

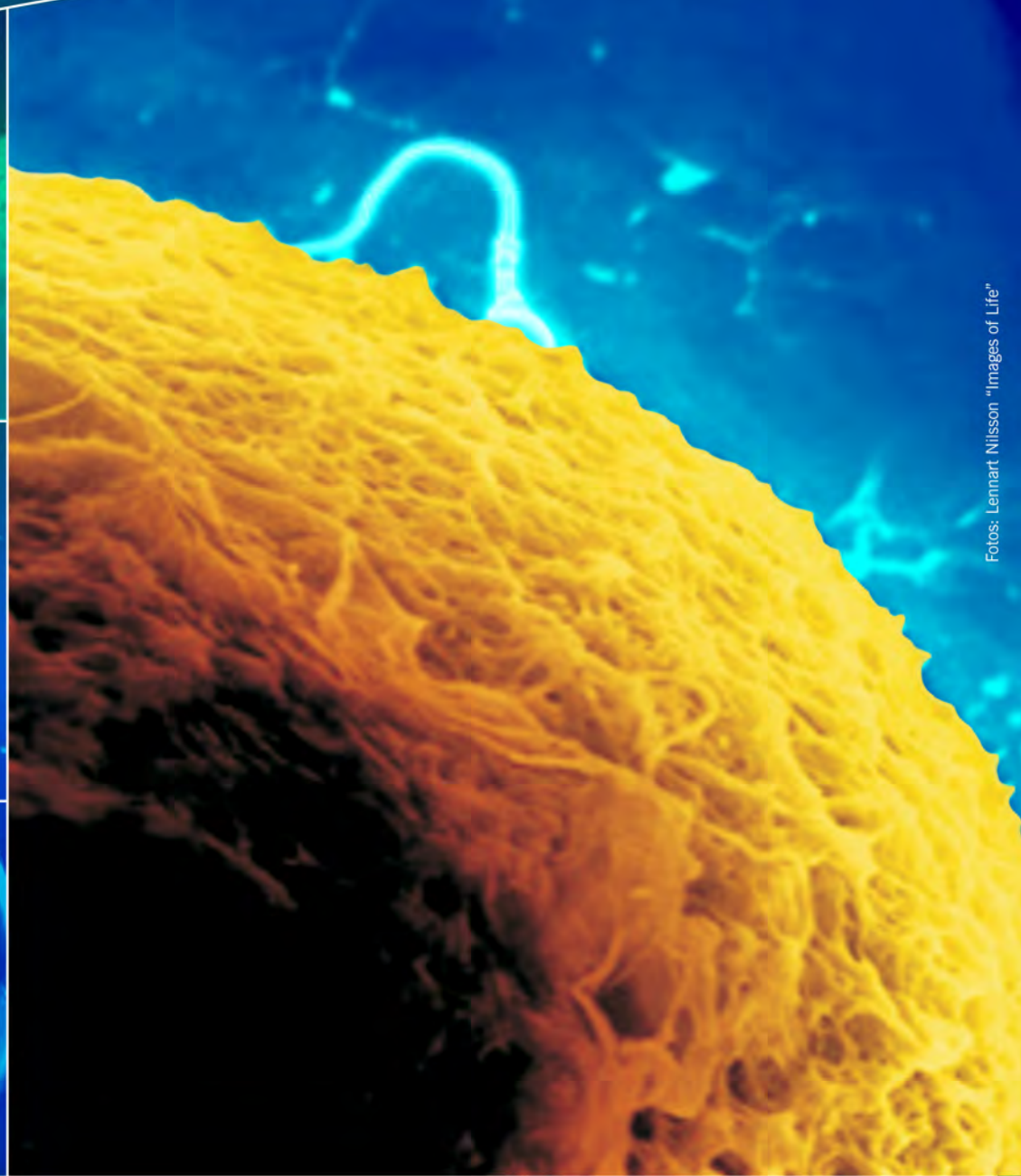
Volume 15  
Number 1  
Jan-Feb 2011  
ISSN 1517-5693

# JBRA

## Assisted Reproduction

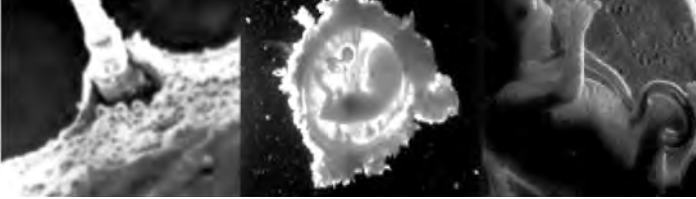


JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"





# JBRA

## Assisted Reproduction

---

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

ISSN: 1517-5693 - V. 15 | nº1 | January-February / 2011

---

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

Compendex

EMBASE

Excepta Médica

Geobase

PERIODICA (México)

Plataforma SCImago Journal & Country Rank

PORTAL DE PERIÓDICOS DA CAPES

Scopus (Holanda)

---

---

**JBRA - Assisted Reproduction**

**Jornalista Responsável:**  
Heber Maia – MTb 31.660

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



**Produção Editorial e Gráfica:**  
AlamTec Tecnologia em Informação LTDA  
Rua Cabo José Clemeneano de Carvalho, 3  
Jardim Avelino CEP 03226-000  
São Paulo-SP  
Tel/Fax: (11) 2341-8045  
e-mail: [alamtec@br.inter.net](mailto:alamtec@br.inter.net)  
[www.alamtec.com.br](http://www.alamtec.com.br)

## CORPO EDITORIAL – EDITORIAL BOARD

### Editor – Editor

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

### Editor Adjunto – Assistant Editor

Paulo Franco Taitson (IRH / PUC MG Brasil)

### Consultor Editorial - Editorial Consultant

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

### Editores Associados – Associate Editors

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

João Batista A Oliveira (CRH SP Brasil)

Selmo Geber (Origen / UFMG Brasil)

Weydson Barros Leal (UFPE Brasil)

## CONSULTORES CIENTÍFICOS –

### Scientific Reviewers

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

Aguinaldo Lopes da Silva Filho (UFMG Brasil)

Alessandro Schuffner (Conceber PR Brasil)

Álvaro Petracco (Fertilitat/ PUC RS Brasil)

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

Anne R Greenlee (OHSU EUA)

Antonio Requena (IVI Madrid Espanha)

Aroldo Camargos (UFMG Brasil)

Bela Zausner (Gênese BA Brasil)

Bruno Scheffer (IBRRA MG Brasil)

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

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

Cesar Cafatti (Clin Los Dominicos Chile)

Claudia Borrero (Conceptum Colombia)

Claudia G Petersen (CRH SP Brasil)

Cláudio Chillik (CEGYR Argentina)

Condesmar Marcondes Filho (Nucl Santista  
RH SP Brasil)

David Vantman (CER Chile)

Dirceu H Mendes Pereira (Profert SP Brasil)

Eduardo Pandolfi Passos (SEGIR / UFRGS RS Brasil)

Ernesto Gallardo Lozano (IMER México)

Fabio Firmbach Pasqualotto (Conception /  
UCS RS Brasil)

Fernando Zegers-Hochschild (Clin Las Condes Chile)

Francisco Risquez (Clin La Trinidad Venezuela)

Francisco J.B. Sampaio (UERJ Brasil)

Humberto Ikuo Shibasaki (UFMT Brasil)

Jorge Blaquier (Fertilab Argentina)

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

Joaquim Roberto C Lopes (Cenafert BA Brasil)

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

Juan Manuel Montoya (Conceptum Colombia)

Ivan Valencia Madera (CEMEFES Ecuador)

Karen Sermon (VUB Bélgica)

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

Leticia Urdapilleta (Cegyr Argentina)

Lídio Jair Ribas Centa (Androlab/ UFPR Brasil)

Luiz Fernando Dale (C Medicina RJ Brasil)

Madalena Caldas (GERAR PE Brasil)

Marcos Sampaio (Origen MG Brasil)

Mariângela Badalotti (Fertilitat PUC RS Brasil)

Marilena Correa (IMS-UERJ Brasil)

Mario Cavagna (H Perola B/ CRH SP Brasil)

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

Newton Eduardo Busso (Unifert SP Brasil)

Paulo Serafini (Huntington/ USP SP Brasil)

Ricardo Melo Marinho (FCMMG MG Brasil)

Roberta Wonchockier (Projeto Alfa SP Brasil)

Roberto Coco (Fecunditas Argentina)

Rose Marie M Melamed (Fertility SP Brasil)

Sidney Glina (Hosp Albert Einstein SP Brasil)

Silvana Chedid Chedid-Grieco (SP Brasil)

Sergio Reis Soares (IVI Lisboa Portugal)

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



---

**DIRETORIA DA SBRA - 2011/2012**


---

**PRESIDENTE**


---

 Adelino Amaral Silva
 

---

**VICE PRESIDENTE**


---

 Edson Borges Júnior
 

---

**SECRETÁRIO**


---

 Paulo Franco Taitson
 

---

**TESOUREIRA**


---

 Hitomi Miura Nakagava
 

---

**DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES****EDITORA**


---

 Maria do Carmo Borges de Souza
 

---

**EDITOR ADJUNTO**


---

 Paulo Franco Taitson
 

---



---

 e-mail: [journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@cmb.com.br)


---

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


---

 Dr. Ernesto Gallardo Lozano
 

---



---

 México
 

---



---

 E-mail: [direjecutiva@redlara.com](mailto:direjecutiva@redlara.com)


---



---

[www.redlara.com](http://www.redlara.com)


---

**VICE DIRETORA EXECUTIVA**


---

 Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
 

---



---

 Brasil
 

---



---

 E-mail: [mariadocarmo@cmb.com.br](mailto: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](mailto:carfelar@infosel.net.mx)


---



---

**REGIÃO:** Bolívia, Chile & Peru
 

---



---

 Dr. Fabrizio Vizcarra Alosilla
 

---



---

 Peru
 

---



---

[favizcarraredlara@gmail.com](mailto:favizcarraredlara@gmail.com)


---



---

**REGIÃO:** Colômbia, Equador & Venezuela
 

---



---

 Dra. María Teresa Urbina
 

---



---

 Venezuela
 

---



---

 E-mail: [mturbina@hotmail.com](mailto:mturbina@hotmail.com)


---



---

**REGIÃO:** Argentina, Paraguai & Uruguai
 

---



---

 Dr. Gabriel Fiszbajn
 

---



---

 Argentina
 

---



---

 E-mail: [fiszbajn@cegyr.com](mailto:fiszbajn@cegyr.com)


---



---

**REGIÃO:** Brasil
 

---



---

 Dr. Selmo Geber
 

---



---

 Brasil.
 

---



---

 E-mail: [selmogeber@origen.com.br](mailto:selmogeber@origen.com.br)


---

**SECRETÁRIA EXECUTIVA**


---

 Marina Diaz
 

---



---

 México
 

---



---

 E-mail: [info@redlara.com](mailto:info@redlara.com)


---



## INFORMAÇÕES GERAIS

1. O JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)) e da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida ([www.redlara.com](http://www.redlara.com)) para conteúdos científicos, com periodicidade 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](http://www.icmje.org). Manuscritos que estiverem em desacordo com as instruções aqui apresentadas serão devolvidos para a incorporação de ajustes antes da avaliação pelo Conselho Editorial.

4. Todo artigo publicado no JBRA Assisted Reproduction passa pelo processo de revisão por especialistas (peer review). Os artigos submetidos são primeiramente encaminhados aos editores para uma avaliação inicial quanto ao escopo do trabalho e às exigências editoriais do Jornal. Se a avaliação é positiva, o artigo é enviado a dois revisores especialistas na área pertinente. Todo o processo é anônimo, ou seja, os revisores são cegos quanto à identidade dos autores e seu local de origem e vice-versa. Após a avaliação do artigo pelos revisores, os artigos podem ser aceitos sem modificações, recusados ou devolvidos aos autores com 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](http://www.actr.org.au), [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), [www.ISRCTN.org](http://www.ISRCTN.org), [www.umin.ac.jp/ctr/index/htm](http://www.umin.ac.jp/ctr/index/htm) e [www.trialregister.nl](http://www.trialregister.nl)). O número de identificação do estudo deverá ser apresentado ao final do resumo.

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

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

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

## TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

Siglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; após a primeira ocorrência, somente a sigla deverá ser utilizada. No resumo, o uso de siglas deve ser evitado.

Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses.

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

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

## PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

## RESUMO E ABSTRACT

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

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

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

### 1. Artigo de periódico

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

### 2. Livro

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

### 3. Capítulo de livro

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

### 4. Artigo de revista eletrônica

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 seqüência: \*,†, ‡, §, ||,¶,\*\*,††,‡‡.

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

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

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

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

## ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

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



## GENERAL INFORMATION

1. JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) is the official publication by both the Brazilian Society of Assisted Reproduction (SBRA – [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)) and the Latin America Network of Assisted Reproduction ([www.redlara.com](http://www.redlara.com)) destined to scientific-based and 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](http://www.icmje.org). Manuscripts not in accordance with the instructions presented herein will be returned for modifications to be made before the Editorial Board has evaluated them.

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

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

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

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

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

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

## TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

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

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

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

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

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

## PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

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

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

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

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

## TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

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

## RESUMO AND ABSTRACT

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

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

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## REFERENCES

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

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

### 1. Journal Article

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

### 2. Book

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

### 3. Book Chapter

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

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

### 4. Electronic Journal Article

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

### 5. Article published in the Internet:

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

### 6. Site

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

### 7. Software

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

## TABLES AND FIGURES

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

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

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

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

Graphs should be two-dimensional only.

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

## MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

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

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

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

## INFORMACIONES GENERALES

1. El JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) es una publicación oficial de la Sociedad Brasileña de Reproducción Asistida (SBRA – [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)) y de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida ([www.redlara.com](http://www.redlara.com)) para contenidos científicos, con periodicidad 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](http://www.icmje.org). Manuscritos que no estén conforme las instrucciones aquí presentadas serán devueltos para la incorporación de ajustes antes de la evaluación por el Consejo Editorial.

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

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

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

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

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

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

## TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARO DE LOS ORIGINALES

Utilice preferentemente Microsoft Word®. Los trabajos deben ser teclados en Times New Roman tamaño 12, espacio sencillo, alineados a la izquierda, iniciando cada sección en página nueva, en el siguiente orden: hoja frontal, resumen y palabras-clave, *abstract* y *keywords*, texto, agradecimientos, listado de referencias, tablas, notas al pie de imágenes e imágenes. Todas las páginas deben de ser numeradas.

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

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

### 1. Artículo de periódico

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

### 2. Libro

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

### 3. Capítulo de libro

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

### 4. Artículo de revista electrónica

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

### 5. Artículo publicado en Internet:

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

### 6. Sitio web

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

### 7. Software

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

## Tablas y figuras

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

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

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

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

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

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

## ENVÍO DE ARTÍCULOS

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

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

---

**Editorial**

- Only two countries prohibit IVF: Costa Rica y Libia**  
 Maria Teresa Urbina  
 ..... 14

---

**Artigo Original**

- Embryo viability after revitrification with Vitri-ingá® method**  
 José Augusto Lucca Neto; Carlos Gilberto Almodin; Vinícius Bonato da Rosa; Vera Lúcia Langaro Amaral; Marcel Frajblat; Vânia Cibele Minguetti-Câmara.  
 ..... 15
- Vasectomia no sistema público de saúde: Características dos candidatos e variáveis associadas**  
 Fábio Castilho Navarro, Fabio Firmbach Pasqualotto, Edson Borges Jr  
 ..... 19
- Use of microarrays Comparative Genome Hybridization for preimplantation genetic screening of poor prognosis patients**  
 Juliana F Cuzzi, Paulo Serafini, Eduardo Motta, José Roberto Alegretti, Péricles Assad Hassun Filho  
 ..... 24
- Identificação do ponto de corte para anticorpos IgG em infecção por *Chlamydia trachomatis***  
 Mônica Canêdo Silva Maia, Mário Silva Approbato, Rodopiano de Souza Florêncio, Tatiana Moreira da Silva, Fabiana Carmo Approbato  
 ..... 28

---

**Artigo de Opinião**

- The safety of IVF: clinical impact of current knowledge.**  
 Karl G Nygren  
 ..... 31
- Porque IVM se temos a IVF?**  
 Adriana Bos-Mikich e Nilo Frantz  
 ..... 33

---

**Artigo de Revisão**

- Bases para criopreservação de espermatozóides e os parâmetros seminais (OMS – 2010)**  
 Paulo Franco Taitson, Eduardo Yoneyama Mourthé, Antônio Mourthé Filho  
 ..... 35
- Endometriose e fertilização *in vitro*. Aspectos atuais**  
 Ivana Rippel Hauer e Vivian Ferreira do Amaral  
 ..... 40

---

**Eventos**

- ..... 45



# Only two countries prohibit IVF: Costa Rica y Libia

The Costa Rican Constitutional Court prohibited embryo cryopreservation first and later IVF in 2001. It noted that IVF leads to "the lost of human lives." However, this also happens to many embryos that are formed during sexual acts, not least because they have chromosomal abnormalities. For 10 years the scientific community has been trying to explain this to the Costa Rican government-without success. Interestingly, researchers in the Costa Rican case can identify only one other country, Libya, that outlaws IVF.

