesia com a associação de xilazina (10mg/kg) e ketamina (60 mg/kg) por via intramuscular, seguida de tricotomia e anti-sepsia da região abdominal e abertura da cavidade abdominal e com o respectivo inventário. Nas ratas do grupo I, foram realizadas a ooforectomia bilateral e cauterização do suporte sanguíneo com cautério bipolar. Os ovários excisados foram seccionados em seu maior diâmetro e introduzidos cada um em um tubo Eppendorf distinto, contendo meio de cultura tamponado (Geber *et al.*, 2002), e colocados em gelo. Cada rata desse grupo foi identificada por meio de pequenas incisões nas orelhas.

Nas ratas do grupo II, os ovários também foram ressecados bilateralmente, seccionados pela metade e, uma das metades seccionada foi suturada em superfície de peritônio, ipsilateralmente ao ovário originário, junto à bifurcação dos vasos epigástricos inferiores superficiais. As ratas do grupo III foram submetidas à laparotomia, com o inventário da cavidade e observação criteriosa dos ovários das mesmas. Nos três grupos, após a realização dos procedimentos descritos, foi feita a sutura em monobloco de peritônio, aponeurose e pele. Depois disso, as ratas eram observadas até o seu restabelecimento e recolocadas nas respectivas gaiolas.

Congelamento/descongelamento

Os ovários removidos, e seccionados em duas metades, foram preparados para o congelamento a partir da retirada de toda a gordura peritoneal e periovariana. Foi realizado o congelamento de apenas uma das metades de cada ovário. Cada fragmento foi lavado por três vezes em meio de cultura tamponado contendo 10% de substituto sintético de soro (SSS - Irvine - EUA) e então colocado em criotubos identificados contendo um volume final de 1,8 ml de crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma - EUA) 1,5 Molar, acrescido de 10% de SSS. Em seguida, foram colocados em uma máquina de congelamento (KRYO 10 - Planer - EUA) para a realização do procedimento, seguindo-se o protocolo lento, primeiramente descrito por Newton *et al.* (1996). Inicialmente, a temperatura foi reduzida em 2°C por minuto até atingir a temperatura de -9°C, quando foi realizado o *seeding* e a temperatura foi mantida por 10 minutos. Em seguida, as rampas foram de: 3°C por minuto até -40°C e 10°C por minuto até atingir -140°C, quando os tubos foram levados para os *racks* e inseridos em nitrogênio líquido a -196°C, onde foram mantidos por quatro semanas (Geber *et al.*, 2002).

O descongelamento foi feito colocando-se os criotubos em banho-maria à temperatura de 37°C por 3 minutos em agitação. Os fragmentos dos ovários foram então, exaustivamente lavados em meio de cultura tamponado e colocados em novos tubos, em gelo.

Transplante após congelamento/descongelamento

No dia do descongelamento, isto é, quatro semanas após a exérese e congelamento do tecido ovariano, as ratas (grupo I) foram submetidas a uma nova laparotomia. Os fragmentos dos ovários descongelados foram então suturados na superfície peritoneal junto à bifurcação dos vasos epigástricos inferiores superficiais, da mesma forma descrita para as ratas do grupo II, e cada rata recebeu seus próprios ovários.

Indução da foliculogênese

Foi utilizado o FSH recombinante (Gonal F – Serono – Brasil) na dose de 15 UI, realizado no 15º dia após a cirurgia (dia 1 do ciclo estral) por via intramuscular, nas ratas dos grupos II e III. Para as ratas do grupo I, realizou-se o mesmo procedimento 15 dias após o transplante dos fragmentos dos ovários descongelados.

Exérese dos ovários e análise histológica

Os ovários de todas as 30 ratas foram removidos no quarto dia do ciclo estral estimulado (três dias após a administração do FSH), por laparotomia, e foram mantidos em formol, para posterior avaliação histológica. Os cortes de parafina foram realizados com espessura de 6µm e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

Foi realizada análise quantitativa e qualitativa dos fragmentos dos ovários, com avaliação do número e do estágio de desenvolvimento folicular com aumento de 400 vezes, em uma área de 1000µm X 1000µm, locada no centro da lâmina. Os folículos foram classificados como primários, quando possuíam uma camada de células da granulosa cubóides; como pré-antrais, quando tinham duas ou mais camadas de células da granulosa, mas não mostravam um antro folicular; e como antrais, quando a cavidade antral era observada (Oktay *et al.*, 1995).

Análise estatística

O cálculo amostral revelou a necessidade de análise de um mínimo de sete ratas por grupo, para detectar a diferença de 1,81 entre o número médio de folículos dos grupos, com poder de 80% e erro tipo I de 5%. Para a análise estatística foram utilizados os testes do qui-quadrado e a análise da mediana e dos intervalos interquartil (25–75), estes últimos devido à não-normalidade dos dados. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Um total de 30 ratas foi incluído neste estudo e não foram observados óbitos ou perdas durante a realização do mesmo. Em três ovários foi observada a formação de abscessos, sendo um em rata do grupo II e dois em ratas do grupo I. Todas foram excluídas da análise. Não houve diferença entre o peso das ratas dos três grupos, variando de 200 a 350g ($p = 0,432$). A idade das mesmas variou de 12 a 18 semanas, com média de 14,6 semanas.

Foram observados folículos em todos os estágios do desenvolvimento, nos três grupos estudados, e o grupos apresentaram o mesmo comportamento quanto à ocorrência de folículos, com predominância dos folículos antrais sobre os folículos primários ($p = 0,158$). Devido à não-normalidade dos dados, foi feita análise da mediana e dos intervalos interquartis p25 e p75 para os folículos encontrados em casa fase do desenvolvimento. Nessas análises, não se observou diferença entre os grupos em relação aos achados de folículos em todas as fases do desenvolvimento (Figuras 1, 2, 3).

O número de folículos encontrados, a partir da somatória de todos os campos analisados, nas 8 ratas do grupo I foi de 25; nas 9 ratas do grupo II foi de 28 e nas 10 ratas do grupo III foi de 31. Não foi observado diferença entre os três grupos, ($p=0,99$) (Tabela 1). Quando avaliamos o número de folículos em desenvolvimento, observado em cada ovário, o número variou de dois a cinco. Encontrou-se variação entre dois e cinco folículos no grupo I e entre dois e quatro nos grupos II e III, com medianas de 3,00 para os grupos I e II e de 3,50 para o grupo III (Figura 4).

Tabela 1. Número de folículos observado após indução da foliculogênese em ovários normais, transplantados e transplantados após congelamento/descongelamento

	Ratas	Folículos	Folículos/campo
Grupo I	8	25	3,13±1,13
Grupo II	9	28	3,11±0,78
Grupo III	10	31	3,10±0,99

(média±desvio padrão)

$p = 0,99$

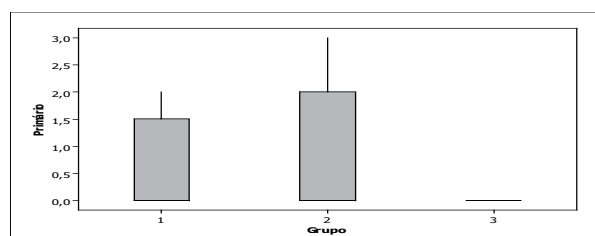


Figura 1 – Comparação entre o número de folículos primários em ovários normais, transplantados e transplantados após congelamento/descongelamento ($p = 0,62$)

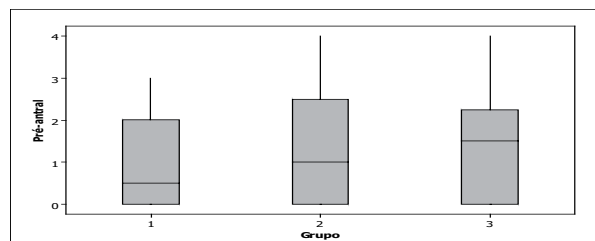


Figura 2 – Comparação entre o número de folículos pré-antrais em ovários normais, transplantados e transplantados após congelamento/descongelamento ($p = 0,71$)

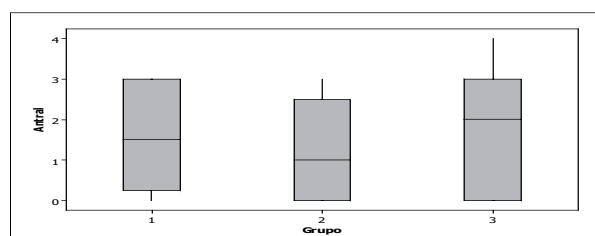


Figura 3 – Comparação entre o número de folículos antrais em ovários normais, transplantados e transplantados após congelamento/descongelamento ($p = 0,68$)

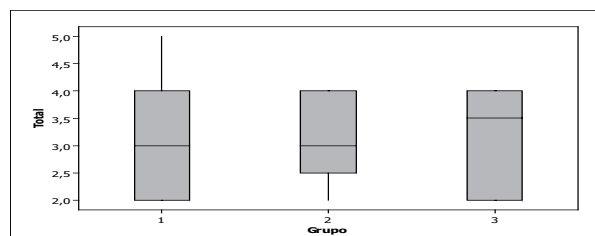


Figura 4 – Comparação entre o número de folículos em desenvolvimento em ovários normais, transplantados e transplantados após congelamento/descongelamento ($p = 0,99$)

DISCUSSÃO

A preservação do tecido ovariano para posterior utilização em ciclos de reprodução assistida representa importante alternativa na manutenção da capacidade reprodutiva em mulheres submetidas a tratamentos que têm como efeito adverso a castração. Muitas das pacientes com doenças malignas durante o período reprodutivo irão evoluir com a falência ovariana prematura, certamente aquelas submetidas à ooforectomia bilateral. Algumas abordagens visando à proteção ovariana tem sido propostas e variam conforme o tratamento utilizado (Prates & Geber, 2009).

No caso de ooforectomia bilateral, a alternativa de se criopreservar o tecido ovariano para posterior transplante, é uma opção que pode permitir o retorno da capacidade reprodutiva. Para isso, é fundamental que ocorra não apenas a sobrevivência do tecido ovariano criopreservado, mas que também ocorra o transplante com sucesso. A simplicidade do procedimento e sua viabilidade técnica foram demonstrados por Barros *et al.* (2008), em procedimento realizado com sucesso, sem reanastomose vascular, para a superfície peritoneal.

A técnica de congelamento ovariano tem sido proposta há alguns anos. Gosden *et al.* (1994) descreveram gestações em ovelhas após congelamento de fragmentos de ovários e posterior transplante. Candy *et al.*, (2000) demonstraram que os ovários congelados de macacas apresentavam retomada da foliculogênese depois de transplantados para camundongos imunodeficientes. Newton *et al.* (1996) comprovaram a viabilidade de se transplantarem fragmentos de ovários humanos congelados para camundongos imunodeficientes. Em 1997, Gunasena *et al.* obtiveram nascimentos de camundongos após transplante autólogo de ovários congelados. Prates *et al.*, (2009) demonstraram a manutenção da capacidade endócrina dos folículos em tecido ovariano transplantado para o peritônio de ratas após congelamento/descongelamento. A idade e o peso das ratas foi o mesmo em todos os grupos, não interferindo nos resultados observados. A presença de três casos de abscessos, não interferiu nos resultados, uma vez que as ratas acometidas foram excluídas do estudo. Como não ocorreram nos caos do grupo sem transplante, podemos inferir que tenha ocorrido em consequência à manipulação pois, embora em números absolutos estes sejam poucos (um caso nos transplantados a fresco e dois após o congelamento/descongelamento), os abscessos estiveram presentes nos casos de mais manipulação. Uma segunda explicação poderia estar ligada à inviabilidade desses ovários (necrose tecidual), secundária à perda de aporte sanguíneo. Importante lembrar que o tempo decorrido entre a exérese ovariana e o congelamento, somado ao tempo entre o descongelamento e o transplante, não foi superior a três horas em nenhum dos casos. Cleary *et al.* (2001) relatam a falta de influência nos índices de necrose ovariana quando o período em que o tecido ovariano ficasse sem aporte sanguíneo fosse inferior a três horas.

Nosso estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento folicular, em ovários congelados/descongelados e transplantados para a superfície peritoneal de ratas, após estímulo com FSH, e comparou, provavelmente pela primeira vez, o efeito com ovários transplantados e não congelados e ovários normais. A resposta ovariana ao estímulo com gonadotrofinas foi observada por Wang *et al.* (2002). Este estudo, foi realizado em camundongos, com o uso de hMG e apenas no grupo de estudo, sem se preocupar com o uso de grupo-controle, sem congela-

mento. Este fato pode ter criado viés no resultado, pois foram comparados diferentes grupos, isto é, com e sem indução.

Em humanos, Oktay & Sonmezer (2004), descreveram uma paciente submetida a transplante ovariano após congelamento/descongelamento, e obtiveram 20 óocitos em oito meses de indução com gonadotrofinas, sendo oito inseminados, dois fertilizados e um transferido, sem gravidez. Schmidt *et al.* (2005) induziram a foliculogênese em uma paciente, após transplante de ovário congelado/descongelado, e conseguiram dois embriões, que foram transferidos e não resultaram em gestação. Dolmans *et al.* (2009) descreveram 21 casos de punção folicular após indução com apenas 16 óocitos identificados sendo 10 em MII, cinco fertilizados com bom desenvolvimento embrionário, porém sem gravidez. Sanchez-Serrano *et al.*, (2010) relataram gravidez após transplante de ovário congelado/descongelado, seguido de indução da foliculogênese para fertilização *in vitro*.

Nossos resultados demonstraram que a resposta folicular ao estímulo com FSH em ovários de ratas congelados/descongelados e transplantados para o peritônio sem anastomose vascular é semelhante à obtida com os ovários *in locus* e aos transplantados para a superfície peritoneal sem congelamento. Esses resultados permitem sugerir a possibilidade de se realizar o procedimento de forma semelhante em mulheres submetidas à ooforectomia, mantendo-se sua capacidade reprodutiva. Mais ainda, eles poderão encorajar o desenvolvimento dos protocolos de transplante autólogo de tecido cortical ovariano, após congelamento/descongelamento, com mais possibilidades de obtenção de gestação.

Em resumo podemos concluir que a criopreservação, descongelamento e transplante do tecido ovariano de ratas, sem reanastomose vascular para o peritônio, não prejudicou o desenvolvimento folicular após a administração do hormônio foliculo-estimulante.