In 2001, the Instituto Costarricense de Infertilidad and several infertile patients sued the Costa Rican government at the Inter-American Commission of Human Rights. Recently, the commission considers that Costa Rica violates human rights and recommended that the government approve a law authorizing IVF and that it should provide compensation to all the couples in the suit. The government seems keen to consent to this ruling.

However, a small but influential religious group is opposing this move. As a result, the new draft law we now have contradicts both human rights and the most basic scientific evidence.

For instance, the new bill proposes that all fertilized eggs created during the IVF process be transferred directly to the uterus. The guidelines and laws in every other country where IVF is regulated instead recommend the transfer of a single embryo, or on rare occasions, two - but never all of them. Costa Rica is moving backwards.

Fertility associations around the world consider transferring all the fertilized eggs to the uterus to be harmful because it can lead to multiple pregnancies and therefore increase subsequent complications, which include premature birth, maternal and child death, cerebral palsy, chronic lung problems, and neurological problems.

In addition, the new law forbids cryopreservation, despite the fact that the latest method - vitrification - results in the survival of all the preserved pre-embryos. So why ban it?

The United Nations rightly considers that freedoms related to expression and belief, and a right to health (broadly defined), and the right to avail of scientific advances are all integral to the human experience. The World Health Organization defines infertility as a disease. Scientists at Harvard University have determined that most people consider having children to be an essential part of their lives. An inability to conceive can lead to severe depression.

Governments have the duty of promote health and the duty to prevent discrimination against people with disabilities. Costa Rica has a wonderful opportunity to show the world that it now understands that true leadership means embracing justice, compassion and a respect for scientific evidence. The Red Latinoamericana de Reproducción Asistida hopes that the government of Costa Rica does the right thing, being a country that respects and promotes human rights.

The Red Latinoamericana de Reproducción Asistida agrees with the recommendation by the Inter-American Commission of Human Rights. In solidarity with specialists and patients in the region, we offer our support to Costa Rica as they seek to resolve the current impasse. We are happy to provide more information about the process, about the latest scientific evidence, international standards and best practices round the world. IVF is a safe and effective medical procedure that engenders wellbeing in our patients. We urge members of the National Costa Rican Assembly to do the right thing for those whom they represent - which includes many thousands of women and men who want nothing more than to bring new life into the world.

**Maria Teresa Urbina**

RED Regional Director

# Embryo viability after revitrification with Vitri-ingá® method

## Viabilidade embrionária pós re-vitrificação pelo método Vitri-ingá

José Augusto Lucca Neto<sup>1</sup>; Carlos Gilberto Almodin, PhD,<sup>2,4</sup>; Vinícius Bonato da Rosa<sup>1</sup>; Vera Lúcia Langaro Amaral<sup>1</sup>; Marcel Frajblat, PhD<sup>1</sup>; Vânia Cibele Minguetti-Câmara, MSc.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALE), Animal Reproduction Department, Rua Uruguai, 458 – Centro, Caixa Postal 360, 88302-202, Itajaí, SC – Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Human Reproduction Department, Rua Botucatu, 740, 04023-900, São Paulo, SP – Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá (UEM), Avenida Colombo, 5790, 87030-121, Maringá, PR – Brazil

<sup>4</sup>Materbaby – Reprodução Humana, Avenida XV de Novembro, 1232, 87013-230 – Maringá, PR – Brazil.

### RESUMO

**Objetivo:** A proposta deste estudo foi avaliar os efeitos da revitrificação no desenvolvimento de embriões de camundongo através do método Vitri-ingá®.

**Materiais e Métodos:** Estudo animal randomizado e *in vitro* foi realizado com fêmeas híbridas (Balb C x C57 Bl/6). Um total de 253 embriões de 2 células foram selecionados e divididos em 3 grupos: G1 embriões frescos, G2 embriões vitrificados e G3 embriões revitrificados. Após o aquecimento os embriões foram cultivados em meio Global® até completarem seu desenvolvimento. Foram comparadas as taxas de blastocisto e eclosão.

**Resultados:** Blastocistos obtidos nos grupos G1 (99,3%) e G2 (88,0%) não foram significativamente diferentes, mas foram significativamente maiores quando comparadas ao meio G3. Não houve diferença significativa nas taxas de eclosão entre os grupos G2 e G3, mas elas foram significativamente menores que a do grupo controle.

**Conclusão:** Apesar do dano cumulativo causado por 2 processos sucessivos de vitrificação, os resultados sugerem que o protocolo de vitrificação de embriões com o método Vitri-ingá® tem potencial para ser rotineiramente usado em laboratórios de reprodução assistida.

**Key Words:** vitrificação, embrião, camundongo, blastocisto, eclosão.

### ABSTRACT

**Objective:** The purpose of this study was to assess the effects of revitrification on the development of mice embryos using the Vitri-ingá® method.

**Methods:** Randomized *in vitro* animal study was performed with Hybrid Balb C x C57 Bl/6 female mice. A total of 253 two-cell embryos were selected and randomly assigned to three groups: G1 fresh embryos; G2 vitrified embryos; and G3 revitrified embryos. After warming, vitrified and revitrified as well as fresh embryos were cultivated in Global® medium until its complete development. Blastocyst and hatching rates were analyzed and compared.

**Results:** Blastocyst rates obtained in groups G1 (99.3%) and G2 (88.0%) were not statistically different, but were both significantly higher when compared to group G3. There were no significant differences in the hatching rates between the groups G2 and G3, but they were both significantly lower than group G1.

**Conclusion:** Despite the cumulative damage caused by two successive vitrification processes, the results found suggest that the embryo revitrification protocol with the

Vitri-ingá® method has the potential to be routinely used in assisted human reproduction laboratories.

**Key Words:** Revitrification; embryo, mice, blastocyst, hatching.

### INTRODUCTION

Since the first successful *in vitro* fertilization (IVF) in humans in 1978, reproductive medicine has rapidly progressed with high rates of success being reported. This important medical advance has led to the necessity to give an appropriate destination to excess embryos. As a result, supranumerary blastocysts are normally cryopreserved in IVF-ET cases, either by slow-freezing methods (Menez, 1992; Gardner 2003) or vitrification (Reed, 2002), which has permitted the transfer of a reduced number of embryos per cycle, avoiding multiple pregnancies and providing the opportunity for more than one transference attempt after just one stimulation cycle (Anderson, 2005). Cryopreservation has also been useful in cases of unexpected sudden cycle cancelling, either due to psychological disturbances of the patient (Özmen, 2006), and the incorrect administration of the prescribed medication (Oakes, 2008). In those special circumstances, when embryos had been cryopreserved and thawed previously, the need of a new cryopreservation procedure emerges.

Recent studies have demonstrated that cryopreservation using different vitrification methods presents better survival (Loutradi, 2008), blastocyst formation, implantation and gestation rates in humans (Balaban, 2008), when compared to the slow-freezing protocol. Vitrification is characterized by the ultra high cooling rates (>10.000 °C/min), in which embryos are immediately immersed into liquid nitrogen either in open or closed systems, after the quick exposition to high concentration of cryoprotectants (Rall & Fahy, 1985; Vajta & Kuwayama, 2006). During this contact, embryos go through rapid cellular dehydration leading to the immediate solidification of the solution due to the high increase of viscosity during cooling (vitrification), avoiding the formation of intracellular ice crystals (Fahy, 1984; Liebermann, 2002). As a result, vitrification of embryos, as well as of oocytes, has recently been widely used in assisted reproduction centers (Selman, 2009).

The revitrification of embryos becomes, therefore, a potentially useful technique in assisted human reproduction centers in special circumstances. However, before suitable human embryo revitrification protocols may be established, animal studies must be carried out in order

to assess the safety and the efficacy of this technique. Hence, the objective of this study was to analyze the revitrification of mice embryos using a new vitrification method (Vitri-ingá®).

## MATERIALS AND METHODS

### Superovulation and embryo collection

Embryos were obtained from 15 hybrid C57 Bl/6 x Balb C female mice 4 to 5 weeks old, which were superovulated with the intraperitoneal administration of 10 IU of eCG (Equine Chorionic Gonadotrophin - Novormon® - Synthex, Buenos Aires, Argentina), followed by 10 IU of hCG (Human Chorionic Gonadotrophin - Vetecor® - Calier, Barcelona, Espanha) 48 hours later. Following the hCG injection, female donors were paired with males of the same strain overnight. In the next morning females were removed from males and checked for the presence of vaginal plug. Forty-four hours later, females were sacrificed by cervical dislocation, and two-cell embryos were collected from the uterine tubes with HTF-Hepes medium (Life Global, USA) + 10% of bovine fetal serum (BFS - Gibco, New York, USA) (Bertolini, 2005). A total of 253 two-cell embryos were morphologically assessed and selected according to number, as well as the degree of fragmentation and uniformity of blastomeres, as described elsewhere (Roberston & Nelson, 1998), and randomly allocated to the experimental groups.

### VITRI-INGÁ® METHOD

Both the vitrification and revitrification of embryos in this study followed the protocol established by the Vitri-ingá® method, described below (Fachini, 2008). All the equipment and materials used for the vitrification/thawing procedures were supplied by Ingámed Ltda. (Perobal, PR, Brazil) and consisted of: the Vitri-Equip, an expanded polystyrene box (44.0 x 19.5 x 15.0 cm) containing 2 stainless-steel containers of different sizes for liquid nitrogen; one container measuring 18.5 x 6.0 x 8.8 cm, in which there is a small stainless-steel rack for cooling straws, and another one measuring 5.3 x 5.3 x 10.0 cm for vitrification (Figure 1); the vitrification solutions VI-1 and VI-2; the warming solutions DV1, DV2, and DV3; the vitrification strip, an apparatus consisted of a fine, very thin polypropylene film (0.7 mm thick) with a specially designed round tip, in which there is a minute hole to receive the embryo, connected to a hard and thicker plastic handle (Figure 2); and the protective plastic sheaths. Definition of groups

**G1 (Control):** After collection, embryos ( $n = 87$ ) were immediately placed into microdrops (10 embryos/drop) of 30 $\mu$ L of Global medium (LifeGlobal®, USA) supplemented with 10% BFS and cultivated for 120 hours.

**G2 (Vitrified):** Immediately after collection, embryos ( $n = 82$ ) were initially placed into 200  $\mu$ L of VI-1 solution and equilibrated for 8 to 15 minutes. After that, groups with three embryos each were immersed into three consecutive 20  $\mu$ L drops of VI-2 solution, remaining for 20 seconds in each one, and immediately placed into the hole of the vitrification strips. Excess medium was aspirated and the strips were directly immersed into liquid nitrogen. The total time from the moment embryos were placed into the vitrification solution until its immersion into liquid nitrogen was between 50 to 60 seconds. The plastic sheaths, which had been previously cooled for at least two minutes in liquid nitrogen vapour on the metal rack inside in the Vitri-Equip, were vertically immersed into liquid nitrogen. The Vitri-Ingá strips with the vitrified embryos was then individually inserted into the plastic sheaths for safe storage, and transferred to a liquid nitrogen tank.

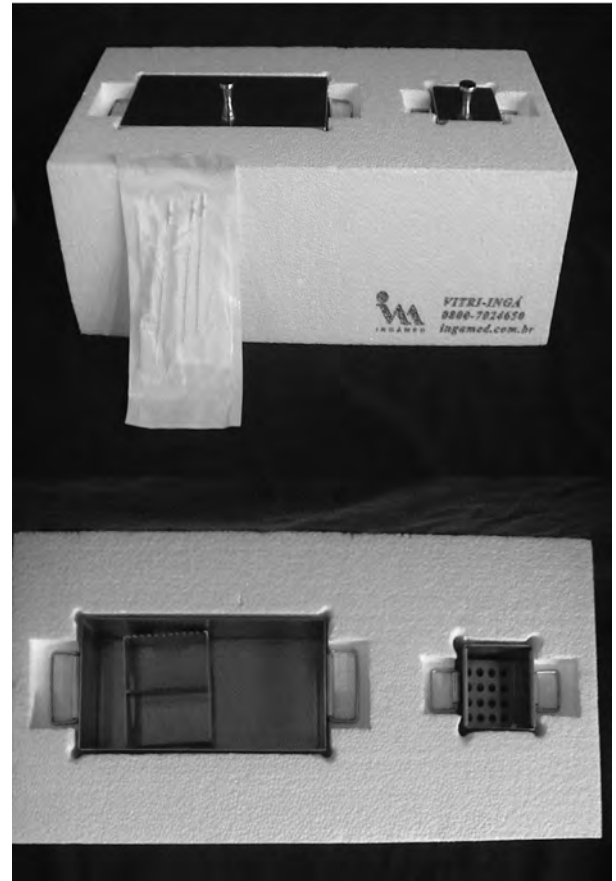


Figure 1: Vitri-Equip: Expanded polypropylene box with 2 stainless steel containers for cooling and vitrification

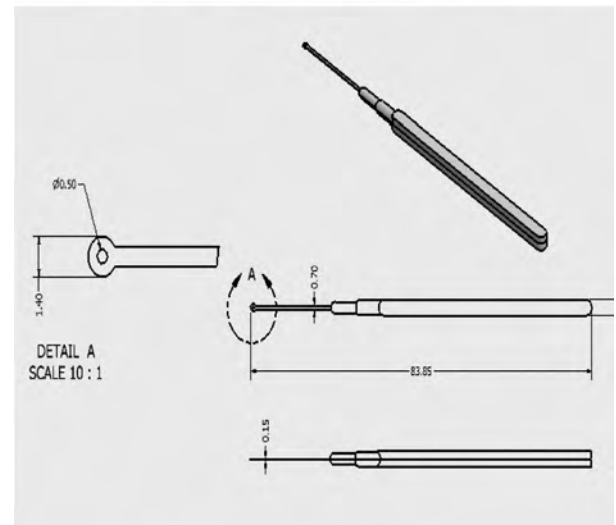


Figure 2: Vitri-Ingá vitrification strip and protective sheath

**Table 1.** Comparison of blastocyst and hatching rates between groups G1 (control), G2 (vitrified), and G3 (revitrified).

Groups	# Embryos	Blastocyst rate (%)	Hatching rate (%)
G1 (control)	87	99.3 ± 0.7 <sup>(a)*</sup>	92.7 ± 1.9 <sup>(a)**</sup>
G2 (vitrified)	82	88 ± 7.3 <sup>(a)*</sup>	66.5 ± 3.1 <sup>(b)**</sup>
G3 (revitrified)	84	75.3 ± 4.7 <sup>(b)*</sup>	57.4 ± 6.4 <sup>(b)**</sup>

Same letters are not statistically different ( $p < 0.05$ ). \*  $p = 0.004$ . \*\*  $p = 0.0001$

Embryos remained cryopreserved for at least 24 hours. During warming, the strips were removed from the protective sheaths and immediately plunged into DV-I warming solution for 1 minute at 37°C. Recovered embryos were transferred to 100µL of DV-II solution for 3 minutes at room temperature and finally kept for 5 minutes in each one of the 2 drops containing 100µL of DV-III solution for rinsing (Vajta & Nagy, 2006). Warmed embryos were placed into culture following the same protocol used by group G1. All vitrification / warming procedures were carried out in room temperature.

**G3 (Revitrified):** Embryos ( $n = 84$ ) were vitrified and warmed as for group G2, and cultivated for 24 hours as for G1. Embryos that presented cleavage were revitrified, as described above, and at least 24 hours later rewarmed and placed into culture for another 96 hours.

Assessment criteria and statistics

Post-vitrification viability, blastocyst and hatching rates were analyzed using Anova followed Tukey's test. Results with  $p < 0.05$  were considered significant. Embryos were considered viable when after rehydration presented  $\geq 50\%$  of whole blastocysts and intact zona pellucida. Blastocyst rates were recorded for embryos that initiated the cavitation process, and hatching rates in the presence of zona pellucida rupture.

## RESULTS

Blastocyst and hatching rates obtained in this study are presented in table 1. Group G1 (control) presented blastocyst and hatching rates of  $99.3 \pm 0.7\%$  and  $92.7 \pm 1.9\%$ , respectively. In group G2 (vitrified), 98% of embryos survived the vitrification process, among which  $88 \pm 7.3\%$  reached blastocyst stage and  $66.5 \pm 3.1\%$  hatched. In Group G3 (revitrified), 95% and 81% of embryos survived the first and the second vitrification processes, respectively. Blastocyst and hatching rates after revitrification were (75.3%) and (57.4%), respectively.

There were no statistically significant differences in the blastocyst rates between groups G1 and G2. However, embryos in group G3 presented blastocyst rates significantly lower to the other groups ( $p = 0.004$ ). Embryos in group G1 presented an excellent hatching rate (99.3%) after 5 days in culture, which was significantly higher when compared to groups G1 and G2 ( $p = 0.0001$ ), with no significant differences being observed between G2 and G3.

## DISCUSSION

The current study assesses the effects of revitrification on murine embryos using the Vitri-ingá® method by comparing blastocyst and hatching rates to those of fresh (control) and vitrified murine embryos. This study shows the potential of revitrification as a routine procedure in assisted human reproduction centres. Our objective in this study was to obtain reliable data concerning the embryo survival after going through the vitrification process twice. For this reason we have opted for the first vitrification process with cleaved embryos in two-

blastomere stage. After warming, embryos were kept in culture for 24 hours until evolving to four to eight-cell stage, after which re-vitrification was carried out. After the second warming, embryo viability was evidenced by embryo development up to blastocyst stage.