Correspondência:

Selmo Geber – Av. Contorno 7747 – Belo Horizonte – MG
selmogeber@origen.com.br - Tel 31 21026363

Referências Bibliográficas

- Agarwal A, Said TM. Implications of systemic malignancies on human fertility. *Reprod Biomed Online*. 2004; 6:673-9.
- Barros FV, Oliveira RM, Alves FMT, Sampaio M, Geber S. Successful ovarian autotransplant with no vascular reanastomosis in rats. *Transplantation*. 2008; 86:1628-30.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod*. 2000; 6:1300-4.
- Cleary M, Snow M, Paris M, Shaw J, Cox SL, Jenkin G. Cryopreservation of mouse ovarian tissue following prolonged exposure to an Ischemic environment. *Cryobiology*. 2001; 42:121-33
- Cooper M. Ethics and Laboratory animals. *Vet Rec*. 1985; 116: 594-5.
- Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum Reprod*. 2006; 21:2010-4.
- Dolmans MM, Donnez J, Camboni A, Demylle D, Amorim C, Van Langendonck A, Pirard C. IVF outcome in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2009 Nov;24(11):2778-87.
- Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, Iannascoli C, Gabusi E, Valeri B, Seracchioli R, Grigioni WF. Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol Oncol*. 2003; 89:259-66.
- Geber S, Sales L, Sampaio MAC. Laboratory techniques for

- human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2002; 5:211-8.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum. Reprod*. 1994; 9: 597-603.
- Gosden RG. Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2005; 34:60-63.
- Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum. Reprod*. 1997; 12: 101-6.
- Hovatta O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10:729-34.
- Howell SJ, Shalet SM. Fertility preservation and management of gonadal failure associated with lymphoma therapy. *Curr Oncol Rep*. 2002; 5:443-52.
- Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril*. 2006; 85:1-11.
- Lee RK, Ho HY, Yu SL, Lu CH. Blastocyst development after cryopreservation, and subcutaneous transplantation of mouse ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet*. 2005; 22:95-101.
- Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. *J Assist Reprod Genet*. 2003; 10:421-31.
- Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2005; 353:318-21.
- Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*. 1996; 11:1487-91.
- Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod*. 1995; 53:295-301.
- Oktay K, Sonmezer M. Ovarian tissue banking for cancer patients: fertility preservation, not just ovarian cryopreservation. *Hum. Reprod*. 2004; 19: 477-80.
- Prates LFVS, Alves FMT, Souza JHK, Geber S. Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento. *J Bras Reprod Assist*. 2008; 12:27-31.
- Prates LFVS, Geber S. Métodos de preservação da capacidade reprodutiva. *J Bras Reprod Assist*. 2009; 13:35-43.
- Ries LAG, Percy CL, Bunin GR: Introduction. In: Ries LAG, eds. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. National Cancer Institute, Bethesda; 1999. P. 1-15.
- Salle B, Lornage J, Franck M, Isoard L, Rudigoz RC, Guerin JF. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assessment. *Fertil. Steril*. 1998; 70: 124-8.
- Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escibá MJ, Simón C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril*. 2010; 93:11-3.
- Schmidt KL, Andersen CY, Loft A, Byskov AG, Ernst E, Andersen AN. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod*. 2005; 20:3539-46.
- Segino M, Ikeda M, Aoki S, Tokieda Y, Hirahara F, Sato K. In vitro culture of mouse GV oocytes and preantral follicles isolated from ovarian tissues cryopreserved by vitrification. *Hum Cell*. 2003; 16:109-16.
- Wang H, Mooney S, Wen Y, Behr B, Polan ML. Follicle development in grafted mouse ovaries after cryopreservation and subcutaneous transplantation. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187:370-4.

"Indução da ovulação nas pacientes más respondedoras: Uma revisão."

"Ovulation induction in poor responders: A review."

Luiz Eduardo Trevisan de Albuquerque¹, Fernanda Coimbra Miyasato², Gabriella Maciel Collier², Maria Cecília R M de Albuquerque³, Litsuko Shimabukuro⁴, Jacqueline Tiemi⁵

¹Diretor Médico

²Médico

³Embriologista chefe

⁴Embriologista

⁵Enfermeira

Centro de Reprodução Humana FERTIVITRO

Auxílios recebidos: nenhum

RESUMO

A hiperestimulação ovariana controlada é de suma importância para a realização das técnicas de alta complexidade como a Fertilização *in vitro*. Porém, nas pacientes más respondedoras, a indução da ovulação passa a ser um grande desafio, pois não é incomum o cancelamento do ciclo por falha da resposta ovulatória. Inúmeros protocolos de indução da ovulação são utilizados para atingirmos o sucesso nestas pacientes. Basicamente a hiperestimulação ovariana controlada pode variar quanto ao tipo e dosagens das gonadotrofinas, associados aos vários protocolos de utilização ou não de análogos agonista e/ou antagonista, e ainda medicamentos coadjuvantes que possam melhorar a resposta ovulatória.

O objetivo desta revisão bibliográfica foi mostrar os inúmeros protocolos de indução da ovulação disponíveis na literatura e tentar identificar protocolos realmente eficazes nas pacientes más respondedoras.

Palavras chaves: indução da ovulação; más respondedoras; gonadotrofinas, fertilização *in vitro*

ABSTRACT

Controlled ovarian hyperstimulation is very important for the realization of highly complex techniques such as *in vitro* fertilization. However, in poor responder patients, the induction of ovulation becomes a big challenge, therefore it is no uncommon the cycle cancellation due to failure in ovulatory response.

Numerous protocols for ovulation induction are used to achieve success in these patients. Basically the controlled ovarian hyperstimulation can vary in type and dosage of gonadotrofins, associated with the various protocols in use or not of agonist and /or antagonist analogs, and yet supporting medications that can improve ovulatory response.

The aim of this revised bibliography was to show the innumerable protocols of induction ovulation available in literature and to try to identify the most effective protocols in poor responders patients.

Key words: induction of ovulation; poor responders; gonadotrofins; *in vitro* fertilization

INTRODUÇÃO

A Hiperestimulação Ovariana Controlada (HOC) é considerada um procedimento importante para o sucesso no tratamento do casal infértil que será submetido às técnicas de Fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE), pois permite a recuperação de um número maior de óocitos de boa qualidade com capacidade de serem fertilizados e gerar bons pré-embriões para a transferência.

Porém, nas pacientes "más respondedoras", que correspondem segundo alguns autores de 9 a 24% das pacientes que realizam FIV, a HOC representa um grande desafio (Sunkara et al., 2007; Demiroglu & Gurgan, 2009). Vários protocolos com diferentes doses de gonadotrofinas têm sido sugeridos, mas infelizmente nenhum mostrou-se realmente efetivo e ideal na abordagem deste grupo de pacientes. Além disso, independente do protocolo utilizado, o resultado final, ou seja, taxa de nascidos vivos, é muito menor quando comparamos com as pacientes "normorespondedoras" (Tarlitzis et al., 2003; Ubaldi et al., 2004; Manno et al., 2009).

Portanto, o objetivo desta revisão realizada nas bases de dados Medline e Lilacs, utilizando-se os termos: indução da ovulação; más respondedoras; gonadotrofinas, fertilização *in vitro*, até o ano de 2009, foi mostrar os inúmeros protocolos disponíveis na literatura e tentar identificar aqueles realmente eficazes nas pacientes más respondedoras.

GONADOTROFINAS

Altas doses:

Quando iniciamos doses padrões de gonadotrofinas entre 150 a 300 UI/dia, e nos deparamos com uma falha no crescimento multifolicular, logo pensamos em um próximo ciclo de tratamento, aumentar a dose. Porém, vários autores mostram tanto em estudos prospectivos como retrospectivos, que dose superior a 450UI/ dia é ineficaz tanto em aumento da resposta ovariana, quanto nas taxas de gestação, além do inconveniente de poder cursar com mais efeitos colaterais e custo mais elevado (Van Hoof et al., 1993; Karande et al., 1990; Land et al., 1996; Siristatidis & Hamilton, 2007; Berkanoglu & Ozgur, 2009). Apenas um estudo publicado em 1989, mostrou um aumento nas taxas de gravidez e redução nas taxas de cancelamento ao aumentar a dose diária

de 300UI para 450UI (Hofmann et al., 1989). Estudos mostram que estas pacientes parecem apresentar uma redução da reserva ovariana, sendo que o resultado será, na maioria das vezes, pobre, independente da dose diária administrada, e que as taxas de gravidez são inversamente correlacionadas à quantidade de gonadotrofinas utilizadas (Karande et al., 1990; Land et al., 1996).

FSH recombinante(FSHr) versus FSH de origem urinária(FSHu):

Alguns autores sugerem o uso de cada um deles com o objetivo de melhorar a resposta ovariana, porém, em apenas dois trabalhos publicados com um número muito pequeno de casos reportam um melhor resultado com o uso de FSHr (Raga et al., 1999; De Placido et al., 2000). Entretanto, um estudo prospectivo e randomizado utilizando protocolo longo, mostrou não haver diferença nas taxas de gravidez e taxa de abortamento, havendo somente um melhor custo-benefício ao utilizar o FSHu (Mohamed et al., 2006).

FSH iniciando na fase lútea média:

O recrutamento e seleção dos folículos pré-antrais ocorre na fase lútea média do ciclo anterior ao ciclo estimulado. Frente a este fato, alguns autores sugerem iniciar a utilização de gonadotrofinas em torno do 23º dia do ciclo anterior. Infelizmente, dois estudos prospectivos randomizados não mostraram diferença significativa nos resultados avaliados, ou seja, taxa de cancelamento, número de oócitos recuperados e doses de gonadotrofinas administradas (Rombauts et al., 1998; Kansal et al., 2008). Entretanto, um estudo preliminar mostrou melhor resposta folicular analisando apenas cinco pacientes, e tendo estas como próprio grupo controle (Kalra et al., 2006). Outro estudo, prospectivo, randomizado, mais recente, comparou o início do FSHr junto com o agonista do GnRH em protocolo longo versus iniciando a gonadotrofina no segundo dia do ciclo, e obteve melhores resultados quando iniciou na fase lútea, obtendo maior número de oócitos maduros (6,8 vs 3,2) e maior taxa de gravidez (38% vs 15%) (Kucuk et al., 2008). Acreditamos portanto, serem necessários estudos mais amplos para confirmarmos tais observações.

ANÁLOGOS AGONISTAS DO GnRH

Está claro que a utilização dos análogos agonistas do GnRH em pacientes "normorespondedoras" submetidas a HOC traz inúmeros benefícios, pois diminui as taxas de cancelamento, aumenta o número de folículos pré-ovulatório, assim como a quantidade de oócitos recuperados, gerando um aumento do número de pré-embriões de boa qualidade a serem transferidos (Tarlitzis et al., 2003). Porém, em pacientes "más respondedoras" ainda não estão claros estes benefícios, pois alguns pesquisadores mostram que o agonista do GnRH parece ter uma ação direta no tecido ovariano modulando a esteroidogênese e maturação oocitária, sendo que em algumas situações poderia causar uma excessiva supressão gonadal levando a uma redução ou ausência de resposta folicular (Yashimura et al., 1992; Kowalik et al., 1998). Uma vez optando pelo protocolo longo com agonista do GnRH para "más respondedoras", temos as seguintes opções:

1. Protocolo longo com redução da dose:

Manutenção do protocolo longo de Análogo agonista do GnRH, reduzindo a dose pela metade antes de iniciar as gonadotrofinas. Teria o objetivo de reduzir o efeito do análogo agonista nos receptores ovarianos e manter a supressão hipofisária (Olivennes et al., 1996; Feldberg et al., 1994). Em trabalho comparando o protocolo citado

acima (iniciando com 100 µg até a supressão hipofisária e passando para 50 µg ao iniciar as gonadotrofinas) ao protocolo "flare up" (início do análogo agonista do GnRH nos primeiros dias do ciclo menstrual), mostrou diferença estatisticamente significativa, tanto um número maior de oócitos recuperados, como um aumento nas taxas de implantação e gestação no grupo do protocolo longo (Ariel et al., 2003). Outro estudo descritivo, retrospectivo, mostrou que os agonistas usados na fase lútea ou protocolos microdoses são escolhidos com menor frequência, mas que podem ser uma boa opção nas pacientes más respondedoras. (Reh et al., 2008)

2. Protocolo longo com parada ("GnRH agonist stopped"):

Manutenção do protocolo longo utilizando uma dose menor de Análogo do GnRH parando no primeiro dia do ciclo ou no primeiro dia de gonadotrofina. Assim é possível reduzir o provável efeito de inibição direta do Análogo do GnRH nos receptores gonadais (Yashimura et al., 1992; Kowalik et al., 1998; Latouche et al., 1989), e provocar uma menor supressão hipofisária, porém, ainda suficiente para impedir o pico precoce do LH durante a fase folicular (Smits et al., 1992). Pelo fato de parar precocemente o análogo agonista do GnRH, a incidência de pico precoce do LH é baixa mas não ausente, tornando os resultados contraditórios.

Com a utilização deste protocolo, vários estudos prospectivos, mas não randomizados, mostram uma menor quantidade de gonadotrofinas utilizadas, e um aumento no número tanto de oócitos recuperados quanto de gravidez clínica (Faber et al., 1998; Pinkas et al., 2000; Schachter et al., 2001; Pu-Tsui et al., 2002). Por outro lado, dois estudos prospectivos e randomizados mostraram não haver diferença estatística nos resultados avaliados entre os grupos estudados (Dirnfeld et al., 1999; Garcia-Velasco et al., 2000).

3. Protocolos utilizando o "Flare-up" com análogos agonista do GnRH:

Este protocolo pode ser subdividido em dois tipos: Curto e Ultra-curto. No primeiro inicia-se o análogo agonista do GnRH no início do ciclo, juntamente com a administração das gonadotrofinas, mantendo o análogo até o dia do hCG. Já no Ultra-curto o início é igual, porém se interrompe o análogo após 3 a 4 dias (Howles et al., 1987; Marcus et al., 1993). Os objetivos são de diminuir a supressão ovariana e aproveitar a liberação inicial das gonadotrofinas endógenas provocada pela ação do análogo agonista do GnRH ("Flare-up").

Outros protocolos surgiram daí, utilizando-se uma redução da dose, seja desde o início do ciclo ou seja após 3 a 4 dias do início da administração das gonadotrofinas, com a finalidade de diminuir mais ainda a supressão ovariana e portanto aumentar a ação das gonadotrofinas no parênquima ovariano. Além disso, a microdose do agonista do GnRH nos protocolos "flare-up" foram testados com o objetivo de liberar o pico endógeno de gonadotrofinas sem o fenômeno de aumento do LH, androgênios e progesterona, já reportado nos protocolos clássicos "flare-up" (Scott et al., 1993; Deaton et al., 1996). Pelo menos teoricamente, seria o protocolo mais recomendado para as pacientes com baixa resposta ovulatória.

Trabalhos que compararam os protocolos longos com os curtos não mostraram diferença estatística nas taxas de nascimento, e por isso, recomendam os protocolos curtos por serem economicamente mais acessíveis. (Ho et al., 2008). Estudo mais recente, porém, sugere que o protocolo "flare-up" com agonista tem melhores taxas de gravidez e implantação que o antagonista, provavel-

mente por melhorar a qualidade oocitária e embrionária (Manno et al., 2009).