Vitri-ingá® is a novel vitrification method similar to the Cryotop method (Kuwayama, 2005). The main difference between these methods is the minute hole at the tip of Vitri-ingá's thin plastic stem in which embryos are lodged during vitrification. This method facilitates the removal of excessive cryopreservation solution by aspiration, leaving just 0.1 µl around the embryo and permitting cooling rates of 22,800 °C/min (Kuwayama, 2005). The Vitri-ingá method was initially tested in an animal study, which presented a survival rate of 86% after vitrification/thawing of bovine oocytes matured in vitro (Almodin, 2008). Additionally in another study, this time using human oocytes, the Vitri-Ingá method again demonstrated good results with survival, fertilization and pregnancy rates of 80.5%, 76.6% and 24.5%, respectively (Fachini, 2008). One of the possible criticisms of the vitrification technique using Vitri-Ingá is the fact that it is an open system, i.e., the oocyte is placed into direct contact with liquid nitrogen during vitrification. This raises the issue concerning the theoretical possibility of contamination by liquid nitrogen. Although the risk of contamination by liquid nitrogen contact must be taken into consideration, no documented cases of diseases transmitted due to the transference of vitrified embryos have been reported. The development of a technique using a hermetically sealed vitrification device could eliminate the potential risks of contamination.

The need for doubly cryopreserving embryos has emerged out of punctual needs in human reproduction centers such as psychiatric problems that occurred during the second attempt after cryopreserved embryos had already been thawed (Özmen, 2006), incorrect administration of prescribed drugs (Oakes, 2008), or blastocysts that were unduly thawed because of a clinical error (Son, 2005). Due to ethical and legal reasons, warmed embryos must have an adequate destination and a new cryopreservation procedure becomes necessary.

There are several reports in the literature of successful pregnancies obtained with human embryos that were cryopreserved twice. In recent a study using the slow-freezing method, the authors reported a gestation rate of 35% in a group of 14 patients when embryos in the 2 pronucleus (2PN) stage were doubly cryopreserved (Sills, 2009). In another recent study, 27 human embryos originated from 15 assisted fertilization cycles were revitrified in the 4 to 8 cells stage, with 96% of blastocysts surviving the procedure and being transferred to patients, with an implantation rate of 35%, and gestation confirmed in 47% of cases (Hiraoka, 2007). Despite this success, these have been mostly case reports, following no previously defined methodologies, which make a comparative analysis difficult.

Animal reports show that blastocyst rate for mice embryos vitrified in the two-cell stage vary, between 52 and 90%, with no significant differences when compared to controls (Graves-Herring & Boone, 2009; Uechi 1999; Miyake, 1993; Mello, 2001), which is in accordance with the present study. The hatching rate drop for vitrified embryos is always observed but it does not seem to be related either to the protocol, as it also occurs with slow-freezing protocol, nor with the different cryoprotectants used (Sheehan, 2006; Ramezani, 2005). Possibly, this decrease may be linked to the stress that the embryo is submitted to after the exposition to low temperatures,



the hardening of the zona pellucida, or even the toxicity of cryoprotectants.

Although studies carried out in murine (Ramezani, 2005) and bovine (Gómez, 2009) embryos report that vitrification and re vitrification result in lower numbers of cells in the blastocyst, authors believe that this decrease does not negatively influence embryo development (Vitale, 1997). Lower hatching rates for murine embryos vitrified consecutive times have been associated to zona pellucida hardening, as the number of cells in the blastocysts was not different from non-vitrified embryos (Ramezani, 2005). Possibly, the reduction in the number of cells and zona pellucida hardening may have contributed to the lower hatching rates observed in this study.

Despite the observed cumulative damage caused by the two vitrification processes, blastocyst and hatching rates of 75% and 57% were obtained in this *in vitro* murine study. These results suggest that the embryo re vitrification protocol with the Vitri-Ingá® method has the potential to be used in assisted human reproduction laboratories when the circumstances may demand it. Nonetheless, in order that this technique may be used with greater efficiency and safety, further assessments investigating the damages caused on the embryo by the first and the second vitrification process must be performed.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The Vitri-Ingá® equipment used in this study was provided to Universidade do Vale do Itajai (Univale) without charge by Ingamed Ltda (Perobal – Pr- Brazil)

#### Corresponding author:

Carlos Gilberto Almodin  
Av. XV de Novembro, 1232 – 87013-230  
Maringá, PR – Brazil.  
Phone: 55 44 32243992 / Fax: 55 44 32251162  
Email: almodin@materbaby.com.br

#### References

Almodin CG, Câmara VCM, Oliveira LM, Picada IE, Seko MB, Moron AF. Vitrificação em modelos bovinos: modelo de treinamento. *J Bras Reprod Assist* 2008;12(3):20-3.

Anderson AR, Wilkinson SS, Price S, Crain JL. Reduction of high order multiples in frozen embryo transfers. *Reprod Biomed Online* 2005;10:402-5

Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Human Reprod* 2008;23:1976-82.

Bertolini M, Lange M C, Rodrigues J L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005;33:245-51.

Fachini FC, Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Moron AF, Nakano R, Shimabukuru L. Vitri-Ingá: Um novo protocolo de vitrificação. *J Bras Reprod Assist* 2008;12:16-19.

Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984;2:407-26.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocysts viability. *Fertil Steril* 2003;79:407-10.

Graves-Herring JE, Boone WR. Blastocyst rate and live births from vitrification and slow-cooled two-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 2009;9:920-4.

Gómez E, Muñoz M, Rodríguez A, Caamaño JN, Facal N, Díez C. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro* inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reprod Domest Anim* 2009;44:194-9.

Hiraoka K, Fuchiwaki M, Hiraoka K, Horiuchi T, Murakami T, Kinutani M, Kinutani K. Re-cryopreservation by vitrification of human blastocysts developed from frozen-cleaved embryos: A report of 15 cycles. *J. Mamm. Ova. Res.* 2007, 24:23-28.

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;11(3):300-8.

Liebermann J, Nawroth F, Isatchenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker M. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;67:1671-80.

Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis, BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;90:186-93.

Mello MR, Queiroz VS, Lima AS, Tavares LT, Assumpção ME, Wheeler MB, Visintin JA. Cryopreservation of mouse morulae through different methods: slow-freezing, vitrification and quick-freezing. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001;38:160-4.

Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured blastocysts. *Fertil Steril* 1992;58:977-80.

Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993;40:121-34.

Oakes MB, Gomes CM, Fiovaranti JF, Serafini P, Motta ELA, Smith GD. A case of oocytes and embryo vitrification resulting in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2008;90:2013.e5–2013.e8.

Özmen B, Schultze-Mosgau A, Schöpfer B, Griesinger G, Diederich K, Al-Hasani S. Ongoing pregnancy after re-vitrification of cleavage stage embryos. *Middle East Fertility Society Journal*. 2006;11:222-5.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-5.

Ramezani M, Valojerdi MR, Parivar K. Effect of three vitrification methods on development of two-cell mouse embryo. *Cryoletters* 2005;26:85-92.

Reed ML, Lane M, Gardner DK, Jensen NL, Thompson J. Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:304-6.

Roberston I. & Nelson R.E. 1998. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM, eds. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd ed. Savoy, IL: IETS Inc., 1998:103-34.

Selman H, Brusco GF, Fiorini F, Barnocchi N, Mariani M, El-Dana-souri I. Vitrification is a highly efficient method to cryopreserve human embryos in *in vitro* fertilization patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2009;91:1611-13.

Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The cryoloop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Human Reprod* 2006;2:2978-84.

Sills ES, Murray GU, Genton MG, Walsh DJ, Coull GD, Walsh APH. Clinical features and reproductive outcomes for embryos undergoing dual freeze-thaw sequences followed by blastocyst transfer: critique of 14 consecutive cases in IVF. *Fertil Steril* 2009;91(4):1568-70.

Son WY, Lee SY; Chang MJ, Yoon SH, Chian RC, Lim JH. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by *in-vitro* matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2005;10(3): 398-401.

Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Takai Y, Taketani Y. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. *Human Reprod* 1999;14:2827-32.

Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236-44.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online* 2006;12(6):779-9.

Vitale NJ, Myers MW, Denniston RS, Leibo SP, Godke RA. *In-vitro* development of refrozen embryos. *Human Reprod* 1997; 12: 310-316.



# Vasectomia no sistema público de saúde: Características dos candidatos e variáveis associadas

## Vasectomy in the public health system: Characteristics of candidates and associated variables

Fábio Castilho Navarro<sup>1</sup>, Fabio Firmbach Pasqualotto<sup>2</sup>, Edson Borges Jr<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Urologista, Membro Titular da Sociedade Brasileira de Urologia e pós-graduado lato-sensu pelo Instituto Sapientiae - Centro de Estudo e Pesquisa em Reprodução Humana Assistida.

<sup>2</sup> Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil, Pesquisador do CNPq, Diretor da CONCEPTION, Centro de Reprodução Humana, Caxias, RS, Pesquisador Colaborador do The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, EUA

<sup>3</sup> Fertility - Centro de Fertilização Assistida e 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

Trabalho executado no Hospital Municipal de Araçatuba "Hospital da Mulher" - Araçatuba - SP

Apoiado pela Prefeitura Municipal de Araçatuba-SP

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Associação Instituto *Sapientiae* - Centro de Estudo e Pesquisa para obtenção do título de Especialista em Reprodução Humana Assistida - Módulo Clínico.

### RESUMO

**Objetivo:** Este estudo objetivou caracterizar os pacientes submetidos à vasectomia no sistema público de saúde de Araçatuba-SP e estudar as variáveis associadas.

**Métodos:** Foram pesquisados 300 prontuários de pacientes vasectomizados e contatados por telefone para avaliação de diversas características. As variáveis verificadas para o estudo foram: idade, estado marital, escolaridade, religião, renda mensal familiar e per capita, número de filhos vivos, motivo da procura pelo método, o uso de contraceptivos, qualidade do relacionamento conjugal, tempo de decisão (data de intenção até a realização do procedimento) e a causa da não realização do procedimento. Os dados foram agrupados para análise dos resultados.

**Resultados:** A idade dos homens variou de 23 a 65 anos (média de 36,86 anos) e média de filhos vivos de 2,56. A renda familiar média mensal era de R\$ 1079,15, com renda per capita média de R\$ 249,07. A anticoncepção do casal antes do procedimento ficava por conta da mulher que utilizava de medicação anti-concepcional oral (84%). O índice de complicações com o método girou em torno de 6,04%, sendo a maior complicação a deiscência (77,7% dos casos de complicações), sendo estes principalmente nos 100 primeiros casos.

**Conclusão:** A vasectomia é um método contraceptivo bastante eficaz, com baixo índice de complicações e baixo custo, devendo ser estimulado pelo sistema público de saúde como forma de política de planejamento familiar.

Palavras-chave: Vasectomia, anticoncepção, esterilização reprodutiva, planejamento familiar

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to characterize candidates undergo vasectomy in the public health system, Araçatuba-SP and to study related variables.

**Methods:** We surveyed 300 medical patients and vasectomized contacted by telephone to assess several characteristics. The variables analyzed for the study were age, marital status, education, religion, monthly family

income and per capita, number of living children, reason for seeking treatment method, contraceptive use, marital relationship quality, decision time (date of intent to perform the procedure) and not because of the procedure. Data were pooled for the analysis of results.

**Results:** The age of the candidates ranged from 23 to 65 years (mean 36.86 years) and average 2.56 living sons. The average monthly family income was R\$ 1.079,15, with average per capita income of R\$ 249,07. The couple's contraception before the procedure was on account of the woman who used oral anti-conception (84%). The complication rate with the method was around 6.04%, the biggest complication was dehiscence (77.7% of cases of complications), these being mainly during the first 100 cases.

**Conclusion:** Vasectomy is a very effective contraceptive method, with low complication rate and low cost, should be encouraged by the public health system as a means of family planning policy.

**Keywords:** vasectomy, contraception, reproductive sterilization, family planning

### INTRODUÇÃO

O planejamento familiar, o controle da natalidade e o acesso aos métodos contraceptivos são um grande problema de saúde pública (Trollip, 2009; Eisenberg, 2009). A vasectomia é um dos mais simples e efetivos métodos de esterilização cirúrgica e vem sendo há mais de um século (Chen, 2004). Apresenta baixo custo, rápida recuperação quando comparada a laqueadura tubária feminina, porém alguns homens associam à castração, disfunção erétil, além do medo do procedimento (Li, 1991; Liu, 1993; Lara, 1997).

Em março de 2008 foi iniciado um programa de controle de natalidade na cidade de Araçatuba-SP, até então inédito, ofertando o procedimento através do SUS (Sistema Único de Saúde), com incentivo do Governo Federal (Portaria 1945/2009) e da Prefeitura Municipal de Araçatuba, em conformidade com a Lei do Planejamento Familiar No. 9263, proporcionando acesso aos homens com

menor poder aquisitivo para o procedimento. Embora esteja claro na Constituição Federal de 1988 que o Estado deva ofertar a possibilidade do indivíduo de decidir pelo Controle de Natalidade (Constituição da República Federativa do Brasil, 1988), são poucos os municípios ou serviços que a oferecem gratuitamente; talvez por falta de estímulo governamental ou remuneração inadequada (Vieira, 2001).

Devido à possibilidade de arrendimento do paciente, o que ocorre entre 11% e 15% (Minella, 1998; Vieira, 1997), a oferta de procedimentos gratuitos pode aumentar essas taxas; daí então a conscientização da vasectomia, já que a reversão apesar de plausível, é onerosa, difícil e com resultados ao redor de 50% (Robb, 2009). Considerando a resolução CFM No. 1901/2009, publicada no DOU de 21 de Julho de 2009, Seção I, p 96, que estabelece normas éticas para esterilização masculina, é importante transcrever o art 4º:

Art 4º. O médico que se propõe a realizar procedimento de esterilização masculina deve estar habilitado para proceder a sua reversão.

Portanto, deve ser realizado por urologista capaz de reverter o procedimento, ou seja, que seja qualificado para tanto. Acontece que muitos pacientes procuram os consultórios médicos de especialistas para realização do procedimento, portanto tendo que arcar com os seus custos.

Mesmo no caso de mulheres que gostariam de se submeter à laqueadura, o que ocorre é que frequentemente estas têm que pagar (Vieira, 1995) ou devem favores políticos (Caetano, 2000), seja numa cirurgia eletiva ou no momento de uma cesárea.

Este estudo objetivou caracterizar os homens submetidos a vasectomia no sistema público de saúde de Araçatuba-SP e estudar as variáveis associadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os pacientes interessados na inclusão do programa de esterilização cirúrgica procuravam uma UBS (Unidade Básica de Saúde) e passavam por avaliação com urologista para saber se o indivíduo se encaixava nos critérios da Lei do Planejamento Familiar e, caso afirmativo, era encaminhado para psicólogo e assistente social, no intuito de se efetuar o desencorajamento da esterilização precoce. Caso o paciente desejasse realmente a realização do procedimento, após 60 (sessenta) dias da indicação, entrava em uma lista única e era submetido à vasectomia.

Os procedimentos foram todos realizados no Hospital Municipal de Araçatuba no período de Março de 2008 a Março de 2010.

As variáveis verificadas para o estudo foram: idade, estado marital, escolaridade, religião, renda mensal familiar e per capita, número de filhos vivos, motivo da procura pelo método, o uso de contraceptivos, qualidade do relacionamento conjugal, tempo de decisão (data de intenção até a realização do procedimento) e a causa da não realização do procedimento.

Além disso, foram avaliados tempo cirúrgico, complicações pós-operatórias, uso ou não de medicação no pós-operatório, arrendimento e grau de satisfação com o procedimento.

Os pacientes eram submetidos à **cirurgia ambulatorialmente** e recebiam atestado por um período de 03 (três) dias de repouso (CID – Z30.2) e eram orientados aos cuidados de higiene local, bem como colocação de gelo local por 20 (vinte) minutos de 8/8 horas no período de repouso. Eram prescritos antibiótico (cefalexina) e anti-inflamatório (diclofenaco) por um período de 07 (sete) dias, sendo retirados na UBS gratuitamente, devido ao risco de

infecção aumentada pelo baixo nível sócio-econômico e a dificuldade de higiene local.

Além disso, um pedido de espermograma era fornecido para ser realizado 60(sessenta) dias após o procedimento, tendo no mínimo 12 (doze) ejaculações. O espermograma de controle era trazido ao hospital, sendo que quando demonstrava azoospermia, o paciente era liberado para relação sexual sem métodos anticoncepcionais.

Todos os pacientes foram submetidos à **cirurgia ambulatorial** pelo mesmo cirurgião e reavaliados 07 (sete) dias após o procedimento. Aqueles que não retornavam eram automaticamente excluídos do estudo.

Os pacientes foram informados pelo cirurgião sobre os riscos, dificuldade da reversão e da esterilização permanente. Assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e Registro de Expressa Manifestação de vontade.

### Técnica Operatória

Realizado isolamento do ducto deferente com a técnica dos três dedos, procedia a bloqueio local com lidocaína 2%, com volume de 3 ml e abertura da pele e fâscias com bisturi lâmina 15. Utilizava-se uma pinça de apreensão de deferente e o mesmo era dissecado com pinça de Kelly curva.

Quando totalmente isolado o ducto era seccionado com bisturi. Os cotos deferenciais eram ligados com fio inabsorvível (nylon 3.0). Após revisão da hemostasia, a pele era fechada com catgut 3.0 simples. Procedimento semelhante era realizado no ducto deferente contra-lateral e finalizado com curativo com micropore.

### Avaliação per-operatória

O tempo foi contado a partir do bloqueio anestésico até o curativo. O tamanho da incisão foi em média menor que 1 cm e em muitas vezes puntiforme, sendo suturadas. Em nenhum paciente foi necessária a ampliação da incisão.

### Avaliação pós-operatória

A avaliação pós-operatória foi realizada após sete dias do procedimento no Hospital Municipal de Araçatuba, sendo avaliados presença de hematoma, infecção, orquiepididimites, dor e/ou incômodo e deiscência. Foram avaliados uso de analgésicos e tempo de repouso. Os pacientes que não retornaram em sete dias foram excluídos do estudo. Os pacientes foram orientados a não realizar o exame antes de pelo menos 60 (sessenta) dias e no mínimo 12 ejaculações.

Os dados foram coletados em Julho de 2010 pelo pesquisador através de questionário realizado via telefone e levantamento dos prontuários dos pacientes pela enfermeira (anexo 1). Os pacientes tinham em média 480 dias de operados (123-832 dias).

Os pacientes que apresentaram espermograma positivo (presença de espermatozóides vivos) foram submetidos à nova análise seminal e os que permaneceram férteis na segunda amostra foram submetidos à nova vasectomia. A causa da falha não foi avaliada.

## RESULTADOS

Dos 300 pacientes avaliados, em 2 (0,6%) não foi possível realizar o procedimento, um por apresentar escroto plano e obesidade e em outro por apresentar criptorquidia unilateral (inguinal alta), sendo, portanto, excluídos do estudo devido às dificuldades técnicas. Duzentos e noventa e oito pacientes foram avaliados.

### Características gerais

A idade dos homens variou de 23 a 65 anos, sendo a idade média 36,86 anos; 72,66% eram casados, 24,66% viviam em união consensual e o 2,68% eram solteiros. Quanto ao número de casamento/relacionamento estável, 88% estavam no 1º, 10% no 2º e 2% no 3º relacionamento / casamento. Em relação à escolaridade, 69,66% tinham o primeiro grau, 27% o segundo grau completo.

Nenhum paciente estava cursando ou já tinha terminado o grau superior. A renda familiar média mensal calculada foi de R\$ 1079,15, sendo a mínima de R\$ 430,00 e a máxima R\$ 3.500,00 mensais. A renda familiar *per capita* média mensal calculada foi de R\$ 249,07, sendo a mínima R\$ 85,00 e a máxima, R\$ 1183,00. O número médio de filhos vivos foi 2,56, variando de 1 a 6. Em relação à religião, a maioria (70%) identificou-se como católica.

#### Contraceção

O uso anterior de anticoncepcional oral pela esposa foi relatado por 84% dos homens e 13% referiram o uso do preservativo masculino. Dos homens restantes, 2% utilizavam anticoncepcional injetável e 1% coito interrompido.

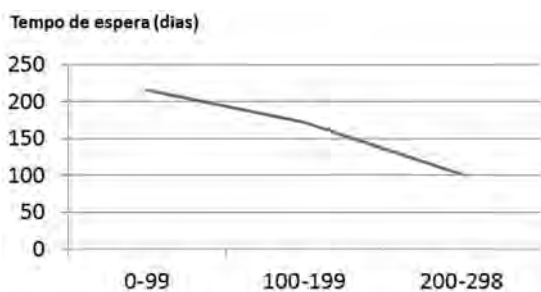
#### Motivo da procura do método cirúrgico

Dos homens que procuraram os métodos cirúrgicos, 93% o fizeram por estarem satisfeitos com o número de filhos que tinham; 6% pelas esposas terem problemas de saúde; 1% revelou não querer mais filhos por dificuldades financeiras. Todos os casais candidatos referiram ter bom relacionamento conjugal.

#### Aconselhamento

O tempo médio entre a intenção e a realização do procedimento foi 148,04 dias. Excluindo-se este, o tempo mais curto entre a manifestação da vontade e o procedimento foi 61 dias, e o mais longo, 421 dias. Todos os pacientes passaram com o assistente social e o psicólogo antes da realização do procedimento. O tempo médio vem apresentando queda, sendo de 81 dias nos últimos 50 casos, como demonstrado no **Gráfico 1**.

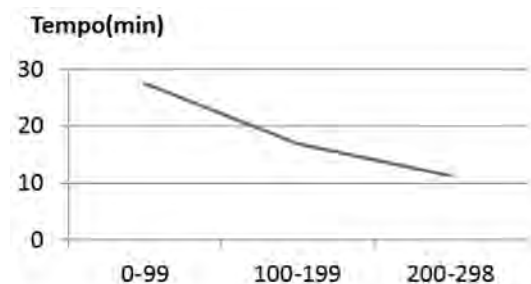
**GRÁFICO 1** – Tempo médio de espera entre o aconselhamento (dias) e a realização do procedimento (No. de casos).



#### Procedimentos realizados

O tempo cirúrgico médio nos 298 casos foi de 13,8 minutos (7-42), porém tem apresentado queda, como demonstrado no **Gráfico 2**.

**GRÁFICO 2** – Avaliação do tempo cirúrgico da vasectomia (minutos) pelo número de casos.



Apenas 12 pacientes (4%) referiram dor ou desconforto no per-operatório. O índice de complicações foi de 6,04%; destes 77,7 % era deiscência, 11,15 % hemato-

ma e 11,15% infecção local; nenhum paciente necessitou de intervenção cirúrgica para correção de complicações. 72,3% das complicações ocorreram nos primeiros 100 casos, vindo a apresentar decréscimo. Noventa e sete por cento dos pacientes utilizaram a medicação prescrita no pós-operatório. O grau de satisfação foi de 29% muito contente, 71% contente, 1 paciente insatisfeito e nenhum desapontado. Nenhum paciente se arrependeu do procedimento.

#### Espermograma pós-operatório

Quarenta e nove por cento dos pacientes não fizeram o espermograma de controle, sendo orientados a fazê-lo e fornecido novo pedido. Destes, apenas 3% retornaram com o espermograma para reavaliação. O índice de falha do procedimento foi de 0,78 %, sendo todos estes pacientes reoperados com sucesso. Houve 1 caso com gestação que o paciente não fez o espermograma de controle;

#### Associações entre variáveis

As variáveis: idade, escolaridade, estado marital, renda *per capita*, número de filhos, religião, histórico de aborto e qualidade do relacionamento foram selecionadas como possíveis fatores de influência na decisão do casal para a escolha do método cirúrgico.

##### • Idade

Apenas três homens abaixo de 25 anos foram esterilizados, por apresentar número adequado de filhos (2), em conformidade com a lei; 45,63% dos homens tinham até 35 anos (sendo 5,88% destes com até 25 anos), 26,47% de 26 a 30 anos e os demais entre 31 e 35 anos.

##### • Idade X número de filhos

A média de idade dos pacientes com 1 filho submetidos a vasectomia foi de 40,86 anos (28-49 anos) – total de 24 pacientes; a com 4 filhos 41,23 anos – total de 22 pacientes; a com 5 filhos 39,8 anos – 9 pacientes e a com 6 filhos 36,8 anos – 2 pacientes. Os pacientes com 2 e 3 filhos tinham idade semelhante a média geral.

##### • Tempo da cirurgia até a realização do espermograma

Onze pacientes fizeram o espermograma antes de ao menos 12 ejaculações e 60 dias, todos demonstrando azoospermia, sendo 1 com 45 dias, 1 com 37 dias e 1 com 27 dias e 8 homens após 50 dias.

##### • Número de filhos X renda familiar e per capita

Os pacientes com 1 filho totalizavam 24 casos, com 4 filhos 22 casos, com 5 filhos 9 casos e com 6 filhos 2 casos. A renda familiar média mensal calculada foi, subsequentemente, de R\$ 1287,50, R\$ 997,72, R\$ 1037,77 e R\$ 1075,00. A renda familiar *per capita* média mensal calculada foi, subsequentemente, de R\$ 429,16, R\$ 166,28, R\$ 148,25 e R\$ 134,37.

## DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a maioria dos homens à esterilização são casais estáveis, de baixa renda e escolaridade, que apresentaram como motivos principais para encerrar a carreira reprodutiva a satisfação com o número de filhos e problemas de saúde. A maioria já havia tentado limitar a prole fazendo uso de métodos anticoncepcionais reversíveis. A oferta de métodos cirúrgicos veio atender ao direito constitucional de limitar o número de filhos, contemplando os indivíduos que têm problemas para tê-los, ou não querem mais reproduzir, bem como aqueles que não poderiam pagar para ter acesso ao procedimento. Apesar disso, a vasectomia é pouco frequente no Brasil: apenas 2,6% dos homens se submetem à cirurgia (Vieira, 2002).

A mulher é a principal responsável pela anticoncepção no casal, através do uso de anticoncepcional oral, talvez pela maior facilidade de obtenção dos medicamentos de

forma gratuita em Unidade Básica de Saúde ou pelo baixo custo. Pesquisas recentes tentam descobrir uma droga anticoncepcional masculina (pílula masculina), tentando dessa forma minimizar a chance de procedimento cirúrgico no homem (Page, 2008), já que 3 a 5% dos homens com vasectomia, eventualmente, vão solicitar a reversão, geralmente devido a um novo casamento (Awsare, 2005; Schwingl, 2000). Reversão de Vasectomia, ou vasovasotomia, tem o potencial para restaurar a fertilidade, no entanto, as taxas de gravidez variam de 30-60% (Myers, 1997). Os fatores relacionados incluem a técnica microcirúrgica utilizada e o intervalo de tempo entre a vasectomia e a cirurgia de reversão (Myers, 1997). De fato, 20-40% de todos os casais permanecem inférteis após a reversão da vasectomia, apesar de restaurada a permeabilidade dos vasos (como documentado por técnicas de imagem), possivelmente devido à presença de anticorpos anti-espermatozóide (Kay, 1993). Em resumo, por essas razões, a vasectomia não pode ser considerada realmente um método reversível de contracepção masculina, sendo mais apropriado para os homens que não querem mais ter filhos.

O aconselhamento oferecido é uma forma de desestimular o paciente da realização do procedimento, como previsto na Lei n. 9263, porém todos os pacientes que procuraram o serviço de psicologia e assistência social estavam seguros da realização do mesmo, não havendo desistência. O tempo de espera que era em média de 148 dias vem caindo progressivamente (atualmente é de 81 dias), o que denota eficiência do processo, mesmo se tratando de serviço público e com grande volume. Estudos recentes na região de Campinas demonstram que o acesso ao serviço público de saúde para realização de vasectomia vem melhorando, apresentando diminuição do tempo de espera (no máximo de 6 meses) (Carvalho, 2007; Marchi, 2010).

A taxa de complicações da vasectomia no estudo é similar aos outros (6,04%) (Adams, 2009), sendo a deiscência parcial a maior dela (mais de 70%), devido ao fio utilizado ser absorvível, sendo que a maior parte dos casos ocorreu nos 100 primeiros procedimentos, devido ao melhor aprendizado no decorrer do tempo. A segurança do procedimento favorece o seu emprego em larga escala, não havendo complicações graves que necessitem intervenção, sendo altamente eficaz, com taxa de falha menor que 1% (Awsare, 2005). A vasectomia parece ser segura em relação à saúde do sexo masculino em geral, não correlacionando com risco de doença cardiovascular ou câncer de próstata (Adams, 2009; Awsare, 2005). As dificuldades para a vasectomia são ocasionalmente um atraso no início da azoospermia de até vários meses e a falta completa de reversibilidade. A dor aguda, perda de sangue e infecções de sítio cirúrgico são muito raras, bem como a orquialgia crônica (Page, 2008; Awsare, 2005; Schwingl, 2000). A maior parte dos pacientes conseguiu retornar às suas atividades em menos de uma semana, sendo o retorno à atividade sexual no mesmo período.

No momento da coleta dos dados do prontuário e via entrevista por telefone, havia uma média de 480 dias de pós-operatório, sendo que nenhum paciente se arrependeu do procedimento. Porém o homem que deseja a restauração da fertilidade após a vasectomia tem duas principais opções de tratamento: a reversão ou a extração de esperma, com posterior fertilização in vitro com injeção intracitoplasmática de espermatozóide (Pasqualotto, 2004). Os resultados de ambos são variados porque existem muitos fatores que alteram a chance de sucesso (Nagler, 2009), o que provoca maior preocupação das autoridades públicas na aplicação da lei para seleção dos

pacientes, pois o aumento do acesso ao método pode provocar um maior número de arrependimentos, obrigando o sistema público de saúde a absorvê-los.

Nesta era de consciência de custos e contenção, é imperativo analisar não apenas os resultados do tratamento, mas também o custo destes tratamentos. Com a melhoria no resultado da fertilização in vitro e desenvolvimento contínuo de métodos menos invasivos de recuperação de espermatozoides, os médicos e os casais devem examinar todas as opções disponíveis após a esterilização cirúrgica. A reversão da vasectomia continua a ser o padrão ouro de tratamento, no entanto, algumas situações podem estar presentes nos quais a aquisição de espermatozoides / fertilização in vitro pode ser uma opção melhor (Robb, 2009; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2008). A responsabilidade do médico é apresentar todas as opções com os prós e contras de cada um, incluindo o custo, para ajudar a chegar a uma decisão informada. De acordo com esse estudo, 45,63% dos pacientes tinham até 35 anos, sendo 5,88% abaixo de 25 anos e 24 pacientes (6,03%) tinham apenas 1 filho, o que pode levar a arrependimento, já que quanto menor a idade e menor o número de filhos, maior a chance de ocorrer.

Apenas 1 paciente relatou filho após vasectomia, porém este não realizou espermograma de controle, não podendo inferir se houve falha ou reversão espontânea no caso. A falha ocorre quando feita a cirurgia e não há azoospermia no espermograma de controle e a reversão espontânea, quando há azoospermia e o espermograma volta a apresentar espermatozoides depois de algum tempo, sendo a chance em torno de 0,2% (Lucon, 2006). Talvez um período de observação maior possa denotar um maior número de reversão no estudo.

Chama a atenção o descaso dos pacientes em relação a certeza do resultado da azoospermia no espermograma, já que pouco mais da metade (51%) dos pacientes o fizeram. Isso mesmo após orientar, reforçar a necessidade e a importância do exame e fornecer o pedido para exame de realização gratuita. Não foi possível determinar a causa da não realização do procedimento, já que todas as variáveis analisadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Basta apenas reforçar a orientação junto a psicólogo e assistente social da importância. Daqueles que colheram, em 3 pacientes foram notados azoospermia com menos de 50 dias, sendo evidente que não há parâmetro fidedigno até o momento quando se compara tempo e número de ejaculações para a obtenção de ausência de espermatozoides no ejaculado, com alguns estudos sugerindo métodos de obtenção mais precoce (Singh, 2010). Evidentemente, são necessários estudos adicionais.

Programas de planejamento familiar com esterilização voluntária em larga escala no Brasil devem ser discutidos, apesar da forte oposição da Igreja Católica e do preconceito do brasileiro em relação ao efeito da vasectomia sobre a função sexual e virilidade. A vasectomia apresenta baixo custo, segurança e deve ser utilizada como forma de planejamento familiar e controle de natalidade.

## AGRADECIMENTOS

À Andresa Pace, pelo esforço e empenho no levantamento de dados.