3.1 Protocolos "Flare-up" com doses padrões:

Infelizmente não há trabalho prospectivo e randomizado que avalie o protocolo "Flare-up". Nos poucos trabalhos prospectivos não randomizados e retrospectivos publicados, os resultados mostram uma taxa menor de cancelamento e maior de gestação (Howles et al., 1987; Padilla et al., 1996; Toth et al., 1996; Yarali et al., 2009). Porém, outros autores não conseguiram confirmar estes dados, mostrando não haver benefícios na utilização dos protocolos "Flare-up" clássicos (Karande et al., 1997). Uma revisão retrospectiva mais recente compara o protocolo "Flare-up" com antagonista, obtendo-se resultados de gravidez e nascidos vivos similares. (Berin et al., 2009). Novo trabalho prospectivo, randomizado, que compara o protocolo "Flare-up" agonista com o antagonista, também não mostrou diferenças estatísticas quanto a taxa de gravidez, fertilização, implantação, assim como, número de oócitos maduros, tempo de estimulação e doses de gonadotrofinas (Lainas et al., 2008).

3.2 Protocolos "Flare-up" com doses reduzidas:

Chamados de "mini" ou "micro" dose "flare-up" de análogo agonista, os trabalhos não randomizados publicados mostram doses diárias reduzidas muito diferentes (80 µg, 40 µg e 20 µg). Em comum, mostram um resultado melhor quanto às taxas de cancelamento e principalmente às taxas de gestação. (Schoolcraft et al., 2008) Embora grande otimismo tenha sido despertado, um trabalho retrospectivo comparando micro-dose "flare-up" com protocolo longo de fase lútea com diminuição da dose do GnRH agonista, mostrou um aumento nas taxas de cancelamento, baixas taxas de gestação e diminuição do número de oócitos recuperados por ciclo (Leondires et al., 1999).

Embora os resultados mostrem uma tendência de melhores resultados com este protocolo, é necessário um maior número de trabalhos prospectivos e randomizados com um grande número de pacientes para confirmarmos tal tendência (Loutradis et al., 2008).

Kahraman e cols mostraram em estudo prospectivo e randomizado, taxa de gravidez por ciclo maior no grupo micro-dose "flare-up" quando comparado ao protocolo com antagonista, 14,2% vs 9,5%, mas sem diferença estatística. (Kahraman et al., 2009) Porém, Demirel e Gurgan obteve resultados melhores no grupo "flare-up" micro-dose quanto ao número de oócitos recuperados e qualidade embrionária, destacando um menor uso de gonadotrofinas administradas. (Demirel & Gurgan, 2009)

ANÁLOGOS ANTAGONISTAS DO GnRH:

Com a recente utilização dos antagonistas do GnRH como bloqueadores do pico endógeno de LH, surgiu um interesse na utilização em "más respondedoras". Tal fato se deve ao mecanismo de ação deste medicamento, ou seja, a supressão imediata na liberação das gonadotrofinas endógenas através do bloqueio dos receptores pituitários do GnRH. Na teoria, os antagonistas do GnRH se mostram extremamente atrativos, pois sua administração ocorre somente após o recrutamento folicular, ou seja, na fase folicular média, minimizando, portanto, o impacto do análogo no recrutamento folicular e reduzindo também as taxas de cancelamento (Mahutte & Arici, 2007; Demirel & Gurgan, 2009).

A primeira publicação sobre a utilização dos antagonistas do GnRH em pacientes "más respondedoras" surgiu em 1999, num estudo prospectivo não randomizado, utilizando um protocolo de indução combinando Citra-

to de Clomifeno e Gonadotrofinas, tendo como grupo controle as próprias pacientes que utilizaram em ciclos prévios protocolos com agonista. Houve uma modesta diminuição nos ciclos cancelados, aumento do número de oócitos recuperados e diminuição da quantidade de gonadotrofinas utilizadas (Craft et al., 1999; Sun & Zhu, 2009). Em outro estudo, retrospectivo, pacientes tratadas com GnRH antagonista tiveram um menor consumo de gonadotrofinas e menor duração do ciclo de tratamento quando comparadas ao ciclo prévio (Nikolettos et al., 2001). Estudo mais recente, prospectivo não randomizado do mesmo autor comparou protocolo "flare-up" ao antagonista, mostrando um número de oócitos recuperados, taxa de implantação, taxa de gravidez por ciclo e por transferência iguais, ou seja, não tiveram diferença estatística. Neste grupo de pacientes, embora um dia a menos de gonadotrofina fora utilizada no grupo com antagonista, este também mostrou uma taxa de cancelamento maior (Mohamed et al., 2005). Porém existem trabalhos com resultados diferentes, como o realizado por Yarali em 2009, que realizou um estudo retrospectivo, caso-controle e demonstrou taxa de fertilização e qualidade embrionária melhor no grupo dos antagonistas. (Yarali et al., 2009)

Em estudo prospectivo randomizado comparando antagonista com protocolo sem supressão hipofisária, mostrou uma forte tendência a melhores taxas de implantação (13% vs. 3%) e gravidez (20% vs. 6%) no grupo com antagonista, porém, devido ao número pequeno não foi possível alcançar significância estatística (Akman et al., 2000).

Estudo prospectivo randomizado comparando antagonista com protocolo microdose "flare-up", mostrou melhor resultado quanto número de oócitos recuperados no grupo "flare-up", mas sem diferença quanto as taxas de implantação e gestação (Akman et al., 2001). Outro estudo também prospectivo e randomizado não mostrou diferença estatística nos grupos estudados, tanto no número de oócitos quanto nos outros dados avaliados (Schmidt et al., 2005). Revisão sistemática e meta-análise publicada recentemente mostra resultados concordantes com os estudos de Akman e Schmidt.

Os maiores estudos prospectivos randomizados comparando antagonista com protocolo longo clássico com agonista, não obtiveram diferença estatística em todos os resultados avaliados, mostrando apenas uma tendência a uma diminuição dos dias de indução assim como de gonadotrofinas utilizadas nos ciclos com GnRH antagonista (Cheung et al., 2005; Tazegul et al., 2008).

Com o objetivo de provocar uma maior sincronização ao crescimento folicular, foi desenvolvido um novo protocolo chamado "CRASH", onde se utiliza análogo antagonista do GnRH (3mg) na fase lútea do ciclo anterior ao ciclo de tratamento, seguindo o protocolo padrão durante a indução da ovulação com antagonista 0,25mg/dia iniciado quando o maior folículo medisse 14 mm. Segundo o autor os resultados de taxa de implantação e gestação foram comparáveis aos resultados das pacientes "normo-respondedoras" (Humaidan et al., 2005).

ANÁLOGO AGONISTA + ANTAGONISTA DO GnRH:

Para aproveitar o "flare-up" causado pelo análogo agonista do GnRH e a supressão imediata do LH pelo análogo antagonista, alguns autores mostraram benefícios em associar os dois tipos de análogos em um único protocolo para ciclos de Fertilização in vitro em pacientes "más respondedoras".

Estudo observacional coorte retrospectivo analisando 97 pacientes que tiveram falha de dois ou mais ciclos de FIV, tratou-as com protocolo Agonista-Antagonista (AAP – Agonist-Antagonist Protocol), ou seja, após uso de anti-

concepcional oral por 21 dias administrou-se no 24º dia uma microdose de agonista do GnRH seguidos por 5 dias. No 26º iniciou-se a administração de gonadotrofinas. O antagonista do GnRH (acetato de Cetrorelix – 3mg) foi administrado quando o maior folículo se encontrava medindo 13-14 mm. O autor mostrou uma taxa de gravidez clínica de 13,4% (Berger et al., 2005).

Em estudo prospectivo não randomizado tendo como grupo controle as próprias pacientes que falharam em ciclos anteriores de tratamento, um protocolo combinado de agonista do GnRH por 3 dias iniciando no primeiro dia do fluxo menstrual, ao antagonista do GnRH dose diária iniciando quando o maior folículo chegava a 14 mm até o dia do hCG. Os resultados mostraram não haver diferença estatística quanto ao número de ampolas de gonadotrofinas utilizadas, nível de estradiol e de progesterona e taxa de fertilização, porém, foi significativamente maior o número de folículos maiores de 14 mm no dia do hCG, número de oócitos recuperados e número de embriões transferidos. Cinco gravidezes (14,3%) foram relatadas neste trabalho, sendo duas bioquímicas, duas em andamento e uma nascida (Orvieto et al., 2007).

Outro estudo, retrospectivo comparando dois grupos: protocolo curto com microdose “flare-up”, ao protocolo ultracurto microdose “flare-up” associado ao análogo antagonista do GnRH em dose diária, mostrou um maior nível de estradiol, maior número de oócitos maduros e fertilizados e maiores taxas de gestação no grupo agonista-antagonista (Erden et al., 2005).

MEDICAMENTOS ADJUVANTES AOS PROTOCOLOS DE INDUÇÃO:

Hormônio do crescimento (GH):

Tem o objetivo de aumentar o efeito das gonadotrofinas exógenas no tecido ovariano. O GH provavelmente modula a ação do FSH nas células da granulosa, que por sua vez estimula a liberação do fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) (Davoren & Hsueh, 1986; Hsu & Hammond, 1988; Barrica et al., 1993). O IGF-I aumenta o efeito do FSH tanto nas células da granulosa como nas células da teca (Adashi et al., 1985; Jia et al., 1986). Infelizmente, vários estudos prospectivos randomizados e controlados falharam em demonstrar algum real benefício no uso do GH como terapia adjuvante à estimulação ovariana nas pacientes “más respondedoras” (Shaller et al., 1992; Levy et al., 1993; Suikkari et al., 1992).

Revisão Sistemática da Cochrane recentemente concluiu que a terapia adjuvante com GH não mostrou diferença estatística nos resultados avaliados, não havendo benefício como terapia adjuvante nas “más respondedoras” (Kotarba et al., 2002). Trabalho mais recente, prospectivo randomizado, obteve os mesmos resultados. (Kucuk et al., 2008)

Meta-análise publicada em 2009 mostrou evidências que a adição do GH aumenta a probabilidade de gravidez clínica em 16% e de nascidos vivos em 17% em más respondedoras sob estimulação com análogo do GnRH e gonadotrofinas. Porém, o número total de pacientes estudadas era pequeno e o próprio autor acha necessário a realização de mais trabalhos para comprovar os seus resultados. (Kolibianakis et al., 2009).

Deidroepiandrosterona (DHEA):

É substrato essencial para a esteroidogênese. Por ser precursor metabólico na produção de esteróides, níveis baixos diminuem a produção de androstenediona, testosterona e estradiol. Também chamado de pré-hormônio em quase 50% da testosterona produzida, sua falta pode comprometer diretamente a esteroidogênese ovariana, por ser a testosterona o pré-hormônio do estradiol. A

DHEA pode ainda aumentar os níveis de IGF-I e suprimir a apoptose, conseqüentemente aumentando a ação do FSH e a resposta ovariana. (Barad & Gleicher 2006; Casson et al., 2000)

É possível que a utilização da DHEA possa simular um estado de ovário micropolicístico, pois nesses casos observa-se níveis anormais de fator de crescimento e aumento nos níveis de LH. (Barad & Gleicher 2005; Barad & Gleicher 2006)

A máxima efetividade na função ovariana é atingida após 4 meses de sua utilização. Como efeitos adversos, porém incomuns, cita-se o aparecimento de acne, engrossamento da voz e aparecimento de pelos em face. Efeitos do seu uso prolongado permanecem obscuros. (Barad & Gleicher 2006) Dois estudos demonstraram aumento no número de oócitos e embriões, melhora na qualidade embrionária, na taxa cumulativa de gravidez, baixas taxas de aneuploidias, redução na dose de gonadotrofinas e uma importante redução na taxa de cancelamento por ciclo de 32% para 4% após o tratamento. (Casson et al., 2000; Barad & Gleicher 2007)

L-Arginina

A utilização via oral teria o objetivo de aumentar o fluxo sanguíneo ao útero e ao ovário, aumentando assim a resposta ovariana às gonadotrofinas nas “más respondedoras”. O primeiro relato da sua utilização foi promissor, com melhora na resposta ovariana, receptividade endometrial e taxa de gestação. Porém, o mesmo autor três anos depois publicou trabalho no qual a L-arginina poderia ser prejudicial a qualidade embrionária e taxa de gestação em ciclos com HOC (Battaglia et al., 2000).

Anticoncepcional hormonal (ACO) pré -FIV:

O ACO desde a fase lútea média do ciclo anterior ao ciclo de indução da ovulação tem como objetivo provocar uma supressão tanto hipotalâmica como às gonadotrofinas (Klein & Mishell, 1977; Benadiva et al., 1988). Tal efeito parece ser benéfico nas “más respondedoras” pois poderia eliminar possível efeito do corpo-lúteo residual e restabelecer a sensibilidade do FSH exógeno no tecido ovariano (Al-Mizzen et al., 2000).

Apenas um estudo prospectivo com o objetivo de avaliar as alterações endócrinas causadas pelo uso do ACO mostra que, nos ciclos que utilizam do protocolo “flare-up”, tanto FSH quanto LH aumentam após a administração do agonista do GnRH. Proporcionalmente, porém, houve uma menor elevação do LH, o que o autor vê como benéfico, pois reduz a possibilidade de ocorrer um aumento precoce dos androgênios intra-folicular, com melhor microambiente folicular (Keltz et al., 2007). Estudo retrospectivo, comparando o uso do ACO seguido de antagonista, mostrou um aumento da necessidade de maiores doses de gonadotrofinas (Bendikson et al., 2006).

Estradiol pré-FIV:

A administração na fase lútea média resulta em uma redução do tamanho dos folículos pré-antrais, assim como a heterogeneidade destes na fase folicular precoce, provavelmente causada pela supressão do FSH (Fanchin et al., 2003; Fanchin et al., 2003; Fanchin et al., 2003). Estudo retrospectivo coorte-pareado, realizado em “más respondedoras”, mostrou que a utilização do estradiol na fase lútea média tanto em protocolo com microdose “flare-up” como em protocolo com antagonista, mostrou um maior número de oócitos recuperados e melhor qualidade embrionária. Embora tal estudo não mostre uma diferença estatística em relação à taxa de gravidez, foi observada uma tendência para o aumento da taxa de gravidez, necessitando portanto estudos com maior número de casos para se confirmar tal tendência (Frattelli et al., 2007).

Outros trabalhos que além do estradiol utilizaram o análogo antagonista na fase lútea média, também reportaram resultados com diminuição das taxas de cancelamento, aumento da resposta folicular com menor heterogeneidade e aumento na taxa de gravidez (Dragisic et al., 2005; Srouji et al., 2005).