## Endereço para correspondência:

Fábio Castilho Navarro  
Av da Saudade, 999 – AP 52 – CEP 16020-070  
Fone/Fax (18) 3621-4500 – Araçatuba - SP  
e-mail: Fabio\_navarro@uol.com.br



## Referências Bibliográficas

- Adams CE, Wald M. Risks and complications of vasectomy. *Urol Clin North Am.* 2009 Aug;36(3):331-6.
- Alderman PM, Morrison G. Standard incision or no-scalpel vasectomy? *J Fam Pract.* 1999; 48(9):719-21.
- Alyea EP. Vaso-ligation a preventive of epididymitis before and after prostatectomy. *J Urol.* 1928; 19:65-80.
- Awsare NS, Krishnan J, Boustead GB, Hanbury DC, McNicholas TA. Complications of vasectomy. *Ann R Coll Surg Engl.* 2005; 87:406-410.
- Brasil, Constituição, 1988. *Constituição da República Federativa do Brasil*. 7º parágrafo do artigo 126. Disponível em <http://www.providafamilia.org.br>.
- Caetano AJ. Sterilization for votes in the Brazilian Northeast: the case of Pernambuco [PhD Thesis]. Austin: University of Texas; 2000.
- Carvalho LEC. Esterilização cirúrgica voluntária na Região Metropolitana de Campinas, São Paulo, Brasil, antes e após a sua regulamentação. *Cad Saude Pública* 2007; 23:63-69.
- Chen K. A novel instrument-independent no-scalpel vasectomy - a comparative study against standard instrument-dependent no-scalpel vasectomy. *Int. J. Androl.* 2004; 27:222-27.
- Drake MJ, Mills IW, Cranston D. On the chequered history of vasectomy. *BJU Int.* 1999; 84(4):475-81.
- Eisenberg ML, Henderson JT, Amory JK, Smith JF, Walsh TJ. Racial differences in vasectomy utilization in the United States: data from the national survey of family growth. *Urology.* 2009 Nov; 74(5):1020-4. Epub 2009 Sep 20.
- Kay DJ, Clifton V, Taylor JS, Boettcher B. Anti-sperm antibodies and semen profiles in re-anastomosed men. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5:135-139.
- Lara SA, Barrera JLG, Ono AH, Alcazar OM, Perez JE, no-scalpel vasectomy: review of the first 1.000 cases in a Family Medicine Unit. *Arch. Med. Res.* 1997; 28(4):517-22.
- Li SQ, Goldstein M, Zhu J, Huber D. The no-scalpel vasectomy. *J. Urol.* 1991; 145:341-4.
- Liu X, Li S. Vasal sterilization in China. *Contraception.* 1993; 48:255-65.
- Lucon AM, Pasqualotto FF, Schneider-Monteiro ED, Saldanha LB, Danilovic A, Danilovic A. Spontaneous recanalization after vasectomy. *ScientificWorldJournal.* 2006; Mar 7;6:2366-9.
- Marchi NM, de Alvarenga AT, Osis MJ, de Aguiar Godoy HM, Simões E Silva Domeni MF, Bahamondes L. *Int Nurs Rev.* 2010 Jun; 57(2):254-9.
- Minella LS. A produção científica sobre esterilização feminina no Brasil nos anos 80 e início dos anos 90: um debate em aberto. *Revista Brasileira de Estudos Populacionais* 1998; 15:3-22.
- Myers SA, Mershon CE, Fuchs EF. Vasectomy reversal for treatment of the post-vasectomy pain syndrome. *J Urol* 1997; 157:518-520.
- Nagler HM, Jung H. Factors predicting successful microsurgical vasectomy reversal. *Urol Clin North Am.* 2009 Aug; 36(3):383-90.
- Page ST, Amory JK, Bremner WJ. Advances in male contraception. *Endocr Rev.* 2008 Jun; 29(4):465-93. Epub 2008 Apr 24. Review.
- Pasqualotto F, Lucon AM, Arap, S. Rev. Hosp. Clin. vol.59 no.5 São Paulo 2004. The best infertility treatment for vasectomized men: assisted reproduction or vasectomy reversal? *Rev. Hosp. Clin.* 2004; vol.59 no.5.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Vasectomy reversal. *Fertil Steril.* 2008 Nov; 90(5 Suppl):S78-82.
- Robb P, Sandlow JI. Cost-effectiveness of vasectomy reversal. *Urol Clin North Am.* 2009 Aug; 36(3):391-6. Review.
- Schwingl PJ, Guess HA. Safety and effectiveness of vasectomy.

*Fertil Steril* 2000 73:923-936.

Singh D, Dasila NS, Vasudeva P, Dalela D, Sankhwar S, Goel A, Singh V, Singh A, Jain A, Singh BP, Ahmed N. Intraoperative distal vasal flushing--does it improve the rate of early azoospermia following no-scalpel vasectomy? A prospective, randomized, controlled study. *Urology.* 2010 Aug; 76(2):341-4. Epub 2010 May 7.

Trollip GS, Fisher M, Naidoo A, Theron PD, Heyns CF. Vasectomy under local anaesthesia performed free of charge as a family planning service: complications and results. *S Afr Med J.* 2009 Apr; 99(4):238-42.

Vieira EM, Ford NJ. The provision of female sterilization in São Paulo, Brazil: a study among low-income women. *Soc Sci Med* 1995; 42:1427-32.

Vieira EM. Arrependimento após a esterilização feminina. *Cad Saude Pública* 1997; 14 Suppl 1:58-69.

Vieira EM. A implementação da Lei 9.263/planejamento familiar no Município de Ribeirão Preto: a esterilização feminina. Ribeirão Preto: *Departamento de Medicina Social*, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2001. (Relatório Final de Pesquisa).

Vieira EM, Badiani R, Fabbro AL, Rodrigues Jr. AL. Características da contracepção no Estado de São Paulo. *Rev Saude Pública* 2002; 36:263-70.

## ANEXO 1 – Questionário de Avaliação pós-operatória

### Dados adquiridos pelo prontuário pela enfermeira:

Número do prontuário: \_\_\_\_\_  
 Iniciais: \_\_\_\_\_  
 Idade: \_\_\_\_\_  
 Número de filhos vivos: \_\_\_\_\_  
 Estado civil: \_\_\_\_\_  
 Data da procura pelo serviço: \_\_\_\_\_  
 Data da cirurgia: \_\_\_\_\_  
 Escolaridade: \_\_\_\_\_  
 Religião: \_\_\_\_\_  
 Renda Mensal: \_\_\_\_\_  
 Renda Per Capita: \_\_\_\_\_

### Dados adquiridos pelo telefone pelo médico cirúrgico:

1. Como o Sr. Classifica a forma de relacionamento com a atual parceira: bom, regular, ruim, conflituoso ou outro ?
2. A realização do procedimento foi devido a problemas de saúde da esposa, número satisfatório de filhos do casal, dificuldade financeira ou outro?
3. Houve alguma complicação no período pós-operatório, como infecção, inchaço local, hematoma, abertura dos pontos ou outra?
4. Qual a forma de evitar filhos que vocês utilizavam antes do procedimento, Anti-concepcional oral, preservativo, Anti-concepcional injetável, Tabela, Coito Interrompido ou outro?
5. O Sr. se arrependeu de ter feito o procedimento? Se sim, qual o motivo ?
6. O Sr. usou a medicação prescrita pelo médico no pós-operatório?
7. Qual o grau de satisfação com o procedimento: muito contente, contente, insatisfeito, desapontado ou outro?



# Use of microarrays Comparative Genome Hybridization for preimplantation genetic screening of poor prognosis patients

O uso da Hibridação Genômica Comparativa por arrays para o *screening* cromossômico preimplantacional em pacientes com baixo prognóstico reprodutivo

Juliana F Cuzzi<sup>1\*</sup>, Paulo Serafini<sup>2</sup>, Eduardo Motta<sup>2</sup>, José Roberto Alegretti<sup>2</sup>, Péricles Assad Hassun Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genesis Genetics Brasil, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Huntington Centro de Medicina Reprodutiva, São Paulo, Brasil

Este trabalho foi realizado no laboratório Genesis Genetics Brasil.

## RESUMO

**Introdução:** Muitos embriões gerados *in vitro* apresentam alterações cromossômicas e, assim, baixo potencial de desenvolverem gestações viáveis. A metodologia mais frequentemente usada no diagnóstico genético pré-implantacional envolve a biópsia embrionária no terceiro dia do desenvolvimento embrionário, seguido por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para análise de 5 a 12 cromossomos. Neste trabalho relatamos uma nova estratégia para *screening* completo de aneuploidias cromossômicas em embriões gerados por Fertilização *in vitro* para pacientes com baixo prognóstico reprodutivo, a Hibridação Genômica Comparativa por microarrays (aCGH).

**Materiais e Métodos:** Um total de 23 embriões provenientes de 5 casais com histórico de falhas sucessivas de Fertilização *in vitro* e perdas gestacionais foram biopsiados no terceiro ou quinto dia do desenvolvimento embrionário. O *screening* cromossômico foi realizado pela técnica de aCGH.

**Resultados:** A aCGH apresentou uma taxa de eficiência de 95,6%. No total, 47,8% dos embriões analisados eram euplóides. Nove embriões foram transferidos para o útero materno sem vitrificação prévia, resultando em 75% (6/8) de taxa de implantação (presença de saco gestacional) e 50% de fetos.

**Conclusão:** A metodologia proposta neste trabalho para a análise completa das aneuploidias embrionárias supera a maioria das limitações técnicas anteriormente observadas na realização do *screening* genético preimplantacional e pode, finalmente, favorecer as taxas gestacionais em casais com baixo prognóstico reprodutivo.

**Palavras-chave:** aCGH, PGS, implantação embrionária, aneuploidia, taxa gestacional

## ABSTRACT

**Introduction:** Many embryos produced *in vitro* contain chromosomal abnormalities and have little potential for forming a viable pregnancy. The most commonly used method for preimplantation genetic diagnosis involves embryo biopsy on day 3 of development, followed by fluorescence *in-situ* hybridization analysis of 5–12 chromosomes. Here we report a new strategy for comprehensive chromosome screening in IVF embryos for

poor reproductive prognosis patients, the Comparative Genome Hybridization by microarrays (aCGH).

**Material and Methods:** A total of 23 embryos, from 5 couples undergoing IVF treatment with history of unsuccessful attempts (>2 attempts) and miscarriages, were examined by aCGH after blastomere or trophectoderm biopsies.

**Results:** The aCGH showed an efficiency of 95.6%. A total of 47.8% of embryos were euploid. Nine embryos were transferred to uterus without previous vitrification, revealing that 75% (6/8) of them produced fetal sac and 50% of transferred embryos produced a fetus.

**Conclusion:** The full chromosome complement screening method described overcomes the majority of the problems that limited earlier aneuploidy screening techniques and may finally allow preimplantation genetic screening to improve the implantation rates in poor prognosis patients.

**Key-words:** aCGH, PGS, embryo implantation, aneuploidy, pregnancy rate

## INTRODUCTION

*In vitro* fertilization (IVF) treatments typically involve the production of multiple embryos. However, the viability of individual embryos is highly variable. Even among a cohort of sibling embryos competence can vary greatly. The challenge for IVF clinics is to correctly identify the most viable embryos and prioritize them for transfer to the uterus.

One of the most powerful methods for improving IVF efficiency is embryo selection based on morphologic and developmental characteristics; even so, the implantation potential of human embryos produced *in vitro* remains low. One reason is that the majority of human embryos produced *in vitro* are chromosomally abnormal (1-9). A study involving over 6000 embryos (2) showed that chromosome abnormalities were widespread regardless of maternal age and morphology. For example, only 42% of the best embryos, according to morphology, in patients 35 to 37 years of age were chromosomally normal, and abnormalities increased with age and poorer embryo developmental characteristics (2). Although morphology is clearly correlated with euploidy, its use in selec-

**TABLE 1.** Patient information and outcome of treatment cycles using aneuploidy screening.

Patient	Age	Biopsy Day	No. of Embryo Biopsied	No. of Euploid Embryos	No. of Transferred Embryos	Clinical Pregnancy	Fetal Sac	Ongoing Pregnancy
A	37	Blastomere (D-3)	6	2	2	YES	1	YES
B	34	Trophectoderm (D-5)	6	4	2	YES	1	NO
C	37	Trophectoderm (D-5)	3	2	2	YES	1	NO
D	32	Trophectoderm (D-5)	2	1	1	YES	1	YES
E	37	Trophectoderm (D-5)	6	2	2	YES	2	YES

ting embryos for replacement can at best only improve euploidy by a few percentage points. Wells et al. (10) have indicated that over 40% of blastocysts are still chromosomally abnormal and that most monosomies can reach the blastocyst stage.

Because morphology alone can only slightly improve the probability of selecting a chromosomally normal embryo for transfer, Preimplantation Genetic Screening (PGS) in combination with other selection techniques may provide a benefit by accurately identifying euploid embryos, thus leading to improved ART (Assisted Reproductive Technology) outcomes. Despite large studies indicating the advantages of aneuploidy screening, confusion and controversy persist concerning the benefits of PGS in part because of the differing results of studies that have used widely varying procedures, some more effective than others.

Here we report clinical application of a novel aneuploidy screening strategy, the Comparative Genome Hybridization by microarrays (aCGH). The method was applied both in day-3 embryos and in blastocyst stage, 2–3 days later than traditional methods of PGS. Additionally, the procedure involves screening of the entire chromosome complement, rather than the limited chromosome assessment typically used for the purpose of PGS. We suggest that this approach may finally achieve a high clinical potential, improving the pregnancy rate in patients with a history of failed IVF attempts or/and spontaneous abortions.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Details and Biopsy

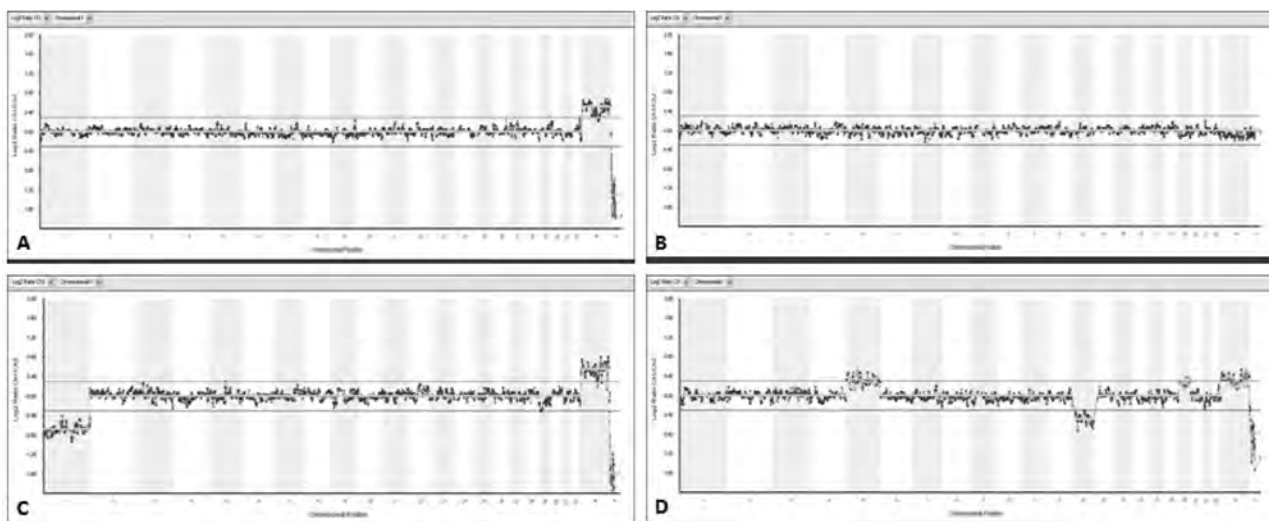
Data presented were derived from 5 couples undergoing assisted reproductive treatment. The average maternal age was 35.4 years (range 32-37 years). The chromosome screening was offered to these patients, not for advanced reproductive age, but due to their history of unsuccessful IVF attempts (>2 attempts) and miscarriages.

There are 2 particularly difficult cases: (A) patient with 32 years old who experienced two miscarriages after IVF treatment, in third IVF attempt it was included aneuploidy screening for 9 chromosomes and the patient failed to get pregnant; (B) patient with 37 years old who experienced 11 FIV attempts and more than two pregnancy losses.

Four of these patients had their embryos biopsied on day-5 during blastocyst stage and transferred after the aCGH analysis, on day-6, without vitrification. One patient had her embryos biopsied on day-3 and the euploid embryos were transferred to uterus on day-5. CGH results were available for 22 of the 23 embryos biopsied.

### Comparative Genome Hybridization microarray (aCGH)

Each sample biopsied (trophectoderm and blastomeres) was washed in sterile phosphate-buffered saline and transferred to a microcentrifuge tube in 2ul of a lysis solution. To generate the ~1 mg of DNA required for aCGH analysis, the biopsied cells were lysed and the



**FIGURE 1.** A: Example of a normal female embryo analyzed from a trophectoderm biopsy by aCGH. B: Example of a normal male embryo analyzed from a trophectoderm biopsy by aCGH. C: aCGH analysis of an embryo with a karyotype: 45,XX,-1. D: aCGH analysis of an embryo with a karyotype: 47,XX,+5,-13,+19.

whole genome amplified using degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction. Amplified DNA was labeled with a green fluorescent molecule (Spectrum Green-dCTP, G&E Healthcare). Similarly, DNA from a chromosomally normal individual was labeled with red fluorescence (Spectrum Red-dCTP, G&E Healthcare). The green (embryo) and red (normal reference) DNAs were mixed together and simultaneously hybridized on a BAC – array platform able to cover all the 24 chromosomes. Scanned images were analyzed and quantified, and whole chromosomal copy number ratios were reported using the array-analysis software (Fig1).

## RESULTS

The data described here were derived from 5 patients. These patients produced a total of 23 embryos. Seventeen of them were biopsied on blastocyst stage and 6 of them on day-3. Biopsy was successful for 100% of embryos, presenting DNA enough for subsequent aCGH analysis. A total of 22 embryos were successfully assessed using aCGH (95.6% diagnostic efficiency), 1 biopsied sample had degraded DNA that did not enable the analysis.

Of these, 11(47,8%) were diagnosed as euploid and 9 were transferred to uterus immediately after the aCGH report, with no vitrification.

All the patients showed at least 1 euploid embryo. One patient had only one embryo transferred and the other 4 patients had two embryos transferred.

The 5 patients become pregnant. The proportion of transferred embryos that successfully implanted was evaluated by ultrasound 6 weeks after transfer, revealing that 75% (6/8) of embryos transferred after aCGH analysis produced a fetal sac. Later ultrasound screening to assess fetal heartbeat, showed that 50% embryos transferred produced a fetus. These results are summarized in Table 1.

## DISCUSSION

Preimplantation Genetic Screening was developed to try and improve pregnancy rates in certain groups of patients undergoing IVF procedures owing to infertility. Reported indications for PGS include patients with advanced maternal age, repeated miscarriage, repeated implantation failure, and severe male factor infertility (11).

PGS was first reported by Verlinsky et al. (12) and Munne et al. (13) in the analysis of polar bodies. Since these first reports, there have been numerous papers on the use of PGS; however, as with many new technologies brought into the IVF clinic, there has been little evidence to show that PGS increases delivery rates. There are now at least 11 randomized controlled trials (RCTs) applied to both good- (14-18) and poor- (19-23) prognosis patients. None of these trials have shown that PGS improved the delivery rate compared with a control group.

All of these studies used Fluorescent in situ Hybridization (FISH) based techniques to study 5–12 chromosomes, and almost all were applied to cleavage-stage embryos, except Jansen et al. (16), who performed trophectoderm biopsy. Despite the controversy surrounding the use of PGS, there is a universal agreement that even embryos reaching the best morphologic scores often fail to achieve implantation or do not produce a live birth, and those with poor scores sometimes succeed in producing a child. In many cases,

the underlying cause of implantation failure or spontaneous pregnancy loss is the presence of numerical chromosomal abnormalities (aneuploidy).

A lot has been discussed about PGS testing of 24 chromosomes and recent studies (24) have renewed hope that new techniques and a fresh look at the moment of biopsy (moving away from cleavage stage where mosaicism is rampant) may finally show the usefulness of aneuploidy screening.

The present study displayed a high diagnostic efficiency, with comprehensive aneuploidy screening results obtained from 95.6% of embryos. The high implantation rate reported here may be indicative of improved embryo selection due to full chromosome screening on either cleavage stage embryos or blastocysts.

It has often been argued that the transfer of more than one embryo is advisable for patients of advanced maternal age or those with a history of multiple unsuccessful IVF treatments. Our data show that single embryo transfer after CGH screening would yield implantation rate (i.e., the probability of an embryo selected for transfer forming a clinical pregnancy) of 50% per blastocyst transfer compared with ~33% in cycles without screening published in ESHRE – ART fact sheet ([www.eshre.com](http://www.eshre.com)). It is probable that implantation and pregnancy rates would be higher in patients without a history of failed IVF attempts. In this report, 75% (6/8) of embryos transferred after aCGH analysis produced a fetal sac, suggesting that single embryo transfer should still be considered for such patients, at least for those capable of producing chromosomally normal blastocysts.

To conclude, although randomized controlled trails are still needed, this report has demonstrated the usefulness of aneuploidy screening by aCGH technique, increasing the pregnancy rate of poor prognosis patients.

### Corresponding author:

Juliana Fabrícia Cuzzi, PhD  
 juliana@genesisgenetics.com.br  
 Rua Mato Grosso, 306  
 Higienópolis, São Paulo, Brasil  
 CEP 01249-030  
 Telefone: (11) 2114 6654

### Reference

- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 1995; 64:382–91.
- Munne S, Serena C, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:628–34.
- Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RML. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet*. 1997;99:755–60.
- Marquez C, Sandalinas M, Bahcxe M, Alikani M, Munn\_e S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2000;1:17–27.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online*. 2002;6:54–9.
- Verlinsky Y, Cieslak V, Ivakhnenko S, Evsikov G, Wolf M, White M, et al. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;183:S47–9.
- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in-vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod*. 2002;17:413–9.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferrareti AP. Chromosomal abnormalities

- in embryos. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 22, 183(Suppl 1):S29–34.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosome complement. *Fertil Steril.* 2007;87:534–41.
- Wells D, Fragouli E, Stevens J, Munn\_e S, Schoolcraft WB, Katz- Jaffe MG. High pregnancy rate after comprehensive chromosomal screening of blastocysts [abstract]. *Fertil Steril.* 2008;90(Suppl 1):S80.
- Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC.ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod.* 2009;24:1786–810.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Freidline M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalevskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 1995;10:1923–7.
- Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod.* 1995;10:1015–21.
- Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, et al. Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2818–25.
- Hum Reprod 2008;23:2818–25. 7. Meyer LR, Klipstein S, Hazlett WD, Nasta T, Mangan P, Karande VC. A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the “good prognosis” patients. *Fertil Steril.* 2009;91:1731–8.
- Jansen RPS, Bowman MC, de Boer KA, Leigh DA, Lieberman DB, McArthur SJ. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod.* 2008;23:1476–8.
- Mersereau JE, Pergament E, Zhang X, Milad MP. Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil Steril.* 2008;90:1287–8.
- Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, et al. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:848–54.
- Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2004;19:2849–58.
- Stevens J, Wale P, Surrey ES, Schoolcraft WB, Gardner DK. Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004;82:S249–S249.
- Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2010;93: 364–73.
- Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2008;23:2806–12.
- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med.* 2007;357:9–17.
- SchoolcraftWB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *FertilSteril.* 2009. 1700-1706.

# Identificação do ponto de corte para anticorpos IgG em infecção por *Chlamydia trachomatis*

## Identification of the cutoff point for IgG antibodies in *Chlamydia trachomatis* infection

Mônica Canêdo Silva Maia<sup>1</sup>, Mário Silva Approbato<sup>2</sup>, Rodopiano de Souza Florêncio<sup>3</sup>, Tatiana Moreira da Silva<sup>4</sup>, Fabiana Carmo Approbato<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestrado em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Goiás (UFG), doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFG e biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia(GO) - Brasil

<sup>2</sup> Professor Titular Doutor/Mestre da Faculdade de Medicina e do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO) – Brasil

<sup>3</sup> Professor Doutor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO), Brasil

<sup>4</sup> Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás (UFG) e biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas – UFG – Goiânia(GO), Brasil

<sup>5</sup> Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás – Goiânia(GO), Brasil

Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Estudo apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida em Fortaleza-CE (2010) na forma de pôster.

### RESUMO

**Objetivo:** Estabelecer o ponto de corte de títulos de anticorpos IgG (imunofluorescência indireta) para *Chlamydia trachomatis*. **Métodos:** Este é um estudo retrospectivo com 204 prontuários eletrônicos de pacientes atendidas em um centro universitário e particular de infertilidade na cidade de Goiânia, no período de 2006 a 2009. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas pela curva ROC através do programa BioEstat® utilizando a metodologia usual. **Resultados:** O melhor ponto de corte na curva ROC foi com a titulação de 1:64. Porém, consideramos que pode-se continuar utilizando como ponto de corte a titulação  $\geq$  1:16, por interferir pouco na sensibilidade e especificidade e por ser a atualmente utilizada no Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. **Conclusões:** O fato de se dispor de uma população com queixa de infertilidade permitiu a utilização da curva ROC para a determinação do ponto de corte, otimizando, desta maneira, a sensibilidade e a especificidade do teste.

**Palavras-chave:** Curva ROC, *Chlamydia trachomatis*, técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

### ABSTRACT

**Objective:** To establish the cutoff point of antibodies IgG titres (indirect immunofluorescence) for *Chlamydia trachomatis*. **Methods:** This is a retrospective study with 204 electronic records of patients attended at a university and private infertility center in the city of Goiania, in the period of 2006 to 2009. The sensitivity and the specificity of the test were calculated by ROC analysis through BioEstat® software using the standard methodology. **Results:** The best cutoff point of the ROC curve with the titre was 1:64. However, we believe that we can continue using a cutoff titre to  $\geq$

1:16 by interfering little in sensitivity and specificity and because it is currently used in the Clinical Laboratory of Hospital Clinics of the Federal University of Goias. **Conclusion:** The fact of having a population complaining of infertility allowed use of the ROC curve for determining the cutoff point, optimizing, the sensitivity and specificity of the test.

**Key words:** ROC curve, *Chlamydia trachomatis*, fluorescent antibody technique indirect.

### INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* é responsável pelo maior número de casos de infecções bacterianas sexualmente transmissíveis. Seu diagnóstico é motivo de preocupação em vários países do mundo devido à freqüente ausência de sintomas e principalmente pelas sequelas que pode acarretar. A infecção por clamídia difunde-se exponencialmente, particularmente entre jovens e adolescentes sexualmente ativos. A infecção ocorre em homens e mulheres, mas tem consequências mais graves para as mulheres (Gerbase et al., 1998; WHO, 2001).

Em mulheres, 70 a 90% das infecções genitais por *C. trachomatis* são assintomáticas (Beagley & Timms, 2000; Norman, 2002) e, em homens, foram relatadas taxas menores que variavam entre 25 a 60% (CDC, 2000), porém, estudos mais recentes mostram taxas bastante elevadas de infecção assintomática nos homens, entre 75% e 93,6% (Mckay et al., 2003; Sutton et al., 2003). Em mulheres podem causar, uretrites e cervicites, e sequelas que incluem doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica, artrites reativas e, em homens, epididimites e proctites (Paavonen & Krause, 1999).

Tradicionalmente, a cultura celular vem sendo bastante considerada no diagnóstico da infecção, porém recen-



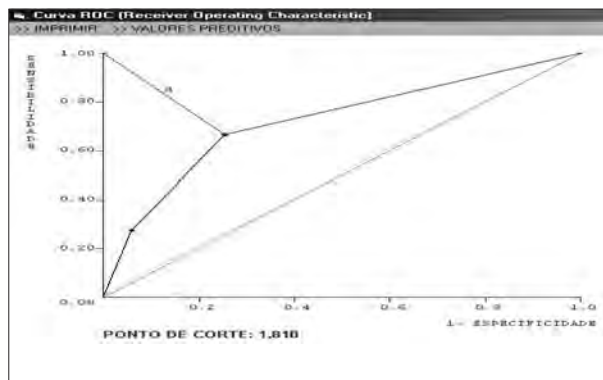


Figura 1. Distribuição das pacientes segundo o melhor ponto de sensibilidade e 1-especificidade para detecção de obstrução tubária (curva ROC) pela IFI. Laboratório de Reprodução Humana FM/HC-UFG, 2010.

temente outros métodos para a detecção de antígenos e anticorpos vêm sendo utilizados como: a imunofluorescência, imunoensaio enzimático, hibridização de DNA e Polymerase Chain Reaction (PCR) (Miranda et al., 2003). O presente estudo foi conduzido para determinar o ponto de corte de títulos de anticorpos IgG da imunofluorescência indireta (IFI) para clamídia em rastrear obstrução tubária em mulheres inférteis. Optamos pela IFI, por ser um teste diagnóstico rápido, de valia e eficaz para o diagnóstico e controle epidemiológico da infecção, além de ser a técnica disponível no momento para as pacientes que buscaram atendimento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG).

## METODOLOGIA

Este estudo constituiu em uma análise retrospectiva de 204 prontuários eletrônicos (*Sisfert*\*) de pacientes atendidas no Laboratório de Reprodução Humana (HC/UFG) e na Mater Clínica de Ginecologia e Obstetrícia em Goiânia. A faixa etária das pacientes foi compreendida entre 17 a 47 anos, sendo que as consultas foram realizadas entre o período de 2006 a 2009. Foram incluídas pacientes com infertilidade (critério da OMS, 1992) que realizaram exames de IFI e histerossalpingografia (avaliação do fator tubário).

O ponto de corte foi identificado pela construção de *receiver operator characteristic curve* (ROC) ou curva operacional relativa (Greiner et al., 1995; Kaba et al., 2001), através do melhor ponto de sensibilidade e especificidade, determinando assim a titulação do exame que fornece o maior acerto diagnóstico. Os resultados obtidos foram submetidos à análise, utilizando-se o programa estatístico Bioestat 5.0® (Ayres et al., 2007). A titulação considerada significativa atualmente no Laboratório de Reprodução da UFG é  $\geq 1:16$ .

\* Banco de dados baseado na OMS desenvolvido originalmente pelo Laboratório de Reprodução Humana da UFG em Delphi (© Borland USA, 1999).

## RESULTADOS

A prevalência de mulheres com sorologia significativa para *C. trachomatis* foi 35,3% (72/204) e a de obstrução tubária foi 25,5% (52/204). A curva ROC utilizada para determinação do ponto de corte do teste está representada na Figura 1. Esta curva apresenta a sensibilidade em função da proporção de falsos

positivos (especificidade). O melhor ponto de corte na curva ROC foi com a titulação 1:64, localizado no canto superior esquerdo da curva ROC, considerado como a melhor otimização possível dos valores de sensibilidade e especificidade do teste de IFI. Para o ponto de corte definido, a sensibilidade e a especificidade do teste foram de 66,7% e 74,5%, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros fundamentais para a definição de um teste diagnóstico. Assim, quanto maior a sensibilidade do teste, maior a capacidade de o teste negativo afastar a doença, pois ocorre uma diminuição da probabilidade de falso negativo. Quanto maior a especificidade de um teste, maior a capacidade de o teste positivo indicar a doença, pois diminui a probabilidade de falso positivo. Um aumento da sensibilidade decorre de uma diminuição da especificidade e vice-versa. Por esta razão, a determinação do ponto de corte ou cutoff é importante. Um ponto de corte muito alto pode implicar em 100% de especificidade, uma vez que todos os testes positivos implicarão na existência da doença. No entanto alguns indivíduos com a doença podem obter resultados negativos, o que implica em baixa sensibilidade (Greiner & Gardner, 2000).

A análise ROC pode ser usada tanto para examinar o desempenho de um teste diagnóstico quanto aos possíveis valores de corte, como para comparar diferentes testes diagnósticos, a fim de escolher o melhor. De acordo com o gráfico descrito pela curva ROC, quanto maior a área definida pela curva, melhor será o teste. Nós e alguns autores (Machado et al., 2007) utilizamos como ponto de corte, para avaliar a cicatriz sorológica deixada pela *C. trachomatis*, a titulação 1:16.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que o melhor ponto de corte da curva ROC foi com a titulação 1:64, sendo que a sensibilidade e a especificidade do teste de IFI para rastreamento da obstrução tubária em pacientes inférteis foram de 66,7% e 74,5%, respectivamente. Entretanto, consideramos que pode-se, continuar utilizando como ponto de corte a titulação  $\geq 1:16$  sem perda significativa destes dois parâmetros.

## Referências bibliográficas

- Ayres M, Ayres-J R, Ayres DLM, Santos AS. BioEstat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá; 2007.
- Beagley KW, Timms P. *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. J Reprod Immunol. 2000; 48: 47-68.
- Centers for Disease Control. Chlamydia (STD). Some Facts about Chlamydia. April, 2000. Disponível em: <http://www.cdc.gov/health/diseases.htm>, Jan/2011.
- Gerbace AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. The Lancet. 1998; 351(3 Suppl): S2-4.
- Greiner M, Sohr D, Gobel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. J Immunological Methods. 1995; 185: 123-32.
- Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Prev Vet Med. 2000; 45: 3-22.
- Kaba J, Kutschke L, Gerlach G-F. Development of an ELISA for the diagnosis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections in goats. Vet Microbiol. 2001; 78: 155-63.
- Machado ACS, Guimarães EMB, Sakurai E, Fioravante FCR, Amaral WN, Alves FC. High Titers of *Chlamydia trachomatis* Antibodies in Brazilian Women with Tubal Occlusion or Previous Ectopic Pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2007; 28416.

Mckay L, Clery H, Carrick-Anderson, Hollis S, Scott G. Genital *Chlamydia trachomatis* infection in a subgroup of young men in the UK. *The Lancet*. 2003; 361: 1792.

Miranda AE, Gadelha AMJ, Passos MRL. Impacto da infecção pela *Chlamydia trachomatis* na saúde reprodutiva. *DST – J bras Doenças Sex Transm*. 2003; 15(1): 53-8.

Norman J. Epidemiology of female genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002; 16(6): 775-87.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Adelantos Recientes en Materia de Concepción con Ayuda Medica. *Série Informes*

Técnicos, 820. Genebra, 1992.

Paavonen J, Krause WE. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Europ Soc of Human Reprod and Embriol*. 1999; 5(5): 433-47.

Sutton D, Whitehouse RW, Jenkins JPR, Davies ER, Murfitt J, Lees WR. *Textbook of radiology and imaging*. 6<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 1998. p. 1265-72.

World Health Organization. Department of HIV/AIDS. *Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections*. Geneva, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/003.htm>, Jan/2011.

# The safety of IVF: clinical impact of current knowledge

## A segurança da FIV: impacto do conhecimento atual na clínica

Karl G Nygren M.D., Ph.D. Stockholm, Sweden.

### ABSTRACT

It has recently been clearly demonstrated that some (but not all) of previously documented, additive risks for children born after IVF treatments can actually be avoided, just by changing clinical IVF policies. Using SET as the norm will significantly reduce multiple births, which in turn reduces prematurity, which leads to reductions of specific medical problems like pre-eclampsia, perinatal death and cerebral palsy. National IVF outcome data has been a powerful instrument, in some countries, to achieve this clinical transition of policies, directly protecting IVF safety.

However, further steps must now be taken to reduce other additive risks with IVF (not affected by multiple pregnancies). Causative factors behind birth defects and imprinting disorders and, eventually even more significant, intrauterine growth disturbances and thereby birth weight disturbances with possible consequences for health later in life, are now being discussed. Epi-genetic mechanisms are involved. A closer scientific look are now being taken at the IVF method(s) *per se*. Strong versus milder ovarian stimulation as well as laboratory factors like the composition of culture media and culture time are in focus.

IVF is not totally safe, but currently safe enough to continue to be used, provided monitoring of safety and research on possible risk factors will continue. Strategies for further risk reductions should be explored and research in this direction is already under way.