Bromocriptina

Sua utilização durante o ciclo anterior ao ciclo de tratamento, parando no início da HOC, provocaria efeito rebote, ocasionando um aumento na concentração sérica da prolactina. Tal efeito, como demonstrado anteriormente, melhoraria o recrutamento folicular e por consequência o número de folículos nos tratamentos de FIV (Jinno et al., 1996). Os autores concluíram, em "normorespondedoras", que houve melhora na qualidade dos embriões, resultando em aumento significativo na taxa de gravidez. Estudo prospectivo não randomizado em "más respondedoras", mostrou-se eficaz, melhorando o recrutamento folicular e o desenvolvimento embrionário, resultando em aumento da taxa de fertilização e gravidez (Franco & Sala, 2004). Infelizmente o estudo citado refere-se a apenas 10 pacientes, necessitando, portanto, estudos com um maior número de pacientes.

Citrato de Clomifene (CC) e baixas dosagens de Gonadotrofinas

objetivo da utilização de protocolos com CC e baixas doses de gonadotrofinas, combinado ao antagonista do GnRH, é tentar diminuir o efeito desnecessário das altas doses de gonadotrofina, pois o problema parece estar na reserva ovariana (Karande et al., 1990; Land et al., 1996). Um estudo comparou ciclo natural com baixa estimulação ao ciclo com CC e gonadotrofinas combinado ao análogo antagonista do GnRH, mostrando uma tendência à maior taxa de gravidez quando transferidos dois ou mais embriões (Hur et al., 2005).

Inibidor da Aromatase (IA)

O objetivo do IA (Letrozol) é aumentar a resposta das gonadotrofinas, pois age bloqueando a síntese de estradiol, provocando assim um efeito de "feedback" negativo nas células gonadotróficas. Como consequência, incrementa a secreção das gonadotrofinas endógenas e talvez aumente a resposta ovariana às gonadotrofinas exógenas nas HOC (Mitwally & Casper, 2002; Mitwally & Casper, 2004; Healy et al., 2003).

Com o IA em combinação com gonadotrofinas, associado ao antagonista do GnRH, embora alguns autores tenham mostrado haver um aumento nas taxas de implantação, não houve aumento nas taxas de gestação (Moreno et al., 2004; Garcia-Velasco et al., 2005). Porém, em estudo prospectivo controlado, aprovado e em fase de publicação, comparando protocolo antagonista + Letrozol ao protocolo microdose "flare-up", não se confirmou os dados dos estudos anteriores, portanto, não foi recomendada a utilização do Letrozol para pacientes "más respondedoras" (Schoolcraft et al., 2007).

Lembrar que recente controvérsia colocou em dúvida a segurança do IA nas inférteis, podendo causar um aumento do risco de defeito congênito (Biljan et al., 2005). Por outro lado, um estudo comparando Letrozol ao CC não mostrou diferença quanto às malformações menores e maiores entre os dois grupos estudados (Tulandi et al., 2006).

Correspondência

Luiz Eduardo Trevisan de Albuquerque
Av. Indianópolis 843, B. Moema
São Paulo – SP – Brasil.

CEP: 04063-001

Tel.: (0xx11) 50812031

Fax: (0xx11) 50812031

Email: leta@osite.com.br

Referências Bibliográficas

Adashi E, Resnick C, D'Erole J et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Reviews* 1985;6:400-20.

Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum Reprod* 2000 Oct; 15(10): 2145-47.

Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Comparison of agonistic flare-up-protocol and antagonistic multiple dose protocol in ovarian stimulation of poor responders: results of a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2001 May;16: 868-70.

Al-Mizyen E, Sabatini L, Lower AM, Wilson CMY, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. Does pretreatment with progestogen or oral contraceptive pills in low responders followed by the GnRH flare protocol improve the outcome of IVF-ET? *J Assist Reprod Genet* 2000 Mar; 17(3):140-6.

Barad DH, Gleicher N. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone. *Fertil Steril* 2005 Sep; 84 (3): 756.

Barad DH, Gleicher N. Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Hum Reprod* 2006 Nov; 21 (11): 2845-49.

Barad D, Brill H, Gleicher N. Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J Assist Reprod Genet* 2007 Dec; 24(12): 629-34.

Barreca A, Artini P, Del Monte P et al. In vivo and in vitro effect of growth hormone on estradiol secretion by granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 Jul; 77(1):61-7.

Battaglia C, Genazzani AD, Regnani G, Primavera MR, Petraglia F, Volpe A. Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders. *Fertil Steril* 2000 Oct; 74(4): 809 -12.

Benadiva CA, Ben-Rafael Z, Blasco L, Tureck R, Mastroianni L Jr, Flickinger GL. Ovarian response to human menopausal gonadotropin following suppression with oral contraceptives. *Fertil Steril* 1988 Sep; 50(3): 516-8.

Bendikson K, Milki AA, Speck-Zulak A, Westphal LM. Comparison of GnRH antagonist cycles with and without oral contraceptive pretreatment in potential poor prognosis patients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006; 33(3): 145-7.

Berger BM, Ezcurra D, Alper MM. The Agonist-Antagonist Protocol: A novel protocol for treating the poor responder. *Fertil Steril* 2005;82:S126.

Berin I, Stein DF, Keltz MD. A comparison of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare protocols for poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009 Jan 6. Article in press.

Berkkanoglu M, Ozgur K. What is the optimum maximal gonadotropin dosage used in microdose flare-up cycles in poor responders? *Fertil Steril* 2009 Apr 13. Article in press.

Biljan M, Hemmings R, Brassard N. The outcome of 150 babies following the treatment with letrozole or letrozole and gonadotropins. *Fertil Steril* 2005; 84(Suppl 1):S95 (abstract).

Casson PR, Lindsay MS, Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Human Reprod* 2000 Oct; 15 (10): 2129-32.

Cheung LP, Lam PM, Lok IH, Chiu TT, Yeung SY, Tjer CC, et al. GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005 Mar; 20(3): 616-21.

Craft I, Gorgy A, Hill J, Menon D, Podsiadly B. Will GnRH antagonists provide new hope for patients considered "difficult responders" to GnRH agonist protocols? *Hum Reprod* 1999 Dec; 14(12): 2959-62.

Davoren J, Hsueh A. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinol* 1986 Feb; 118(2): 888-90.

- Deaton J, Baugness P, Huffman C, Miller K. Pituitary response to early follicular phase minidose gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) therapy: evidence for a second flare. *J Assist Reprod Genet* 1996 May; 13(5): 390-4.
- Demiroglu A, Gurgan T. Comparison of microdose flare-up and antagonist multiple-dose protocols for poor-responder patients: a randomized study. *Fertil Steril* 2009 Aug; 92 (2): 481-5.
- De Placido G, Alviggi C, Mollo A et al. Recombinant FSH is effective in poor responder patients to highly purified FSH. *Hum Reprod* 2000;15:17-20.
- Dirnfeld M, Fruchter O, Yshai D, Lissak A, Ahdut A, Abramovici H. Cessation of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-a) upon down-regulation versus conventional long GnRH-a protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999 Sep; 72(3): 406 -11.
- Dragisic KG, Davis OK, Fasoulitis SJ, Rosenwaks Z. Use of a luteal estradiol patch and a gonadotropin-releasing hormone antagonist suppression protocol before gonadotropin stimulation for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril* 2005 Oct; 84(4): 1023-6.
- Erden HF, Akman MA, Bayazit N, Bahceci M. Efficacy of a New Agonist-Antagonist Protocol Compared To Microdose Flare-up in Poor Responder IVF Patients. *Fertil Steril* 2005; 84: (Suppl) 128-9.
- Faber BM, Mayer J, Cox B, Jones D, Toner JP, Oehninger S, Muasher SJ. Cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined with high-dose gonadotropin stimulation yields favorable pregnancy results in low responders. *Fertil Steril* 1998 May; 69(5): 826-30.
- Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Righini C, de Ziegler D, Frydman R. Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2003 Mar; 79(3): 585-9.
- Fanchin R, Cunha-Filho JS, Schonauer LM, Kadoch IJ, Cohen-Bacri P, Frydman R. Coordination of early antral follicles by luteal estradiol administration provides a basis for alternative controlled ovarian hyperstimulation regimens. *Fertil Steril* Feb 2003; 79(2): 316-21.
- Fanchin R, Salomon L, Castelo-Branco A, Olivennes F, Frydman N, Frydman R. Luteal estradiol pre-treatment coordinates follicular growth during controlled ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2003 Dec; 18(12): 2698-703.
- Feldberg D, Farhi J, Ashkenazi J, Dicker D, Shalev J, Ben-Rafael Z. Minidose gonadotropin-releasing hormone agonist is the treatment of choice in poor responders with high follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1994 Aug; 62(2): 343-6.
- Franco RC, Sala MM. Uso da bromocriptina associado a hiperestimulação ovariana controlada em pacientes más respondedoras. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2004 Jun; 26 (5): 405-10.
- Franco JGJ, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Felipe V, Cornicelli J, et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor responders: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006 Nov; 13(5): 618-27.
- Frattarelli JL, Hill MJ, McWilliams GDE, Miller KA, Bergh PA, Scott Jr RT. A luteal estradiol protocol for expected poor-responders improves embryo number and quality. *Fertil Steril* 2008 May; 89(5): 1118-22.
- Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martinez-Salazar FJ, Landazabal A, Remohi J, et al. High doses of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2000 Nov; 15(11): 2292-6.
- Garcia-Velasco J, Moreno L, Pacheco A, Guillén A, Duque L, Requena A, et al. The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005 Jul; 84(1): 82-7.
- Healy S, Tan S, Tulandi T, Biljan M. Effects of letrozole on superovulation in women undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2003 Dec; 80(6): 1325-9.
- Hofmann G, Toner J, Muasher S, Jones G. High-dose follicle-stimulating hormone (FSH) ovarian stimulation in low-responder patients for in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989 Oct; 6(5): 285-9.
- Ho CH, Chen SU, Peng FS, Chang CY, Lien YR, Yang YS. Prospective comparison of short and long agonist protocols using recombinant gonadotrophins for IVF/ICSI treatments. *Reprod Biomed Online* 2008 May; 16(5): 632-9.
- Howles CM, Macnamee MC, Edwards RG. Short term use of an LHRH agonist to treat poor responders entering an IVF programme. *Hum Reprod* 1987 Nov; 2(8): 655-6.
- Hsu C, Hammond J. Concomitant effects of growth hormone on secretion of insulin-like factor I and progesterone by cultured porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinol* 1988; 120:198-207.
- Humaidan P, Bungum L, Bungum M, Hald F, Agerholm I, Blaabjerg J, Yding Andersen C, Lindenberg S. Reproductive outcome using a GnRH antagonist (cetorelix) for luteolysis and follicular synchronization in poor responder IVF/ICSI patients treated with a flexible GnRH antagonist protocol. *Reprod Biomed Online* 2005 Dec; 11(6): 679-84.
- Hur C, Lee W, Lim J. Outcome of Minimal Stimulation IVF With Short-Term Application of GnRH Antagonist and Low Dose Gonadotropins in Natural Cycle and Cycle Using Clomiphene Citrate in Poor Responders. *Fertil Steril* 2005; 84: (Suppl) 325.
- Jia N, Kalmijn J, Hseuh A. Growth hormone enhances FSH induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinol* 1986 Apr; 118(4): 1401-9.
- Jinno M, Yoshimura Y, Ubukata Y, Nakamura Y. A novel method of ovarian stimulation for in vitro fertilization: bromocriptine-rebound method. *Fertil Steril* 1996 Aug; 66(2): 271-4.
- Kahraman K, Berker B, Atabekoglu CS, Sonmezer M, Cetinkaya E, Aytac R, et al. Microdose gonadotropin-releasing hormone agonist flare-up protocol versus multiple dose gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in poor responders undergoing intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer cycle. *Fertil Steril* 2009 Jun; 91(6): 2437-44.
- Kalra SK, Gracia CR, Martino L, Barnhart KT. Luteal phase recombinant FSH as a novel stimulation protocol in the IVF poor responder. *Fertil Steril* 2006; 86(Suppl): 139-40.
- Kansal KS, Ratcliffe S, Gracia CR, Martino L, Coutifaris C, Barnhart KT. Randomized controlled pilot trial of luteal phase recombinant FSH stimulation in poor responders. *Reprod Biomed Online* 2008 Dec; 17(6): 745-50.
- Karande VC, Jones GS, Veeck LL, Muasher SJ. High-dose follicle-stimulating hormone stimulation at the onset of the menstrual cycle does not improve the in vitro fertilization outcome in low-responder patients. *Fertil Steril* 1990 May; 53(3): 486-9.
- Karande V, Morris R, Rinehart J, Miller C, Rao R, Gleicher N. Limited success using the "flare" protocol in poor responders in cycles with low basal follicle-stimulating hormone levels during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997 May; 67(5): 900-3.
- Keltz MD, Gera PS, Skorupski J, Stein DE. Comparison of FSH flare with and without pretreatment with oral contraceptive pills in poor responder undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007 Aug; 88(2): 350-3.
- Klein TA, Mishell DR. Gonadotropin, prolactin, and steroid hormone levels after discontinuation of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol* 1977 Mar; 127(6): 585-9.
- Kolibanakis EM, Venetis CA, Diedrich K, Tarlatzis BC, Griesinger G. Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2009; 15(6):613-622.
- Kotarba D, Kotarba J, Hughes E. Growth hormone for in vitro fertilization (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (2):CD000099.
- Kowalik A, Barmat L, Damario M, Liu O, Rosenwaks Z. Ovarian estradiol production in vivo: inhibitory effect of leuprolide acetate. *J Reprod Med* 1998 May; 43(5): 413-7.
- Kucuk T, Kozinoglu H, Kaba A. Growth hormone co-treatment within a GnRH agonist long protocol in patients with poor response: a prospective, randomized, clinical trial. *J Assist Reprod Genet* 2008 Apr; 25(4): 123-7.
- Kucuk T, GoKtolga U, Sozen E. Efficiency of follicle-stimulating hormone, commenced in the luteal phase, for overcoming a poor