**Key words:** IVF, safety.

### RESUMO

Recentemente, foi demonstrado claramente que alguns (mas não todos) dos riscos adicionais documentados anteriormente para as crianças nascidas após tratamentos de fertilização *in vitro* podem realmente ser evitados, apenas mudando as políticas clínicas de fertilização *in vitro*. Utilizando-se SET (single embryo transfer) como norma resultará na redução significativa de nascimentos múltiplos, que por sua vez reduz a prematuridade, o que leva a uma redução de problemas médicos específicos, como pré-eclampsia, mortalidade perinatal e paralisia cerebral. Dados dos resultados nacionais de FIV tem sido um instrumento poderoso, em alguns países, para alcançar essa transição clínica de políticas, diretamente protegendo a segurança de FIV. No entanto, outras medidas devem agora ser tomadas para reduzir outros riscos adicionais à fertilização *in vitro* (não afetado pela gravidez múltipla). Assim, agora estão sendo discutidos fatores causais de doenças que estão por trás de defeitos congênitos ou problemas de *imprinting* e, eventualmente, ainda mais significativos, distúrbios do crescimento *intra-uterin* e distúrbios do peso ao nascimento, com possíveis conseqüências para a saúde. Mecanismos de Epigenéticos estão envolvidos. Um olhar

científico mais atento está voltado para o método das FIVs *per se*. Estímulos oavrianos mais intensos *versus* suaves, bem como fatores laboratoriais, como a composição de meios de cultura e tempo de cultura estão em foco. A FIV não é totalmente segura, mas atualmente é suficientemente segura para continuar a ser utilizada, desde que a monitorização da segurança e da investigação sobre possíveis fatores de risco vá continuar. Estratégias para redução do risco ainda deve ser exploradas e pesquisas nesse sentido já estão em andamento.

**Palavras-chave:** FIV, segurança

The safety of IVF has always been an issue, even before it was introduced clinically. Preclinical research grants to Roberts Edwards and Patrick Steptoe, the IVF pioneers, were withheld in the U.K. for the (then only theoretical) fear of severe and non-acceptable safety risks. But focus has shifted over time. When the first IVF babies turned out to be quite healthy the worries subsided. Later, when Paul Lancaster in Australia 1987 first reported on an actually increased (additive) risk for birth defects (Lancaster), concerns were again voiced but the level of risk increase was judged to be not too alarming. Importantly, the IVF technique itself was not blamed.

Effectiveness was not very impressive at first. It was soon discovered, however, that it could be much improved by transferring several embryos at each procedure. The resulting sharp increase of multiple births was then not necessarily regarded as a drawback, rather even as a blessing. After a number of years data had accumulated (Bergh et al,1999), at least in some countries, to show that there was indeed a price to pay for the improvements in effectiveness. The balance between effectiveness and safety was show to be heavily affected. (It turned out, however, that in most settings stakeholders were willing to pay that price). The future children were not asked, of course, as they were not yet *in utero* and not even born at the time of the decision.

However, in the "trade-off" between effectiveness and safety, some settings/countries reacted to the "de-railed" balance and decided to try and protect safety by reducing the multiples. These countries are usually characterized by effective and valid monitoring systems for national data on safety and by generous reimbursement systems. "SET (single embryo transfer) as the norm" was introduced, and it turned out that effectiveness actually did not suffer much (Karlström & Bergh,2007).

It has recently been clearly demonstrated, from Sweden on a national basis (Källén et al,2010), that SET policies since 6 years back now have resulted not only in a reduction of multiples from 35% down to now only 5% duplex (no triplets), but consequently also to a reduction of prematurity from 40% to under 10%, leading to extra risks vanishing, e.g. for pre-eclampsia, perinatal deaths and cerebral palsy, CP.

Interpreting data on safety in a specific setting and deciding on treatment strategies is indeed complicated and difficult. Many factors are important and may be quite country specific: **Safety levels:** There is, of course, a basic level of risk for any pregnancy – with a very wide range between countries, much dependant of the level of maternal health care. For IVF patients, there are additive risks from their the sub-fertility, from the method per se, and for the way the techniques are used clinically.

**Safety data characteristics:** Data come from relatively small investigations at the level of clinics or from much larger national data bases (Nygren et al, 2007). Ideally they come from your own country/setting but sometimes the only available data comes from elsewhere/other countries. Then the question to what extent foreign data are applicable comes to the surface.

**Risk validity:** Risk estimates often progress from first being merely theoretical risks, (not yet investigated but potentially very important), to risks under preliminary evaluation and further on to more validated risks estimates on established procedures, again country specific.

**Patient mix:** Age, life style factors, infertility diagnosis etc. all differs over time and place. **Technical developments and diversity:** IVF is inclusive of a number of different technologies and they develop over time.

**Stakeholder's interpretations:** Not surprisingly, patients, doctors, industry, governments, the public at large may interpret data differently. **Patient autonomy:** In some countries patient autonomy is dominating in regulations and in practice. In other countries it is less so.

**Society:** Law and regulations may be more or less permissive. Reimbursement policies may be more or less generous. Culture and religion are very important factors with a sometimes dramatically different impact in different countries.

Thus, no wonder that different settings may come to different conclusions. However, most countries seem to join in the transition to less embryos -being transferred, albeit on a different pace (Nygren, 2010, Nyboe et al, 2009).

Now that the safety problems with multiple pregnancies after IVF is well described and well documented most stakeholders seem to have come to the conclusion that SET as the norm may be the future of IVF transfer policies, especially now as benefits of such policies have been clearly demonstrated also for the final endpoint, specific health improvements for IVF children and their mothers. Therefore, and for the future, focus on IVF safety has now be directed towards, (as yet merely theoretical) risk factors with the IVF methodologies per se. Research is already now looking at the possible benefit for safety

for mother and child and the clinical feasibility of milder forms of ovarian stimulation in conjunctions with IVF. For the risk of OHSS such an approach would obviously be very positive, but also for the children, through improved egg quality, improvements might be possible. Further, early investigations suggest that culture media composition may influence methylation patterns in epigenetic regulation (Dumoulin et al, 2010) and that culture timing may, possibly, influence embryo development. Different freezing techniques also have a significant impact on fetal growth.

In conclusion, the safety of IVF is today estimated to be good enough to allow further utilisation. Some 4.5 million IVF children have been born so far and access to this treatment is increasing. Some of the risks with IVF have been clearly identified and can actually be prevented, as recently demonstrated, while other indentified (as for birth defects) or investigational (as for embryonic growth disturbances) risks need to be further investigated. IVF safety needs to be monitored and protected. Confidence in IVF needs to be maintained.

## References

- Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, Nygren KG, Wennerholm UB. *Lancet* 1999, 6; 359 (9160), 1579-85.
- Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP, Evers JL. Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod.* 2010 Mar;25(3):605-12.
- Karlström PO, Bergh C. Reducing the number of embryos transferred in Sweden-impact on delivery and multiple birth rates. *Hum Reprod.* 2007
- Källén B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Otterblad Olausson P. Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4):1026-34.
- Lancaster PA. Congenital malformations after in-vitro fertilisation. *Lancet.* 1987 Dec 12;2(8572):1392-3.
- Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG; European IVF-monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod.* 2009 Jun;24(6):1267-87.
- Nygren KG, Finnström O, Källén B, Olausson PO. Population-based Swedish studies of outcomes after in vitro fertilisation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(7):774-82. Review
- Nygren KG: Preliminary results from 2006 collaborative ICMART IVF World report. Presented at the ESHRE Annual Meeting, Rome 2010. No abstract.



# Porque IVM se temos a IVF?

## Why IVM if we have IVF?

Adriana Bos-Mikich<sup>1</sup> e Nilo Frantz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, RS.

Correspondência: adriana.bosmikich@gmail.com

### RESUMO

Recente encontro ocorrido em Milão reuniu membros da comunidade científica internacional em torno da discussão sobre a tecnologia de maturação *in vitro*. A aplicação clínica da tecnologia adquiriu uma nova dimensão, quando Trounson (1994) apresentou os resultados de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos coletados de pacientes portadoras de ovários policísticos, mas muitos de seus aspectos fisiológicos são alvo de pesquisa e questionamento, visto que diferenças importantes existem entre gametas maturados *in vivo* e *in vitro*.

**Palavras-chave:** fertilização *in vitro*, métodos.

### ABSTRACT

Recent meeting held in Milan brought together members of the international scientific community around the discussion on the technology of *in vitro* maturation. Clinical application of technology has acquired a new dimension when Trounson (1994) presented the results of maturation, fertilization and embryo development *in vitro* of oocytes collected from patients with polycystic ovaries, but many of its physiological aspects are subject to search and questioning, since important differences exist between gametes matured *in vivo* and *in vitro*.

**Key-words:** *in vitro* fertilization, methods.

Recente encontro ocorrido em Milão reuniu membros da comunidade científica internacional em torno da discussão sobre a tecnologia de maturação *in vitro*. Participaram da "2nd Biogenesis Conference" clínicos, embriologistas e pesquisadores engajados na difusão da IVM como uma alternativa de tratamento da infertilidade humana. O primeiro relato de IVM é creditado à Pinus e Enzmann, os quais na década de 30 do século passado (1935) descreveram a maturação espontânea de oócitos de coelhas, após sua liberação dos folículos ovarianos. Anos depois, Edwards (1965) demonstrou que o oócito humano, requer cerca de 37hs para atingir a maturação total *in vitro* e os primeiros nascimentos com o emprego de IVM ocorreram em um programa de doação de gametas, com a fertilização *in vitro* de oócitos coletados de ovários não estimulados (Cha et al, 1991). A aplicação clínica da tecnologia adquiriu uma nova dimensão, quando Trounson (1994) apresentou os resultados de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos coletados de pacientes portadoras de ovários policísticos. Interessante notar que apesar dos progressos e sucessos alcançados pela IVM nas últimas décadas em termos de nascimentos vivos, as comunidades científica e clínica parecem não estar ainda plenamente convencidas de

suas potenciais vantagens em relação aos ciclos clássicos com estimulação ovariana controlada, o que representa muitas vezes um obstáculo ao seu progresso e disseminação. Entretanto, apesar de ausente, o professor Robert Edwards, agraciado em 2010 com o merecido prêmio Nobel de Medicina teve o seu comentário e questionamento mencionados e amplamente discutidos: "*Uma nova fase na reprodução humana está se abrindo com a percepção de que os métodos atualmente utilizados para estimulação folicular são muito agressivos e custosos. Não deveríamos ter desenvolvido a IVM em vez de IVF desde o começo?*".

Mesmo considerando os avanços relevantes que a IVM apresentou ao longo dos anos em termos laboratoriais e clínicos, muitos de seus aspectos fisiológicos são alvo de pesquisa e questionamento, visto que diferenças importantes existem entre gametas maturados *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, sabe-se que a metilação do DNA sofre influência ambiental e é anormal em oócitos maturados *in vitro* (Ikeda et al., 2010). O gene *Stella* fundamental para a manutenção do desenvolvimento embrionário apresenta sua expressão diminuída em oócitos maturados *in vitro* não competentes levando a um bloqueio do desenvolvimento dos embriões gerados a partir deles (Zuccotti et al., 2009). Por outro lado, existem evidências de que oócitos de IVM super-expressam genes que atuam contra sua viabilidade e capacidade de desenvolvimento. Ainda, as mitocôndrias, elementos relevantes na maturação do ooplasma mostram uma distribuição e conformação anormal após IVM. Como foi citado pelo Dr. Morimoto na conferência, estas anomalias levam a uma baixa taxa de respiração/produção de ATP, o que potencialmente acarreta na geração de embriões com baixa viabilidade ou de desenvolvimento retardado, eventualmente observados em ciclos de IVM.

Como e por que os resultados de IVM variam tanto entre centros que tentam adotar a metodologia levando alguns deles a desistir dela? Muito provavelmente a resposta reside na complexidade de sua execução, o que não se restringe à captação de *complexos cumulus-oócitos* de folículos com aproximadamente 03 a 06 mm e à maturação deles *in vitro*. Um outro grande desafio da IVM é a adequação endometrial, a qual fica comprometida pelo próprio tratamento, visto que a fase folicular, nas pacientes normoovuladoras, é truncada no momento da coleta dos gametas imaturos. Já nos casos de oligoanovulação, os níveis de estradiol usualmente são insuficientes para uma adequada proliferação do endométrio. Exames histológicos de biópsias endometriais seriadas mostraram defeitos da fase lútea em ciclos de IVM, apesar de os níveis séricos de progesterona apresentarem-se normais. Apenas cerca de 35% das pacientes de IVM têm

seu endométrio em sincronia com o dia do ciclo, 58% delas apresentam retardos de até 2 dias. Uma estratégia mencionada para melhorar a receptividade uterina é o uso do hCG no dia da punção, cerca de 4 horas após a coleta (de Vos, 2nd Biogenesi, 2010). Entretanto, caso o endométrio não se apresente adequado à transferência, a opção mais recomendada é a criopreservação por vitrificação dos embriões em estádios desde clivagem até blastocisto e sua transferência em um ciclo de re-aquecimento, quando a paciente desenvolveu um endométrio compatível com a fase lútea. Adotando esta tática, os embriões não são desperdiçados e a eficiência da metodologia aumenta.

O Professor John Eppig (Jackson Laboratories, USA), levantou um dos aspectos mais controversos da tecnologia de IVM em humanos. O questionamento refere-se ao uso correto da nomenclatura "IVM" para a metodologia empregada pelos esterileutas, visto que *in vitro maturation (IVM)* implica na total ausência de estimulação hormonal, seja durante a fase folicular ou anterior à coleta dos oócitos. Analisando os diferentes protocolos de IVM percebe-se que muitos centros utilizam uma "breve" estimulação folicular empregando FSH por 2 a 3 dias seguido de hCG, enquanto que outros grupos empregam apenas o FSH ou apenas o hCG (Fadini, 2nd Biogenesi 2010). O real valor do emprego destes hormônios também é questionável, pois os resultados com ou sem eles são variáveis de centro para centro. Uma vantagem levantada pelos adeptos do uso do FSH no início do ciclo de estimulação é um pequeno aumento do volume folicular, o que facilita a visualização e, conseqüentemente, a punção dos folículos antrais.

A IVM, bem como a ICSI e a vitrificação de embriões é uma tecnologia que não foi gradativamente desenvolvida e não passou por testes clínicos e avaliações médicas rigorosas. Assim sendo, uma das grandes preocupações no seu emprego é o futuro bem estar físico e neuro-motor das crianças nascidas a partir dela. Esta preocupação se justifica pelo fato de o meio de cultivo empregado durante a IVM poder influenciar o desenvolvimento embrionário inicial, quando o novo ser depende exclusivamente do genoma materno até o estágio de 8 células. No ambiente extra-corporal fatores ambientais podem afetar desde o genoma do futuro indivíduo, sua capacidade energética, intelectual e reprodutiva, como citado anteriormente.

Entretanto, apesar destas constatações, a análise crítica dos desfechos clínicos da IVM em termos de nascimentos feita pelo Dr. Rubens Fadini, presidente da conferência e cuja clínica de Monza na Itália, dedica muita pesquisa a esta tecnologia, mostrou dados onde a eficiência da IVM é muito semelhante à da IVF clássica. Estes desfechos corroboram outros dados da literatura em que as taxas de gestação, implantação e nascimento pós-IVM, se equiparam àqueles de técnicas convencionais (Chian et al. 2000; Mikkelsen et al. 2001; Zhao et al., 2009; Frantz et al., 2010).

A IVM foi também citada para os casos de má resposta à estimulação hormonal controlada, sendo esta uma conduta adotada por equipes que a aplicam em ciclos espontâneos. Contudo, em ciclos naturais a IVM apresenta limitações, especialmente relacionadas ao baixo número de *complexos-cumulus-oócitos* coletados em mulheres com contagem folicular normal

Não foi esquecido ainda, o potencial emprego da IVM para tratamento da infertilidade de pacientes sobreviventes de procedimentos oncológicos, as quais tiveram tecido ovariano criopreservado. Por fim deve-se mencionar a maturação *in vitro* de oócitos, para geração de embriões

partenotes, os quais possibilitam a criação de linhagens de células-tronco embrionárias com aplicações em terapias regenerativas.

Ao final do encontro pode-se avaliar que existe um consenso de que a IVM chegou para ficar, assumindo um lugar específico dentro da reprodução assistida. Paralelo ao seu desenvolvimento e disseminação há de ocorrer o aprofundamento do conhecimento sobre a fisiologia folicular e oocitária. Aspectos moleculares e genéticos devem ser explorados, assim como o estabelecimento de uma "factorology", uma combinação de componentes químicos e ambientais como culturas em 3D ou micro-ambientes capazes de aprimorar a qualidade oocitária e principalmente, garantir geração de indivíduos plenamente normais e sadios por IVM. Citando as palavras do Professor Dr. David Albertini, "a prova do princípio é o nascimento de bebês sadios e normais e não a geração de embriões e blastocistos".

O evento de Milão constituiu uma oportunidade para a troca de experiências e a exposição de trabalhos de centros mundiais que se dedicam a tecnologia da IVM. Dentre as conclusões, uma merece destaque: parece ter chegado o momento em que podemos parar de debater sobre a utilidade da "técnica em si" e passar a concentrar esforços na resolução das "dificuldades técnicas" inerentes ao método. A IVM já constitui uma boa alternativa de tratamento para a infertilidade de origem oligoanovulatória por ovários micropolicísticos. A questão que permanece em aberto se refere à possibilidade de também indicá-la nos casos de alterações espermáticas severas ou de infertilidade por fator tubário. Por instante, este parece ser o próximo e grande desafio a ser superado.