- response in assisted reproduction. *J Obstet Gynaecol Res* 2008 Aug; 34(4): 574-7.
- Lainas TG, Sfontouris IA, Papanikolaou EG, Zorzovilis JZ, Petsas GK, Lainas GT, et al. Flexible GnRH antagonist versus flare-up GnRH agonist protocol in poor responders treated by IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008 Jun; 23(6): 1355-8.
- Land J, Yarmolinskaya M, Dumoulin J, Evers J. High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1996 May; 65(5): 961-5.
- Latouche, J., Crumeyrolle-Arias, M., Jordan, D., Kopp, N., Augendre-Ferrante, B., Cedard, L. and Haour, F. GnRH receptors in human granulosa cells. Anatomical localization and characterization by autoradiographic study. *Endocrinol* 1989 Sep; 125(3): 1739-41.
- Leondires MP, Escalpes M, Segars JH, Scott RT, Miller BT. Microdose follicular phase gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRH-a) compared with luteal phase GnRH-a for ovarian stimulation at in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999 Dec; 72(6): 1018-23.
- Levy T, Limor R, Villa et al. Another look at cotreatment with growth hormone and human menopausal gonadotropins in poor responders. *Hum Reprod* 1993 Jun; 8(6): 834-9.
- Loutradis D, Vomvolaki E, Drakakis P. Poor responder protocols for in-vitro fertilization: options and results. *Curr Opin Obstet Gynaecol* 2008 Aug; 20(4): 374-8.
- Mahutte NG, Arici A. Role of gonadotropin-releasing hormone antagonists in poor responders. *Fertil Steril* 2007 Feb; 87(2): 241-9.
- Manno M, Tomei F, Cervi M, Favretti C, Adamo V. Comparison of protocols efficacy in poor responders: differences in oocytes/embryos competence with different protocols, a retrospective study. *Fertil Steril* 2009 Apr; 91(4 Suppl): 1431-3.
- Marcus SF, Brisden PR, Macnamee M, Rainsbury PA, Elder KT, Edwards RG. Comparative trial between an ultra short and long protocol of LHRH agonist for ovarian stimulation in IVF. *Hum Reprod* 1993 Feb; 8(2): 238-43.
- Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibition improves ovarian response to follicle-stimulating hormone in poor responders. *Fertil Steril* 2002 Apr; 77(4): 776-80.
- Mitwally MF, Casper RF. Aromatase inhibitors in ovulation induction. *Sem Reprod Med* 2004 Feb; 22(1): 61-78.
- Mohamed KA, Davies WA, Allsopp J, Lashen H. Agonist "flare-up" versus antagonist in the management of poor responders undergoing in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 2005 Feb; 83(2): 331-5.
- Mohamed MA, Sbracia M, Pacchiarotti A, Micara G, Linari A, Tranquilli D, Espinola SM, Aragona C. Urinary follicle-stimulating hormone (FSH) is more effective than recombinant FSH in older women in a controlled randomized study. *Fertil Steril* 2006 May; 85(5): 1398-403.
- Moreno L, Guillén A, Pacheco A, Mifsud A, Duque L, Garcia-Velasco JA. Aromatase inhibitor letrozole improves implantation rate in poor responder IVF/ICSI patients. *Fertil Steril* 2004; 82: Suppl 123.
- Nikoletos N, Al-Hasani S, Felberbaum R, Demirel LC, Kupker W, Montzka P, et al. Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol: a novel method of ovarian stimulation in poor responders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001 Aug; 97(2): 202-7.
- Olivennes F, Righini C, Fanchin R, Torrisi C, Hazout A, Glissant M, et al. A protocol using a low dose of gonadotrophin-releasing hormone agonist might be the best protocol for patients with high follicle stimulating hormone concentrations on day 3. *Hum Reprod* 1996 Jun; 11(6): 1169-72.
- Orvieto R, Kruchkovich J, Rabinson J, Zohav E, Anteby EY, Meltzer S. Ultrashort gonadotropin-releasing hormone agonist combined with flexible multidose gonadotropin-releasing hormone antagonist for poor responders in in vitro fertilization/embryo transfer programs. *Fertil Steril* 2008 Jul; 90(1): 228-30.
- Padilla S, Dugan K, Maruschak V, Shalika S, Smith R. Use of the flare-up protocol with high dose follicle stimulating hormone and human menopausal gonadotropins for in vitro fertilization in poor responders. *Fertil Steril* 1996 Apr; 65(4): 796-9.
- Pinkas H, Orvieto R, Avrech OM, Rufas O, Ferber A, Ben-Rafael Z, Fisch B. Gonadotropin stimulation following GnRH-a priming for poor responders in in vitro fertilization-embryo transfer programs. *Gynecol Endocrinol* 2000 Feb; 14(1): 11-4.
- Pu-Tsui W, Kuo-Kuang LR, Jin-Tsung S, Jen-Wan H, Ming-Huei L, Yu-Ming H. Cessation of low dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy combined followed by high-dose gonadotropin stimulation yields a favorable ovarian response in poor responders. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 1-6.
- Raga F, Bonilla-Musoles F, Casan E et al. Recombinant FSH stimulation in poor responders with normal basal concentration of FSH: improved reproductive outcome. *Hum Reprod* 1999 Jun; 14(6): 1431-4.
- Reh A, Krey L, Noyes N. Are gonadotropin-releasing hormone agonists losing popularity? Current trends at a large fertility center. *Fertil Steril* 2008; Oct 28. Article in press.
- Rombauts L, Suikkari A, MacLachlan V et al. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertil Steril* 1998 Apr; 69(4): 665-9.
- Schachter M, Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Bern O, Ron-El R. Improvement of IVF outcome in poor responders by discontinuation of GnRH analogue during the gonadotropin stimulation phase-a function of improved embryo quality. *J Assist Reprod Genet* 2001 Apr; 18(4): 197-204.
- Schmidt DW, Bremner T, Orris JJ, Maier DB, Benadiva CA, Nulsen JC. A randomized prospective study of microdose leuprolide versus ganirelix in in vitro fertilization cycles for poor responders. *Fertil Steril* 2005 May; 83(5): 1568-71.
- Schoolcraft WB, Surrey ES, Minjarez DA, Stevens JM, Gardner DK. Management of poor responders: Can outcomes be improved with a novel gonadotropin-releasing hormone antagonist/letrozole protocol? *Fertil Steril* 2008 Jan; 89(1): 151-6.
- Scott R, Carey K, Leland M, Navot, D. Gonadotropin responsiveness to ultra low-dose leuprolide acetate in baboons. *Fertil Steril* 1993 May; 59(5): 1124-8.
- Shaker AG, Fleming R, Jamieson ME, Yates RW, Coutss JR. Absence of effect of adjuvant growth hormone therapy on follicular responses to exogenous gonadotropins in women: normal and poor responders. *Fertil Steril* 1992 Nov; 58(5): 919-23.
- Siristatidis CS, Hamilton MP. What should be the maximum FSH dose in IVF/ICSI in poor responders? *J Obstet Gynaecol* 2007 May; 27(4): 401-5.
- Smits J, Van Den Abbeel E, Bollen N, Camus M, Devroey P, Tourayne H, et al. The effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist in the follicular phase on in-vitro fertilization outcome in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 1992 Sep; 7(8): 1098-102.
- Srouji SS, Missmer SA, Ginsburg ES. Outcomes in poor responder microflare and patch protocols. *Fertil Steril* 2005; 84: Suppl 166.
- Suikkari A, MacLachlan V, Koistinen R et al. Double-blind placebo controlled study: human biosynthetic growth for assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 1992 Apr; 65(4): 800-5.
- Sun Y, Zhu YM. Gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in patients with risk of poor response to ovarian stimulation in IVF-ET. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009 May; 38(3): 305-10.
- Sunkara SK, Coomarasamy A, Khalaf Y, Braude P. A three-arm randomised controlled trial comparing Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) agonist long regimen versus GnRH agonist short regimen versus GnRH antagonist regimen in women with a history of poor ovarian response undergoing in vitro fertilization (IVF) treatment: Poor responders intervention trial (PRINT). *Reproductive Health* 2007 Dec; 4: 12.
- Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003 Jan-Feb; 9(1):61-76.
- Tazegul A, Gorkemli H, Ozdemir S, Aktan TM. Comparison of multiple dose GnRH antagonist and minidose long agonist protocols in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet* 2008 May; 278(5): 467-72.

Toth T, Awwad J, Veeck L, Jones H, Muasher S. Suppression and flare regimens of gonadotropin-releasing hormone agonist: use in women with different basal gonadotropin values in an in vitro fertilization program. *J Reprod Med* 1996 May; 41(5): 321-6.

Tulandi T, Martin J, Al-Fadhli R, Kabli N, Forman R, Hitkari J, et al. Congenital malformations among 911 newborns conceived after infertility treatment with letrozole or clomiphene citrate. *Fertil Steril* 2006 Jun; 85(6): 1761-5.

Ubaldi FM, Rienzi L, Ferrero S, Sapienza F, Cobellis L, Greco E. Management of poor responders in IVF. *Reprod Biomed Online* 2004 Feb; 10(2): 235-46.

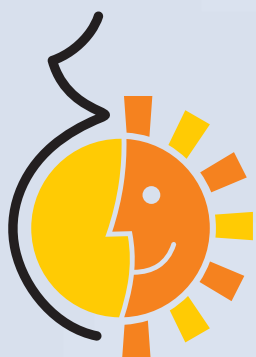
Van Hooff MH, Alberda AT, Huisman GJ, Zeilmaker GH, Leerentveld RA. Doubling the human menopausal gonadotrophin dose in

the course of an in vitro fertilization treatment in low responders: a randomized study. *Hum Reprod* 1993 Mar; 8(3): 369-73.

Yarali H, Esinler I, Polat M, Bosdag G, Tiras B. Antagonist/letrozole protocol in poor ovarian responders for intracytoplasmic sperm injection: a comparative study with the microdose flare-up protocol. *Fertil Steril* 2009 Jul; 92(1): 231-5.

Yashimura Y, Nakamura Y, Ando M, Shiokawa S, Koyama N, Manno T. Direct effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on the rabbit ovarian follicle. *Fertil Steril* 1992 May; 57(5): 1091-7.

Weissman A, Farhi J, Royburt M, Nahum H, Glezerman M, Levran D. Prospective evaluation of two stimulation protocols for low responders who were undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2003 Apr; 79(4): 886-92.



XIV

CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

25 A 28 DE AGOSTO DE 2010

GRAN MARQUISE HOTEL
FORTALEZA CEARÁ BRASIL

“Estamos preparados para oferecer o que de melhor existe em atualização científica e confraternização social.”

“Temos a imensa satisfação de recebê-lo por ocasião do XIV Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida. Estamos preparando com muito carinho toda a programação científica e social, tentando fazer algo diferente do ponto de vista do aprendizado, como também, promovendo um maior relacionamento com todos os centros de pesquisa e assistência a nível Brasil. Aproveite, pois esse encontro está sendo organizado com muito esforço, muita dedicação e amor a tudo que realizaremos.”

Dinâmica

O Congresso será desenvolvido através de Conferências, Mesas Redondas, Como eu Faço, Ponto e Contraponto, Simpósios Satélite, Cursos Pré-Congresso, Debate com Especialistas, Temas Livres.

Programação Social

Estamos organizando a programação social, empenhados em lhes proporcionar uma agradável confraternização como só o cearense sabe fazer!

Agência de Turismo

NAJA TURISMO LTDA

+ 55 85 4008.5900 | 4008.5918

www.naja.tur.br

Público Alvo

Médicos Ginecologistas,
Urologistas, Biólogos,
Esterilêutas, Psicólogos
e Residentes.

Exposição Paralela

Haverá uma exposição comercial paralela, onde empresas ligadas ao setor irão expor o que há de mais novo e importante no segmento.

Cursos (pré-congresso)

Entre no site e verifique os cursos de pré-congresso. Inscreva-se já!

ATÉ 15/06: R\$ 300,00

ATÉ 20/08: R\$ 350,00

Temas Livres

Vide Regulamento no site:
www.reproducaoassistidace2010.com.br

Realização



Inscrições

Faça a sua inscrição pelo site:
www.reproducaoassistidace2010.com.br

CATEGORIA

Sócio SBRA
Não Sócio
Residente e Pós-graduando
Outros Profissionais

Até 15/05

R\$ 390,00
R\$ 585,00
R\$ 195,00
R\$ 260,00

Até 15/08

R\$ 500,00
R\$ 665,00
R\$ 250,00
R\$ 330,00

No Local

R\$ 650,00
R\$ 865,00
R\$ 325,00
R\$ 435,00

Planejamento, Organização e Comercialização



+ 55 11 3062.1722 | 3062.1710
cbra2010@somaeventos.com.br

Secretaria Executiva e Comercialização Local



+ 55 85 3433.8464 | 3265.4009
cbra2010@vceventos.com.br

Teria o HLA-E influência em reprodução humana?

Does exist HLA-E influence on human reproduction?

Geórgia Fernanda Gelmini¹, Cynthia Hernandez Costa¹, Maria da Graça Bicalho¹, Valéria Maria Sperandio Roxo¹, Alessandro Schuffner².

¹Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná

²Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva – Curitiba

RESUMO

O feto é um aloenxerto tolerado e que ocorre de modo natural para a gestante. Metade dos genes herdados do pai deverão ser expressos e são alogênicos para mãe. Durante o processo da implantação embrionária humana, tanto o embrião quanto o endométrio devem estimular adaptações no sistema imune materno para o estabelecimento de uma gravidez viável. O trofoblasto que é a camada externa da placenta, a interface entre os tecidos fetais e maternos, não expressa moléculas MHC de Classe I e II clássicas, o que o torna resistente ao reconhecimento imune mediado por células T do sistema imune materno e, vulnerável a ação das células *natural killer*. A expressão de moléculas MHC de Classe I não Clássicas, antígeno leucocitário humano G (HLA-G) e antígeno leucocitário humano E (HLA-E), poderia ser responsável pela proteção do trofoblasto ao ataque pelas células *natural killer*. Interações entre HLA-G, HLA-E e receptores inibidores de células NK resultariam numa regulação negativa da resposta imune materna, auxiliando a manutenção do feto semialogênico durante o período gestacional. Esta revisão abrange as principais características da molécula HLA-E, com enfoque na participação da molécula na interface materno-fetal, e como sua atuação poderia garantir o sucesso gestacional. Baseia-se em busca da literatura especializada nos últimos nove anos (2000-2009), nas bases de dados OVID – Medline, Science Direct e Lilacs, e no Pubmed.

Palavras-chave: implantação, antígenos HLA, manutenção da gravidez.

ABSTRACT

The fetus is a tolerated allograft and that occurs naturally in pregnant women. Half of the genes inherited from the father should be expressed and are allogenic to the mother. During the process of human embryo implantation, both the embryo and the endometrium must stimulate adaptations in the maternal immune system for the establishment of a viable pregnancy. The trophoblast is the outer layer of the placenta, the interface between maternal and fetal tissue, and does not express MHC Class I and II classic, which makes it resistant to immune recognition mediated by T cells of the maternal immune system, but vulnerable to action of natural killer cells. The expression of MHC Class I non classic, human leukocyte antigen G (HLA-G) and human leukocyte antigen E (HLA-E) could be responsible for protecting the trophoblast from attack by natural killer cells. Interactions between HLA-G, HLA-E and inhibitory receptors of NK cells result in a negative regulation of maternal immune response,

helping to maintain the fetus semi-allogenic during pregnancy. This review covers the main features of the molecule HLA-E, focusing on the participation of the molecule in the maternal-fetal interface, and how their actions could ensure the success of pregnancy. It is based on literature search of the last nine years (2000-2009), the databases OVID – Medline, Science Direct and Lilacs, and Pubmed.

Key-words: implantation, HLA antigens, pregnancy maintenance.

INTRODUÇÃO

O MHC (Major Histocompatibility Complex) foi descoberto como um locus extenso constituído de genes altamente polimórficos e polialélicos que determinavam o resultado de transplantes de órgãos entre pessoas diferentes. Atualmente sabe-se que o papel biológico principal do MHC é a apresentação de antígenos aos linfócitos T. O MHC humano ocupa um grande segmento de DNA, se estendendo por aproximadamente 4.000 quilobases (kb) e está localizado no braço curto do cromossomo 6, e é dividido em três regiões: Classe I, Classe II e Classe III. Os genes HLA clássicos ou classe IA presentes na região I são: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, e os genes não-clássicos ou classe IB: *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*. Na região de classe II, estão localizados os genes HLA clássicos: *HLA-DQ*, *-DP* e *-DR* e genes que codificam moléculas não clássicas como na região I. Existem dois tipos principais de produtos gênicos do MHC chamados de moléculas da classe I e moléculas da classe II, produzidas por genes de classe I e II, respectivamente. As moléculas da classe I apresentam peptídeos aos linfócitos citotóxicos CD8+, e as moléculas da classe II apresentam peptídeos às células T auxiliares CD4+. Os antígenos são processados na forma de peptídeos e então apresentados por moléculas MHC, que auxiliam desta forma os linfócitos T a reconhecerem a presença de agressores (como fungos, bactérias, vírus) e alterações celulares (como neoplasias) (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A implantação embrionária humana é um processo extremamente complexo que requer tanto habilidade do embrião de se implantar no útero quanto uma receptividade adequada do endométrio materno. Diversas evidências apontam que durante este processo, tanto o embrião quanto o endométrio estimulam adaptações no sistema imune materno para o estabelecimento de uma gravidez viável. Nas duas últimas décadas, com a identificação de genes de antígeno leucocitário humano (HLA) classe IB, com enfoque em HLA-G, conhecimentos foram criados no entendimento da imunomodulação durante a reprodução

humana, seja durante uma gravidez normal ou patológica ou durante a implantação embrionária (FANCHIN *et al.*, 2007). As falhas de implantação respondem por muitas situações de infertilidade, e representam o principal fator limitante para o sucesso das tecnologias de reprodução assistida. O processo de implantação embrionária requer a participação do embrião e do endométrio, culminando com a adesão do blastocisto ao endométrio durante a janela de implantação (período que se inicia aproximadamente sete dias após a ovulação e que não dura mais que dois dias), e a invasão trofoblástica na fase lútea tardia (CAVAGNA *et al.*, 2006).

A produção de HLA-G por embriões pré-implantacionais pode estar envolvida em mecanismos de garantia do estabelecimento correto de comunicação na interface materno-fetal e posterior sucesso na implantação. A possibilidade de identificar a produção de HLA-G por embriões criaria novas possibilidades de melhoramento dos tratamentos por fertilização *in vitro* (FIV), especificamente com enfoque na seleção de embriões e redução nas taxas de insucesso de implantação. Formas solúveis de HLA-G de origens alternativas e sua detecção através do sangue materno, antes da ovulação, parecem estar também relacionadas à implantação embrionária por promoverem receptividade endometrial. Os mecanismos que envolvem todo este processo permanecem desconhecidos, e conseqüentemente estimulam a produção de estudos para que se possa esclarecer e refinar a informação quanto à relação entre HLA-G (função, expressão e polimorfismos) e mecanismos reprodutivos (FANCHIN *et al.*, 2007).

Apesar dos estudos de imunomodulação durante a gravidez terem focado esforços em HLA-G, as moléculas HLA-E e HLA-F também se expressam no trofoblasto extraviloso que invade a decídua materna. Considerando as funções individuais de cada molécula HLA na compreensão do comportamento da imunidade materna durante a gravidez, a realização de estudos combinados acerca dos efeitos interativos das três moléculas pode obter resultados esclarecedores. Em trabalhos recentemente publicados foram constatadas possíveis interações entre HLA-G, HLA-E e células NK resultando numa regulação negativa da resposta imune materna, auxiliando a manutenção do feto semiallogênico durante o período gestacional.

ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO E: HLA-E

Estrutura, produto e função

Dentre os antígenos da classe IB, o mais compreendido de todos é o antígeno HLA-E que, diferentemente dos outros antígenos da classe IB, é expresso em quase todos os tecidos, apesar de estar em concentrações menores do que as moléculas da classe I A. Primeiramente reconhecido pela sua participação na imunidade inata, estudos recentes apontam a colaboração de HLA-E na ligação com células T e na resposta imune após transplantes (SULLIVAN *et al.*, 2008).

As moléculas HLA-E apresentam certas particularidades em relação às moléculas HLA classe I, como a apresentação de antígenos, onde os peptídeos que se ligam a HLA-E na superfície celular são derivados de 3 a 11 resíduos da sequência líder de outros peptídeos HLA classe I. O carregamento destes peptídeos dentro do compartimento de HLA-E é dependente do transportador associado a processamento de antígenos (TAP), visto que linhagens celulares que apresentam deficiência de TAP são incapazes de expressarem HLA-E na superfície celular. A aquisição destes peptídeos por HLA-E parece ser intima-

mente controlada e dependente da expressão de outras moléculas da classe I, que servem como fonte de peptídeos junto à maquinaria funcional de processamento de antígenos. As células NK poderiam, desta forma, usar a expressão de HLA-E como monitoramento dos níveis de expressão de moléculas HLA classe IA (ANTOUN *et al.*, 2008; SULLIVAN *et al.*, 2008).

A fenda de ligação de antígenos de HLA-E é diferenciada das fendas da classe I, visto ser composta de 5 resíduos de ancoragem nas posições P2, P3, P6, P7 e P9, que juntos determinam restrição na sequência de peptídeos capazes de se ligarem a HLA-E. Esta característica poderia explicar a baixa afinidade da cadeia pesada de HLA-E por sequências líder derivadas de alelos de HLA-B que contêm treonina na posição P2. Outra diferença significativa da molécula seria sua estrutura, que contém uma volta no domínio $\alpha 3$, correspondente à região associada à ligação com T CD8+. Como a disponibilidade de peptídeos para HLA-E é dependente da expressão de outras proteínas HLA classe I e da funcionalidade da TAP, a expressão de HLA-E na superfície celular é um indicativo de que tanto a maquinaria de processamento de antígenos quanto à expressão de HLA classe I estão normais e ativas (SULLIVAN *et al.*, 2008).

A primeira constatação de que HLA-E estaria envolvido na regulação da imunidade inata foi quando demonstraram que receptores CD94-NKG2 expressos em abundância, porém sem exclusividade, em células NK reconheciam HLA-E. Estes receptores fazem parte da superfamília lectina tipo-C e consistem de uma subunidade invariante CD94 dissulfeto ligada a um membro da família NKG2. A família NKG2 compreende a isoformas inibidoras (2A e 2B) e ativadoras (2C, 2E e 2H), que ao se complexarem a CD94 são capazes de ampliar sinais mediante ligação com HLA-E. A interação de CD94-NKG2A com HLA-E transduz sinais inibitórios entre as células NK. Eventos como infecção viral ou transformações que possam suprimir sequências líder de peptídeos derivados de HLA classe I, sejam por mecanismos diretos como repressão da expressão de HLA classe I ou mecanismos indiretos como inibição da função de TAP, podem ocasionar impactos na expressão de HLA-E na superfície celular, tornando a célula suscetível a lise por células NK. Além da atividade de resposta inibidora através da interação com CD94-NKG2A, HLA-E pode apresentar resposta ativadora por meio da interação com CD94-NKG2C e receptores de células T (TCR) onde, em situações como infecções virais, o balanço entre atividade ativadora e inibidora pode ser modificado. (SULLIVAN *et al.*, 2008).

Apesar de HLA-E ser originalmente relacionado à ligação com peptídeos derivados de sequências de moléculas HLA classe I, dados recentes demonstram que HLA-E pode se ligar e apresentar antígenos derivados de vírus, micobactérias e da proteína de choque térmico HSP60 (ISHITANI *et al.*, 2006).

Regulação da transcrição

Os genes do MHC classe I clássicos tem sua transcrição mediada por diversos elementos regulatórios conservados atuantes *in cis* na região proximal ao promotor, que determina seus níveis de expressão constitutiva e induzida por citocinas. Estes elementos regulatórios demonstram diferenças lócus específicas que podem ser responsáveis pelos níveis diferenciais de expressão constitutiva e induzida por citocinas dos diversos genes MHC classe I. Estudos recentes apresentaram que os elementos regulatórios nos genes MHC classe I podem ser divididos em duas categorias: um módulo a montante correspondente

Tabela 1. Distribuição de SNPs de HLA-E em três grupos étnicos.

SNP position	IMGT/HLCDNA	Amino acid	Amino acid substitution	Base	Euro-Caucasoid		Afro-Caribbean		Indo-Asian	
					n	%	n	%	n	%
718C/T	28	-12	s, f, p, l ^b , serine, phe, proline, leucine	C T	446 0	100.0 0.0	120 0	100.0 0.0	104 0	100.0 0.0
719C/T	29	-12		C T	0 446	0.0 100.00	0 120	0.0 100.0	0 104	0.0 100.0
1081 C/G	261	66	R, R, serine, arginine	C G	0 446	0.0 100.00	0 120	0.0 100.0	0 104	0.0 100.0
1114C/T	294	77	Synonymous	C T	298 148	66.8 33.2	92 28	76.7 ^c 23.3	89 15	85.6 ^d 14.4
1130C/G	310	83	R, G, arginine, glycine	C G	446 0	100.0 0.0	120 0	100.0 0.0	104 0	100.0 0.0
1446A/G	382	107	R, G, arginine, glycine	A G	249 197	55.8 44.2	64 56	53.3 46.7	59 45	56.7 43.3
1455C/G	392	131	L, V, leucine, valine	C	0 446	0.0 100.0	0 120	0.0 100.0	0 104	0.0 100.0
1596G/T	532	157	R, G, arginine, glycine	G A	0 446	0.0 100.0	0 120	0.0 100.0	0 104	0.0 100.0
2747C/T	938	292	A, V, alanine, valine	C T	0 446	0.0 100.0	0 120	0.0 100.0	0 104	0.0 100.0

AC, Afro-Caribenho; EC, Euro-Caucasóide; HLA, antígeno leucocitário humano; IA, Indo-Asiático; SNP, polimorfismo de único nucleotídeo. Frequência alélica de nove diferentes SNPs em três populações etnicamente diferentes, com a mudança de aminoácido causada por estes SNPs. As posições dos SNPs nas bases de dados Ensembl e IMGT/HLA são ilustradas. As diferenças estatísticas significativas das frequências alélicas entre cada par das populações estudadas foram determinadas usando o teste de qui-quadrado.

b CTC: leucina, CCC: prolina, TCC: serina e TTC: fenilalanina.

c diferença estatística entre EC e AC, $\chi^2 = 4,28$, $p < 0.05$.

d diferença estatística entre EC e IA, $\chi^2 = 14,23$, $p < 0.001$.

Fonte: ANTOUN (2008).

ao intensificador (enhancer) A e elemento de resposta a interferon (ISRE) e um módulo recentemente identificado SXY contendo seqüências regulatórias compartilhadas por MHC classe I, classe II e seus genes acessórios. O módulo a montante contém sítios de ligação para os membros da família NF- κ B como p50, p65 e c-Rel (sítios kB1 e kB2 do intensificador A), IRF1 e IRF2 (ISRE), USF1, USF2 e Sp1 que mediam ativação em trans de rotas constitutivas e induzíveis por citocinas. O módulo SXY é constituído dos sítios S, X (X1 e X2) e Y cujo complexo de multiproteínas RFX, CREB/ATF e NFY se ligam cooperativamente, e através deste complexo de multiproteínas CIITA pode realizar sua ativação em trans (GOBIN e ELSESEN, 2000). A estrutura do promotor do gene *HLA-E* (figura 8) mostra, em diversos elementos regulatórios, algumas divergências do sítio consenso observado nos genes MHC classe I clássicos. Os sítios kB1 e kB2 do intensificador A (enhancer) e elemento ISRE diferem dos sítios kB e ISRE consenso. Os sítios S, X1, X2 e Y do módulo SXY demonstram pequenas diferenças nas seqüências nucleotídicas da encontrada na seqüência consenso. *HLA-E* não é induzido por NF- κ B, porém é fortemente induzido por IFN- γ mediado pelo sítio a montante STAT1. *HLA-E* também pode ser induzido por CIITA, apesar de seu módulo SXY apresentar pequenas alterações (GOBIN e ELSESEN, 2000). Polimorfismos do gene *HLA-E* e função na reprodução De acordo com os dados presentes na página eletrônica do Instituto de Pesquisa Anthony Nolan, disponível em <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>>, até novembro de 2009, o gene *HLA-E* apresentava 9 alelos

(E*01010101; E*01010102; E*01010103; E*01030101; E*01030102; E*010302; E*010303; E*010304; E*0104) codificando 3 proteínas diferentes funcionais descritas na população humana, sendo o gene menos polimórfico de todos os genes HLA classe I (tabela 1).

Dois destes alelos são provenientes de polimorfismos não sinônimos do exon 3 (tabela 1), *HLA-E**0101(*HLA-E^R*) que contém uma arginina na posição 107 da proteína ("selvagem"), e *HLA-E**0103 (*HLA-E^G*) que contém uma glicina na posição 107 da proteína ("mutante"), sendo esta posição localizada no domínio $\alpha 2$ da cadeia pesada. Estes alelos são encontrados com frequências muito semelhantes nas diferentes populações (em torno de 50%). Algumas evidências apontam haver seleção balanceadora atuando sobre o gene de *HLA-E* na manutenção destes dois alelos, que implicaria em diferenças funcionais entre estes, sendo o alelo *HLA-E**0103 a forma que apresenta maior expressão na superfície celular (ANTOUN *et al.*, 2008; SULLIVAN *et al.*, 2008). Alguns estudos demonstram haver diferenças entre os dois alelos na interação com possíveis ligantes e consequente alteração da expressão de *HLA-E* na superfície celular. A mudança na posição 107 poderia alterar tanto a interação de *HLA-E* e CD94-NKG2, quanto à interação de *HLA-E* com outros receptores como o TCR. Portanto a variação alélica poderia ocasionar dois efeitos sobre a interação com ligantes, o primeiro determinando diferenças quantitativas no número de complexos de *HLA-E* que poderiam ser formados a qualquer momento na superfície celular, e o segundo na distinção qualitativa



Figura 1. Representação esquemática de elementos regulatórios e sítios de ligação de proteínas do promotor de HLA-E. Os módulos regulatórios conservados estão a montante e contêm sítios de ligação para NF-κB, Sp1, e IRF1. O módulo SXY consiste dos elementos S, X1, X2 e Y que conjuntamente formam a região de ligação de um complexo multiprotéico que consiste de RFX, CREB/ATF, e NFY que medeia a indução de transativação de CIITA. Fonte: GOBIN (2000).

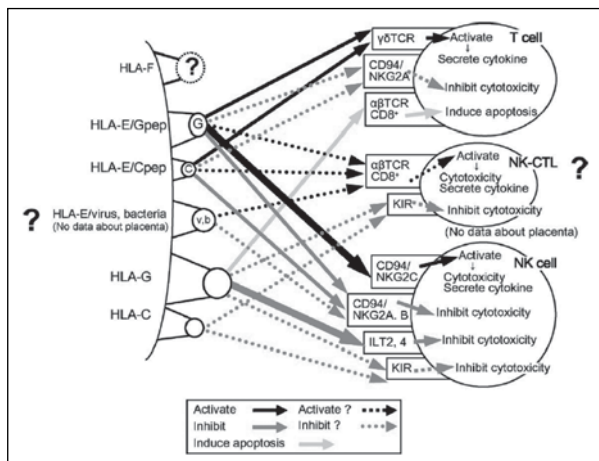


Figura 2. Possíveis interações das moléculas HLA-E, -F e -G expressadas no trofoblasto extraviloso e receptores das células imunes maternas. Linhas vermelhas indicam interações que direcionam respostas de ativação, e linhas verdes indicam inibição. A linha amarela indica a indução de apoptose pela proteína solúvel. Linhas sólidas denotam interações que já foram demonstradas por dados experimentais, sendo a espessura relativa correlacionada com o aumento do número de estudos independentes confirmatórios. Linhas pontilhadas indicam interações hipotéticas ainda não confirmadas por experimentação; por exemplo, NK-CTL, que ainda não demonstrou estar ativo em tecidos placentários. Fonte: ISHITANI (2006).

das moléculas quanto sua afinidade efetiva de interagir com receptores (STRONG *et al.*, 2003).

A célula imune mais abundante na decídua maternal é a CD56^{bright}NK, que secreta vários tipos de citocinas perante uma ativação fora da via de resposta citotóxica. Dentre as citocinas induzidas encontram-se a interleucina 1 (IL-1), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), fator inibitório de leucemia (LIF), interferon γ (IFN-γ), fator transformador de crescimento β (TGF-β), que parecem estar relacionadas ao processo de vascularização. Portanto mecanismos que inibam a citotoxicidade de NK e ativem a secreção de citocinas por NK são extremamente importantes, e a interação entre os receptores CD94-NKG2 em altas concentrações e HLA-E/peptídeo G ou HLA-E/peptídeo IA em células do citotrofoblasto extraviloso representariam possíveis mecanismos. Estes complexos, com enfoque em HLA-E/peptídeo G, devem inibir a citotoxicidade por interagirem com CD94-NKG2A, ativarem as células NK a produzirem citocinas por interação com CD94-NKG2C ou através da interação com outros receptores ativadores como NKG2E. HLA-E também pode estimular células T a produzirem citocinas sem citotoxicidade ao trofoblasto, através de mecanismos inibidores e ativadores seja via TCR ou receptores de NK, que facilitam a formação e vascularização placentária adequada (ISHITANI *et al.*, 2006).

A constatação de possíveis diferenças na capacidade de interação com peptídeos entre os alelos HLA-E^G e HLA-E^R, poderia ocasionar mudanças nos níveis

de expressão na superfície celular placentária destes alelos. Como os níveis relativos de expressão de HLA-E na superfície celular parecem também influenciar diretamente a eficiência de inibição ou ativação via CD94-NKG2, seria plausível que as variantes alélicas HLA-E^G e HLA-E^R participassem da modulação da resposta imune materna na interface materno-fetal. O balanço apropriado entre mecanismos inibitórios ou ativadores no estabelecimento de uma gravidez estável influenciaria baixos ou altos níveis de HLA-E, e este balanço poderia ser o responsável pela forte seleção existente sobre as duas formas alélicas (STRONG *et al.*, 2003).

O progresso nos estudos da molécula HLA-E levantou dados importantes quanto à sua função e possíveis conexões entre HLA-E e HLA-G. Quando é fornecido à HLA-E o peptídeo sinal derivado de HLA-G formando-se um nonâmero, uma resposta exclusiva ativadora das células NK pode ser observada. Estes resultados levantam a possibilidade de que o reconhecimento por CD94-NKG2 das moléculas HLA-E expressadas no citotrofoblasto extraviloso (figura 2) pode representar um papel significativo na interação celular da interface materno-fetal (ISHITANI *et al.*, 2003). Maiores estudos são necessários para determinar a relação de polimorfismos de HLA-E e sua função na implantação, obter maiores informações da molécula em si, buscar maior entendimento dos mecanismos imunológicos durante a gravidez, e principalmente observar se existe potencial de utilização clínica da molécula HLA-E no tratamento das falhas de implantação.

Correspondência:

Alessandro Schuffner

Conceber – Centro de Medicina Reprodutiva
Avenida República Argentina, 210/17º andar
Curitiba, PR - 80240-210
Fone/fax: (41) 3039-5556

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O complexo principal de Histo-compatibilidade. In: *Imunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 65-81, 2005.
- ALLAN, D.S.J.; LEPIN, E.J.M.; BRAUD, V.M.; O'CALLAGHAN, C.A.; MCMICHAEL, A.J. Tetrameric complexes of HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Journal of Immunological Methods*, v. 268, p.43-50, 2002.
- AMADOR, H.C.O.; SOUZA, M.C.B.; OLIVEIRA, R.M. Fator aloimune do abortamento espontâneo recorrente: a imunoterapia pode ser útil. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, v.11, n.1, p.27-34, 2007.
- ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>> Acesso em: 10 de agosto de 2009.
- ANTOUN, A.; JOHNSON, S.; COOK, M.; MOSS, P.; BRIGGS, D. Ethnic variability in human leukocyte antigen-E haplotypes. *Tissue Antigens*, v. 73, p. 39-45, 2008.
- CAVAGNA, M.; MENDES-PEREIRA, D.; CAVAGNA, F.; LEVI-SETTI, P.E. Receptividade endometrial: o papel das citocinas e fatores de crescimento. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, v.10, n.01, p.29-33, 2006.
- FANCHIN, R.; GALLOT, V.; ROUAS-FREISS, N.; FRYDMAN, R.; CAROSELLA, E.D. Implication of HLA-G in human embryo implantation. *Human Immunology*, v. 68, p. 259-263, 2007.
- GOBIN, S.J.O.P.; VAN DEN ELSEN, P.J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Human Immunology*, v. 61, p. 1102-1107, 2000.
- GOBIN, S.J.P.; BIESTA, P.; DE STEENWINKEL, E.M.; DATEMA, G.; VAN DEN ELSEN, P.J. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). *The Journal of Biolo-*

gical Chemistry, v. 277, n. 42, p. 39525-39531, 2002.

GRIMSLEY, C.; KAWASAKI, A.; GASSNER, C.; SAGESHIMA, N.; NOSE, Y.; HATAKE, K.; GERAGHTY, D.E.; ISHITANI, A. Definitive high resolution typing of HLA-E allelic polymorphisms: identifying potential errors in existing allele data. *Tissue Antigens*, v. 60, p. 206-212, 2002.

HIRANKARN, N.; KIMKONG, I.; MUTIRANGURA, A. HLA-E polymorphisms in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tissue Antigens*, v. 64, n. 5; p. 588-592, 2004.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; LEE, N.; DOROFEEVA, N.; HATAKE, K.; MARQUARDT, H.; GERAGHTY, D.E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, -F, and -G in maternal-placental immune recognition. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 1376-1384, 2003.

ISHITANI, A.; SAGESHIMA, N.; HATAKE, K. The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 69, p. 101-113, 2006.

PYO, C.W.; WILLIAMS, L.M.; MOORE, Y.; HYODO, H.; LI, S.S.; ZHAO, L.P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphisms: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics*, v. 58, p. 241-251, 2006.

STRONG, R.K.; HOLMES, M.A.; LI, P.; BRAUN, L.; LEE, N.; GERAGHTY, D.E. HLA-E allelic variants. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, n. 7, p. 5082-5090, 2003.

SULLIVAN, L.C.; CLEMENTS, C.S.; BROOKS, A.G. The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*, v. 72, p. 415-424, 2008.

Gestação quádrupla após IVM.

Quadruplet pregnancy after IVM.

Höher M¹, Bos-Mikich A², Frantz G¹, Oliveira N¹, Dutra CG¹, Frantz N¹

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

² Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

Avanços no conhecimento e na tecnologia da maturação *in vitro* (IVM) de oócitos humanos permitiram consideráveis melhoras nas taxas de gestação e implantação. Este relato de caso descreve uma gestação e o nascimento de quádruplos resultantes da transferência de embriões gerados após ICSI de oócitos coletados em um ciclo não estimulado e maturados *in vitro*. Esta foi a primeira gestação múltipla em nosso grupo e a primeira quádrupla a nosso conhecimento descrita na literatura após IVM em humanos. Ela ocorreu após uma série de gestações únicas indicando que, a semelhança do que ocorre em ciclos estimulados chegou a hora de diminuir-se o número de embriões transferidos de IVM através da seleção embrionária.

Palavras chave: IVM, gestação quádrupla.

ABSTRACT

Progresses in the knowledge and technology of human oocyte *in vitro* maturation allowed considerable improvements in implantation and pregnancy rates. This case report describes a quadruplet pregnancy and birth achieved after the transfer of embryos created by ICSI of *in vitro* matured oocytes collected in an unstimulated cycle. This is the first multiple pregnancy achieved in our group after IVM and to our knowledge this is the first quadruplet pregnancy achieved after human oocyte *in vitro* maturation. The gestation happened after a series of single pregnancies and, similar to the situation in classic stimulated cycles, it suggests that time has come to decrease the number of IVM embryos for transfer by critical embryo selection.

Keywords: IVM, quadruplet pregnancy

INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (IVM) de oócitos em ciclos não estimulados é uma tecnologia de reprodução assistida (RA) que vem despertando crescente interesse por parte dos esterileutas. Atualmente esta metodologia vem sendo indicada para o tratamento de pacientes portadoras de ovários com aspecto policístico (PCO) ou com a síndrome dos ovários policísticos (PCOS) (Consenso de Rotterdam, 2003). A IVM como método de tratamento para estes grupos de pacientes foi reportada pela primeira vez em 1994 por Trounson *et al.* Entretanto, dificuldades com a metodologia, especialmente a baixa performance do desenvolvimento embrionário *in vitro* e as conseqüentes baixas taxas de implantação e gestação desaceleraram o merecido avanço da técnica nos protocolos de RA.

Nosso grupo publicou o primeiro relato de uma gestação após IVM no país (Frantz *et al.*, 2008), um marco

conquistado após a realização de 12 ciclos sem quaisquer gestações. Desde então, melhoras significativas na metodologia não só aumentaram o número de gestações e implantações, mas também demonstram indiretamente, uma melhora marcante na qualidade dos embriões gerados a partir de oócitos coletados ainda imaturos em ciclos não estimulados. Este relato de caso descreve uma gestação e o nascimento de quádruplos alcançados após a transferência de quatro embriões gerados por ICSI após IVM, em uma paciente portadora de ovários com aspecto policísticos.

DESCRIÇÃO DO CASO

Paciente AS, de 27 anos, procurou nosso serviço por infertilidade primária em julho de 2008. A paciente apresentava ciclos regulares com perfil hormonal normal e ovários aumentados de volume pela presença de mais de 12 folículos antrais menores que 10 mm na ultrassonografia (Consenso de Rotterdam, 2003). O marido apresentava espermograma normal com uma concentração espermática de $40 \times 10^6/\text{ml}$ espermatozoides pós-capacitação. A paciente realizou exames de videolaparoscopia e histossalpingografia, os quais não acusaram nenhuma anomalia que pudesse estar causando seu problema de infertilidade. Uma vez frustradas as tentativas de indução da ovulação com citrato de clomifeno (CC), a técnica de IVM foi proposta ao casal como alternativa à fertilização *in vitro* clássica, apresentando menor custo e sem o risco de hiperestimulação ovariana. Após receberem esclarecimentos sobre a metodologia, o casal concordou em participar do programa de IVM de nossa clínica assinando um consentimento livre e informado.

A gestação clínica foi obtida no segundo ciclo de IVM da paciente. Na primeira tentativa, ela desenvolveu uma gestação química, a qual não teve progresso. Em ambos os ciclos, foi realizado um monitoramento do ciclo com ultrassonografia para avaliar o crescimento do folículo dominante e a espessura do endométrio. No 11º dia da segunda tentativa com IVM, a paciente apresentava endométrio trilaminar (aspecto proliferativo) de 6 mm de espessura, sendo neste dia aplicadas 10.000 UI de hCG (Choriomon®) subcutâneo. Trinta e seis horas após a administração do hCG foi realizada a punção dos múltiplos pequenos folículos antrais utilizando-se uma agulha de 19 Gauge (Cook), com pressão de sucção de 75-80 mmHg. A punção foi guiada por ultrassonografia transvaginal com sonda multifrequencial de 5 a 9 MHz (Ultrasonix OP, Sonix).

Para preparo do endométrio, a paciente recebeu valerato de estradiol oral (6mg), a partir do dia da punção ovariana. Foram detectados 16 complexos cumulus oócitos (COCs), os quais foram postos em meio de maturação (Medicult), já acrescido de uma fonte protéica e suple-

mentado com 75 UI de FSH e 75 UI de LH, a 37°C e 5.5% de CO₂, por 32 horas. Após o período de maturação, os COCs foram desnudados por exposição à hialuronidase e avaliados quanto a quebra da vesícula germinativa e expulsão do primeiro corpúsculo polar. Doze oócitos atingiram a metáfase II (MII) perfazendo um índice de 75% de maturação. Os oócitos maduros foram inseminados por ICSI e 19hrs após foram detectados 10 zigotos com dois pronúcleos, um com um pronúcleo e um oócito não fertilizado. Os 10 zigotos normais foram classificados conforme o critério de Scott et al., (2000) em três Z1, quatro Z2, dois Z3 e um Z4. Destes zigotos, oito apresentaram clivagem precoce as 27hrs pós-inseminação e nove clivaram no segundo dia de desenvolvimento. No dia 3 de desenvolvimento, foram selecionados para a transferência três embriões com grau G2 e um embrião com grau G3, classificados conforme o critério de Veeck (1999). Os demais embriões foram deixados em cultivo até o sexto dia do desenvolvimento em meio MultiBlast (Irvine), mas nenhum chegou ao estágio de blastocisto. Não houve criopreservação de embriões excedentes. A transferência foi executada de forma fácil com uma cânula Wallace Pro Sure View®. Dez dias após a transferência foi realizado o exame de β hCG plasmático que revelou uma contagem de 126 mUI/ml. O acompanhamento ultrassonográfico no 23º dia de gestação revelou a presença de quatro sacos gestacionais, todos apresentando embrião com vitalidade. A gestação transcorreu normal, resultando no nascimento de 4 bebês normais com 28 / 29 semanas.

DISCUSSÃO

Este relato de caso descreve uma gestação quádrupla alcançada a partir da transferência de quatro embriões gerados após a maturação *in vitro* de oócitos coletados em um ciclo não-estimulado. Este não é um resultado desejado em tratamentos de fertilidade, dado o alto risco que uma gestação múltipla representa para a mãe e para os fetos. Felizmente, apesar da indesejada prematuridade verificou-se neste caso o nascimento e o desenvolvimento, até o presente momento, de quatro crianças sem quaisquer sinais de anormalidades. Este caso evidencia, de forma indireta, os progressos e as melhoras que vêm sendo alcançados com a tecnologia de IVM. A maturação *in vitro* de oócitos coletados em ciclos não estimulados é uma metodologia com grande potencial dentro das tecnologias de RA. Como outras metodologias em clínica médica, este procedimento não apresentou inicialmente, resultados encorajadores que recomendassem sua aplicação como uma alternativa às metodologias clássicas empregadas em RA humana utilizando a estimulação ovariana controlada. Um fato comum observado nos ciclos de IVM em diferentes centros que se dedicam ao seu desenvolvimento é a baixa qualidade dos embriões gerados, provavelmente devido às condições inadequadas de maturação e cultivo *in vitro*. Em função deste fato, a média de embriões transferidos em ciclos de IVM é, em geral, superior àquela dos ciclos estimulados de FIV e ICSI (em média 3.31 embriões pos-IVM, em nosso grupo). Publicações recentes, entretanto, dão conta de significativos avanços em termos gestações e implantações após a transferência de embriões gerados em ciclos não estimulados de IVM, avanços estes refletidos também em um aumento no número de gestações múltiplas (Zhao et al., 2009).

Fenômeno semelhante ao que está acontecendo atualmente com a IVM ocorreu cerca de uma década atrás com os resultados de ciclos estimulados de FIV e ICSI. Progressos nos procedimentos de coleta de oócitos, das técnicas de inseminação e de cultivo de embriões levaram a taxas crescentes de gestações múltiplas, um resultado inicialmente não esperado e tampouco desejado pelos obstetras e, principalmente, neonatologistas, dada a complexidade da gestação e os riscos para a saúde dos bebês. Pesquisadores e embriologistas buscaram então desenvolver parâmetros criteriosos para a seleção embrionária que lhes permitisse escolher um ou no máximo dois embriões com maior potencial de implantação e gestação, eliminando a necessidade da transferência de múltiplos embriões, o que potencialmente pode vir a estabelecer gestações múltiplas.

Certamente em nosso grupo, com o aumento significativo das taxas de gestação e implantação observadas nos últimos ciclos de IVM (dados não publicados) e a ocorrência desta primeira gestação múltipla chegou a hora de diminuir o número de embriões de IVM a serem transferidos, apostando na confiabilidade dos critérios de seleção até o momento existentes e empregados em ciclos estimulados. Na finalização deste trabalho detectamos uma gestação gemelar estabelecida após a transferência de quatro embriões de IVM, um ciclo após o descrito neste relato de caso. Esta ocorrência enfatiza a melhora progressiva dos resultados em termos de gestações e implantações e corrobora nossa determinação em relatar os crescentes avanços alcançados na tecnologia de IVM humana. A gestação e o nascimento de quádruplos aqui descritos representam mais um marco em nossos esforços de estabelecer e aprimorar a tecnologia da IVM no Brasil. Certamente eles também nos mostram que esforços agora devem ser canalizados para a redução do número de embriões a serem transferidos, sem prejuízo às taxas de gestação e implantação conquistadas até o momento.

Autor para correspondência:

Adriana Bos-Mikich
Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Sarmiento Leite no. 500, CEP: 90.050-170.
Porto Alegre, RS, Brasil.
Tels: 51. 33083631
51. 33337397
e-mail: adriana.bosmikich@gmail.com

Bibliografia:

- Frantz N, Bos-Mikich A, Frantz G. Gravidez após a maturação *in vitro* de oócitos obtidos sem estimulação hormonal em paciente com ovários policísticos. JBRA. 2008;12: 45-47.
- Rotterdam ESHRE/ASRAM –Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic-criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril 2004; 81: 19-25.
- Scott LA, Alvero R, Leondires M, Miller BT. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum. Reprod. 2000; 15: 2394-2403.
- Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. Fertil Steril 1994; 62: 353-362.
- Veeck L (ed) Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins 1999.
- Zhao J-Z, Zhou W, Zhang W, et al. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril 2009; 91: 2568-2571.

AGENDA DE EVENTOS PARA 2010**MARÇO****3 – 6****19ª Jornada de Ginecologia e Obstetrícia
Maternidade Sinhá Junqueira**Centro de Convenções Ribeirão Preto – São Paulo – SP
sinha@eventus.com.br**11 - 15****Southeastern Section 74th Annual Meeting -
American Urology of Association**Miami Beach, FL
ses@wjweiser.com**26 - 27****Evento Regional Rede Latino-americana de
Reprodução Assistida**Região Brasil - Workshop "Como escrever e publicar
melhor: informação, dicas e técnicas de redação e
publicação científica. Hotel Royal Center, Belo Horizonte-MG
www.redlara.com
selmogeber@origen.com.br**ABRIL****10 – 13****American Society of Andrology (ASA) Annual Meeting**Houston, TX USA
annmarie@wjweiser.com**25th Anniversary EAU Congress**Barcelona, Spain
info@eaubarcelona2010.org**MAIO****22 - 25****16th World Congress of Pediatric and Adolescent
Gynecology
Montpellier, le Corum – FranceMCI France
info@figij2010.com****JUNHO****27 - 30****26th Annual Meeting of the European Society of
Human Reproduction and Embryology
Roma, Italia
www.eshre.com****AGOSTO****5 - 7****Evento Regional Rede Latino-americana de
Reprodução Assistida**Região Guatemala, México e Rep. Dominicana
Tijuana-BC, México
www.redlara.com**25 - 28****XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO
ASSISTIDA****FORTALEZA – CEARÁ BRASIL**
WWW.SBRA.COM.BR**SETEMBRO****17 - 18****Evento Regional Rede Latino-americana de
Reprodução Assistida**Região Colombia, Equador e Venezuela
Quito, Equador
www.redlara.com
mturbina@hotmail.com**22 - 24****43º Congresso de Ginecologia e Obstetrícia do
Distrito Federal**1º Congresso de Ultrassonografia em G. e O. FEBRASGO
Brasília – DF
sgob@ambr.com.br**OUTUBRO****23-27****American Society for Reproductive Medicine, 66th
Annual Meeting**Denver, EUA
www.asrm.org**NOVEMBRO****Evento Regional Rede Latino-americana de
Reprodução Assistida**Região Argentina, Paraguai e Uruguai
Hands on para Biólogos (Super ICSI, Criopreservação,
Anexinas, Falhas de Fertilização)
Buenos Aires, Argentina
www.redlara.com



SBRA

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Venha para a SBRA!

Para ser sócio da SBRA:

**1- Link na pagina www.sbra.com.br, novos sócios,
seguida de emissão de boleto bancário**

**2- depósito direto na conta da sociedade:
R\$ 190,00:O depósito identificado em conta corrente –
Banco do Brasil Ag 3478-9 conta 24886-X
– SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.
Neste caso, notificar a Secretaria virtual pelo site,
preenchendo o re-cadastramento.**

Benefícios aos Associados:

**Recebimento do Jornal SBRA
Desconto na Inscrição para
as reuniões anuais da SBRA**

UTROGESTAN[®]

progesterona natural micronizada

Quando a fertilidade se transforma em maternidade

Fertilidade

- Indução da ovulação.⁽¹⁾
- Insuficiência lútea.⁽²⁾
- Inseminação intrauterina.⁽¹⁾
- FIV e ICSI.⁽¹⁾

Gestação

- Ameaça de aborto.⁽³⁾
- Abortamento habitual.⁽⁴⁾

Contraindicação: este medicamento é contraindicado em doenças graves do fígado.

Interação medicamentosa: o uso crônico de barbitúricos pode diminuir a eficácia de UTROGESTAN[®].

Referências: (1) Posaci C, et al. Progesterone for the luteal support of assisted reproductive technologies: clinical options. Human Reprod. 2000; 15 (Suppl.1): 129-148. (2) Róman E, et al. Analysis of the bleeding pattern in assisted reproduction cycles with luteal phase supplementation using vaginal micronized progesterone. Human Reprod. 2000; 15: 1435-1439. (3) Smits J, et al. A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy supplement. Human Reprod 1992; 7: 168-175. (4) Daya S. Efficacy of progesterone support for pregnancy in women with recurrent miscarriage. A meta-analysis of controlled trials. Br J Obstet Gynecol 1989; 96: 275-80.

Utrogestan[®] (progesterona). **Forma farmacêutica e apresentação:** Cápsulas com 100mg - Embalagem contendo 30 cápsulas, e cápsulas com 200mg - Embalagem contendo 14 cápsulas. **Indicações:** Utrogestan[®] é indicado nos distúrbios da ovulação relacionados à deficiência de progesterona, como alterações do ciclo menstrual e amenorreia secundária (ausência de menstruação), na insuficiência lútea, na deficiência de progesterona, na pré-menopausa e na reposição hormonal da menopausa (como complemento à terapia com estrogênio). Por via vaginal, Utrogestan[®] é indicado também na implantação do embrião e manutenção da gravidez durante o primeiro trimestre. **Contraindicações:** Utrogestan[®] não deve ser administrado em casos de neoplasia maligna de mama ou dos órgãos genitais, sangramento genital não diagnosticado, acidente vascular cerebral, doenças do fígado, aborto incompleto, neoplasia maligna do fígado, doenças tromboembólicas, tromboflebites, porfíria, e hipersensibilidade e/ou alergia a qualquer um dos componentes da fórmula. **Advertências:** Utrogestan[®] não trata todas as causas de aborto espontâneo precoce e, particularmente, não tem ação sobre abortos provenientes de defeitos genéticos. Pacientes que apresentem alguma das condições que possam ser agravadas pela retenção de líquidos (distúrbios cardíacos ou renais), epilepsia, depressão, diabetes, cisto ovariano, disfunção hepática, asma brônquica, intolerância à glicose ou enxaqueca devem ser avaliadas quanto ao risco/benefício. Não é recomendável dirigir ou operar máquinas após a administração deste medicamento. **Interações medicamentosas:** O efeito da progesterona pode ser diminuído pelo uso concomitante de barbitúricos, carbamazepina, hidantoína ou rifampicina. Utrogestan[®] pode aumentar os efeitos dos betabloqueadores, teofilina ou ciclosporina. **Reações adversas:** As reações mais comumente observadas, na administração oral, são distensão abdominal, sonolência, cefaleia, alterações de apetite (diminuição ou perda), aumento ou perda de peso, metrorragia, período menstrual irregular, edema e fadiga. Para a administração vaginal, estudos clínicos não relataram a ocorrência de intolerâncias locais. **Posologia:** Via oral - Na insuficiência de progesterona, a dosagem média é de 200 a 300mg de progesterona micronizada por dia. Na insuficiência lútea, o regime de tratamento usual é de 10 dias por ciclo, habitualmente do 16º dia ao 25º dia, devendo ser usados 200 a 300mg por dia do seguinte modo: 200mg em dose única, antes de dormir; 300mg divididos em duas doses, 100mg duas horas após o despertar e 200mg à noite, ao deitar. Em terapia de reposição hormonal para menopausa, a terapia estrogênica isolada não é recomendada (maior risco de hiperplasia endometrial). Consequentemente, a progesterona é combinada em dose de 100 a 200mg por dia, da seguinte forma: dose única de 100mg à noite antes de dormir, de 25 a 30 dias por mês (neste caso, a maioria das pacientes pode não apresentar sangramento) ou, divididos em duas doses de 100mg, 12 a 14 dias por mês, ou nas últimas duas semanas de cada sequência do tratamento ou, dose única de 200mg à noite antes de dormir, de 12 a 14 dias por mês, ou nas últimas duas semanas de cada sequência do tratamento. Na dose de 200mg, é comum observar um sangramento de privação após o uso da progesterona. Em todas as indicações, a via vaginal pode ser utilizada, nas mesmas dosagens da via oral, em casos de efeitos colaterais pelo uso da progesterona (sonolência após absorção oral). Via vaginal - Cada cápsula gelatinosa deve ser introduzida profundamente na vagina. Suporte de progesterona durante a insuficiência ovariana ou carência ovariana completa de mulheres com diminuição da função ovariana (doação de oócitos): 200mg de progesterona micronizada do 15º ao 25º dia do ciclo, em uma dose ou divididos em duas doses de 100mg e, em seguida; do 26º dia do ciclo ou no caso de gravidez, esta dose pode ser elevada para o máximo de 600mg por dia, divididos em três doses. Esta dosagem será continuada até o 60º dia e, portanto, não deve ser administrada após a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos de fertilização *in vitro* ou ICSI: A dosagem recomendada é de 600 a 800mg por dia, divididos em três ou quatro doses (6/6 ou 8/8 horas), iniciados no dia da captação ou no dia da transferência, até a 12ª semana de gravidez. Suplementação da fase lútea durante ciclos espontâneos ou induzidos, em caso de subfertilidade, ou infertilidade primária ou secundária, particularmente devido à anovulação: a dosagem recomendada é de 200 a 300mg por dia, divididos em duas doses, a partir do 16º dia do ciclo, durante 10 dias. O tratamento será rapidamente reiniciado se a menstruação não ocorrer novamente e sendo diagnosticada uma gravidez, até a 12ª semana desta. Ameaça de aborto precoce ou prevenção de aborto devido à insuficiência lútea: a dosagem recomendada é de 200 a 400mg por dia, divididos em duas doses, até a 12ª semana de gravidez. MS: 1.0390.0167. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SAC 08000-250110. Para ver o texto de bula na íntegra, acesse o site www.fqm.com.br

Material destinado exclusivamente à classe médica.

junho/2010

SE PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.



FAZENDO SONHOS ACONTECEREM

A gravidez sempre é um sonho para os casais. Hoje, existe tecnologia disponível para realizar esse sonho, quando ele não acontece naturalmente.

A **Ferring** contribui para tornar o sonho da gravidez possível a todos os casais através de seus medicamentos para Reprodução Humana.

Saiba mais: www.ferring.com.br

I/0032/Jan10



FALE FERRING
0800 772 4656

Laboratórios Ferring - Brasil
Pça. São Marcos, 624 - 1º andar
05455-050 - São Paulo - Brasil
PABX - 55 11 3024.7500