### Referências bibliográficas:

- Cha K, Koo JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. (1991) 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* **55**: 109-113.
- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T and Tan SL (2000) Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* **15**: 165-170.
- Edwards RG (1965) Maturation *in vitro* of human ovarian oocytes. *Lancet* **ii**, 926-929.
- Frantz N., Bos-Mikich A, Frantz G, Höher M, Oliveira N, Ferreira M (2010) Maturação *in vitro* de oócitos em ciclos não estimulados para pacientes portadoras de ovários policísticos ou síndrome dos ovários policísticos. *JBRA* **14**: 24-26.
- Ikeda S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S. (2010) Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **313**: 129-136.
- Mikkelsen A, Lindenberg S. (2001) Benefit of FSH priming of women with PCOS to the *in vitro* maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* **122**: 587-592
- Pincus G, Enzmann EV (1935) The comparative behaviours of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*. II The activation of tubal eggs in the rabbit. *J Exp Med* **62**, 665-675.
- Trounson 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.* **62**: 353-362.
- Zhao J-Z, Zhou W, Zhang W, Ge H-S (2009) *In vitro* maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* **91**: 2568-2571.
- Zuccotti M, Merico V, Redi CA, Bellazzi R, Adjaye J, Garagna S. (2009) Role of Oct-4 during acquisition of developmental competence in mouse oocyte. *RBM Online* **19**: Suppl 3: 57-62.

# Bases para criopreservação de espermatozóides e os parâmetros seminais (OMS – 2010)

## Basis for cryopreservation of spermatozoa and semen parameters (WHO – 2010)

Paulo Franco Taitson<sup>1</sup>, Eduardo Yoneyama Mourthé<sup>2</sup>, Antônio Mourthé Filho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professor Adjunto (Doutor) do ICBS/PUC Minas. Diretor Secretário da SBRA.

<sup>2</sup>Acadêmico de Medicina da Faculdade FASEH/MG.

<sup>3</sup>Professor Titular do ICBS/PUC Minas.

### RESUMO

O artigo oferece uma atualização do presente estágio da tecnologia, praticabilidade e limites da criopreservação de espermatozóides humanos. Desta forma, a criopreservação de sêmen representa uma prevenção, uma opção concomitante aos pacientes oncológicos que necessitam de uma oportunidade de manter suas habilidades reprodutivas.

**Palavras-chave:** espermatozóides, banco de sêmen, criopreservação, infertilidade masculina.

### ABSTRACT

The article provides an update of the present stage of technology, practicality and limitations of cryopreservation of human sperm. Therefore, semen cryopreservation is a prevention, a concurrent option to cancer patients who need an opportunity to maintain their reproductive abilities.

**Keywords:** sperm, sperm bank, cryopreservation, male infertility.

### INTRODUÇÃO

O reconhecimento, através de técnicas de reprodução assistida, da importância da manutenção em baixas temperaturas de espermatozóides e de células da linhagem espermatogênica, significou uma revolução nas etapas de criopreservação de sêmen e obtenção de uma gravidez a termo. Assim, a criopreservação de sêmen humano para utilização em reprodução assistida é atualmente procedimento mundialmente reconhecido. A qualidade inicial da amostra, o número de espermatozóides móveis após o descongelamento e os parâmetros da motilidade espermática, avaliados através de análise pormenorizada, são preditivos do potencial fértil do sêmen congelado (Allan et al., 2009; Zegers-Hochschild et al., 2009).

A redução do potencial fértil dos espermatozóides após o descongelamento é um dos principais fatores limitantes do sucesso da inseminação intra-uterina e da fertilização *in vitro* convencional envolvendo sêmen criopreservado. Mesmo utilizando-se técnicas avançadas de criopreservação, 25 a 75% dos espermatozóides morrem ou são lesados irreversivelmente durante esse processo (Centola, 1992).

É aceitável assumir que uma taxa de gravidez cumulativa usando-se espermatozóides descongelados é comparada àquela obtida com sêmen fresco. Todavia, as taxas de fecundidade por ciclo para sêmen fresco e descongelado podem se apresentar significativamente diferentes. Assim, a inseminação artificial com espermatozóides descongelados tem uma taxa de gravidez reduzida que varia de 5 a 20% por ciclo. A criopreservação de sêmen

é um ramo da criobiologia que estuda a manutenção de espermatozóides em baixas temperaturas, preservando sua capacidade de fertilizar óvulos e adequado desenvolvimento embrionário inicial (Allan et al., 2009).

As primeiras abordagens práticas de congelamento de sêmen remontam ao século XVIII, através de Spallanzani em 1776 (Nieschlag & Behre, 1997), com observações sobre a sobrevivência de espermatozóides a baixas temperaturas. Mantegazza em 1866 sugeriu que os espermatozóides deveriam ser congelados para utilização futura (bancos de sêmen). Shettles em 1940 indicou a existência de variações individuais perceptíveis após o descongelamento (Holt, 2000).

O sucesso na criopreservação de espermatozóides de mamíferos começou a ter grande repercussão após as observações de Polge et al em 1949 mostrando que o glicerol tem interessantes e peculiares propriedades como meio crioprotetor. A técnica do vapor de nitrogênio líquido introduzida por Sherman no início dos anos 60 ainda continua a ser muito empregada. Com o passar dos anos, o congelamento com velocidade lenta e controlada tornou-se o método de escolha para a criopreservação do sêmen e permitiu a utilização de taxas de resfriamento reprodutíveis levando à efetiva e uniforme desidratação celular, evitando a formação de cristais intracelulares. Sherman, em 1964, identificou padrões de toxicidade para o dimetilsulfóxido (DMSO) na quando na condição de crioprotetor. Ackerman, em 1968, mostrou as repercussões do choque térmico no congelamento e descongelamento (Verheyen et al, 1993; Gilmore, et al, 2000).

Na década de 70, Bankay relatou o nascimento de bebês através de técnicas de reprodução artificial utilizando sêmen diluído e criopreservado em pequenos péletes. Os anos 80 foram marcados pelo aumento da eficácia das técnicas de congelamento. Oates, em 1996, obteve sucesso na criopreservação de espermatozóides recolhidos do epidídimo. Fischer e colaboradores, no mesmo ano, relataram a viabilidade do congelamento de gametas extraídos do testículo (Fischer et al, 1996).

### REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS BANCOS DE CÉLULAS E TECIDOS GERMINATIVOS (RDC/ANVISA nº 33, 17/02/2006).

Buscando padronização para o acondicionamento de espermatozóides, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) introduziu procedimentos relativos a bancos de células e tecidos germinativos (BCTG) no

país. A ponderação inicial estabelece a necessidade de o BCTG estar vinculado administrativa e tecnicamente a um serviço assistencial de saúde. Sendo condicionante para funcionamento a licença emitida pelo Órgão de Vigilância Sanitária competente. Essa licença é válida pelo período de 01 (hum) ano, a contar da data de sua emissão, podendo ser cassada, a qualquer momento, em caso de descumprimento do regulamento técnico estabelecido por esta Resolução,

Aos bancos de células e tecidos germinativos (BCTG), são atribuídas as seguintes competências:

- a) obter termo circunstanciado para congelamento de espermatozoides, conforme modelo padronizado pelo BCTG, de acordo com a legislação vigente;
- b) orientar, viabilizar e proceder à coleta, quando necessário;
- c) avaliar e processar as células espermáticas recebidas ou coletadas;
- d) responsabilizar-se pela realização dos exames laboratoriais necessários à identificação de possíveis contra-indicações e condições especiais necessárias ao seu emprego;
- e) garantir a qualidade do processo de conservação dos espermatozoides;
- f) liberar o material preservado, para a sua utilização conforme a legislação vigente;

Quando o BCTG estiver instalado em um estabelecimento assistencial de saúde, ele poderá compartilhar os ambientes técnicos e de apoio (recepção de doadores, centro cirúrgico ambulatorial, laboratório clínico, farmácia, central de material esterilizado, depósito central de armazenamento de nitrogênio líquido (ABNT/NBR 12.188), depósito de material de limpeza, depósito de materiais, sanitários, copa, sala de equipamentos, posto de enfermagem e serviços, sala de utilidades, quarto individual ou coletivo de curta duração, área para recepção de pacientes, sala de espera de acompanhantes, vestiário para

funcionários, lavanderia e centrais de energia elétrica, climatização, água, esgoto, gases, telefonia e lógica).

Caso o armazenamento das células ou tecidos seja efetuado em tanques de nitrogênio líquido, ou haja um sistema de segurança com nitrogênio líquido para congelador com temperatura igual ou inferior a 135°C negativos, a área de armazenamento deve possuir:

- a) visualização externa do seu interior;
- b) sistema de climatização que mantenha a pressão negativa em relação aos ambientes adjacentes e sistema exclusivo de exaustão mecânica externa para diluição dos traços residuais de nitrogênio que mantenha uma vazão mínima de ar total de 75(m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup>. Este sistema deve prover a exaustão forçada de todo o ar da sala, com descarga para o exterior. As grelhas de exaustão devem ser instaladas próximas ao piso. O ar de reposição deve ser proveniente dos ambientes vizinhos ou suprido por insuflação de ar exterior, com filtragem mínima com filtro classe G1; 24°C; umidade relativa do ar entre 40% e 60%; vazão mínima de ar total de 45(m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup>; vazão mínima de ar exterior de 15(m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup> e filtragem mínima no insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8.

Determinante também na RDC n.33 é a caracterização da sala de processamento de sêmen que deve tornar-se o único espaço onde se pode receber material potencialmente contaminado. Requer que: "a sala destinada ao processamento de sêmen, com acesso restrito pelo vestiário de barreira; sistema de climatização que mantenha pressão positiva em relação aos ambientes adjacentes; condições de temperatura 21 C a 24 C; unidade relativa

do ar entre 40% e 60%; vazão mínima de ar total de 45 (m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup>; vazão mínima de ar exterior de 15(m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup> e filtragem mínima no insuflamento com filtros G3+carvão ativado+F8".

Fica evidente a preocupação do órgão fiscalizador quanto ao rigor do local apropriado para manipulação das frações seminais obtidas. Assim estabelece que a manipulação das amostras somente deve ser efetuada em uma área limpa classificada, no mínimo, como ISO Classe 5, segundo a norma NBR/ISSO 14644-1 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Para a obtenção dessas condições, o BCTG deve utilizar uma das opções abaixo:

- a) cabine de segurança biológica Classe II Tipo A;
- b) módulo de fluxo unidirecional;
- c) sala classificada, como ISO classe 5 no mínimo, segundo as orientações da NBR/ISSO 14644-4 da ABNT. Neste caso o BCTG deve obrigatoriamente possuir uma antecâmara de acesso à sala de processamento, além do vestiário de paramentação.

### **ANÁLISE E PREPARAÇÃO DE SÊMEN PARA CRIOPRESERVAÇÃO ( Taitson & Romano, 2007; WHO, 2010) Coleta de sêmen**

As amostras de sêmen devem ser coletadas após um período de três a cinco dias de abstinência sexual. Os frascos de coleta de boca larga com capacidade de volume mínimo de 10 mL são os mais utilizados. A transparência do mesmo possibilita avaliar as condições do sêmen durante a etapa de liquefação. A automanipulação (masturbação) é o método de escolha. As práticas de coito interrompido e coletas em preservativos podem, muitas vezes, estabelecer contato entre o líquido seminal e substâncias nocivas ao mesmo. O sêmen coletado deve ser enviado ao laboratório para criopreservação em tempo não superior a 1 hora.

### **Análise a fresco**

Nesta etapa, obtém-se o espermograma com valorização da concentração espermática, motilidade e atividade, isto é, a relação entre espermatozoides vivos e mortos. Dez µL de sêmen depositados num campo microscópico, com aumento de 400x, possibilita obter-se visão geral do sêmen a ser criopreservado. A insuficiência de volume não significa, em muitos casos, problema importante sob o aspecto da infertilidade, principalmente quando há boa vitalidade dos espermatozoides. Em geral, o volume de sêmen possui relação direta com a frequência de coitos. Assim, pode-se estimar a atividade e a motilidade dos espermatozoides obtidos (WHO, 2010).

A motilidade dos espermatozoides é um fator necessário para a fertilidade, porém não é suficiente para indicar capacidade de fertilização. A atividade fisiológica dos espermatozoides está ligada à manutenção de nível mínimo, porém suficiente, de ATP para suprir as necessidades de sua motilidade por determinado período de tempo. Um espermatozoide normal pode perder sua habilidade de fertilização muito antes de perder sua motilidade (Henry et al, 1993).

A determinação do número de espermatozoides num ejaculado é uma dos principais variáveis utilizadas na avaliação de sua capacidade de fertilização, sendo fator determinante na eficácia do processo reprodutivo. Por isto, a estimativa do número de espermatozoides/mL de sêmen é um passo importante do processo de criopreservação seminal.

Embora existam divergências sobre o melhor método de determinação da concentração de células espermáticas, a câmara de Makler ainda desponta com destaque para utilização. Ela permite, além, da contagem dos esperma-



tozoides, a avaliação de sua motilidade, o que não ocorre no hemocitômetro (Mortimer et al, 1996; WHO, 2010).

**Tabela 1.** Valores do espermograma humano, segundo a Organização Mundial da Saúde em 2010. Limites inferiores de referência (percentil 5 e seus intervalos de confiança 95%).

Parâmetro	Limite inferior
Volume (mL)	1,5 (1,4-1,7)
pH	7,2 – 8,0
Concentração espermática ( $10^6$ spz/mL)	15 (12-16)
Total de espermatozoides no ejaculado ( $10^6$ )	39 (33-46)
Motilidade total (PR + NP %)	40 (38-42)
Motilidade progressiva (PR %)	32 (31-34)
Morfologia (normais %)	4 (3-4)
Atividade (vitalidade/ % de espermatozoides vivos)	58 (55-63)
Plácitos	< $1.10^6$ /mL

PR = motilidade progressiva: A + B  
NP = motilidade não progressiva: C

### Identificação das amostras

Deve ser atribuída, a cada amostra coletada, uma identificação numérica ou alfanumérica. Esta identificação deve acompanhar toda a documentação e o material durante os testes, processamento, criopreservação, armazenamento, descongelamento e liberação, devendo, também, ser atribuída às alíquotas, permitindo a identificação de cada uma delas. A identificação deve ser feita com etiquetas resistentes a baixas temperaturas e impermeáveis.

### Adição de crioprotetores

A escolha do meio de criopreservação para o sêmen deve ser dirigida para a melhoria da capacidade de manter a integração e função celulares durante o processo de congelamento e descongelamento. Sabe-se que a capacidade de fertilização do sêmen fresco é, em muitos casos, maior do que a do congelado. Tal condição pode ocorrer devido ao uso de meio de criopreservação inadequado o qual provoca causa danos celulares atribuíveis ao crioprotetor utilizado (Verheyen, 1993, Taitson & Souza, 2008). De uma maneira geral, podemos agrupar os crioprotetores em dois grandes grupos, os permeáveis (que apresentam proteção intracelular) e os impermeáveis (que propiciam proteção externa à célula). O primeiro grupo é composto pelo glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, propanediol e etilenoglicol, entre os mais conhecidos. Os crioprotetores impermeáveis de maior utilização são a gema de ovo de galinha, leite em pó, açúcares, água de côco e glicose (Gilmore, et al, 2000).

O crioprotetor permeável deve proporcionar:

- diminuição da taxa de difusão da água da célula,
- diminuição da temperatura de nucleação homogênea,
- diminuição da taxa de crescimento de cristais de gelo e,
- diminuição do ponto de congelamento.

Os meios de criopreservação convencionais de sêmen humano são baseados em:

- glicerol, como principal crioprotetor permeável, na concentração final entre 5 e 10 %;
- adição soluções-tampão, tais como citrato, Tes-Tris ou Hepes;
- adição de macromoléculas não permeáveis, tais como gema de ovo ou albumina.

Usualmente, os protocolos de criopreservação incluem adição de glicerol e Tes-Tris e gema de ovo tamponados, na razão de 1:1 com o sêmen (RED LARA, 2006; Al-Hasani & Zohni, 2008).

É importante a utilização de meios crioprotetores que,

em função sua alta osmolaridade, penetrem na membrana espermática durante o congelamento e saiam dessa membrana durante o descongelamento, causando baixo dano celular. Tal como já mencionado, a eficácia dos agentes crioprotetores pode ser medida comparando-se os parâmetros pré- congelamento com os obtidos no pós-descongelamento, como a motilidade. Entretanto, estas avaliações não levam em consideração os danos adquiridos pela membrana celular durante o processo de criopreservação e nem a inativação da reação acrossomal. O processo também leva à perda ou inativação da acrosina, uma importante enzima para a fertilização. Além disso, o espermatozoide pode perder sua habilidade de atingir capacitação máxima ou sofrer reação acrossomal ou mesmo perder alguns mecanismos complexos de ativação do ovócito durante o processo de fertilização (Watson et al., 1992., Devireddy et al.,2000).

### RESFRIAMENTO

A passagem do sêmen, adicionado de crioprotetores, de  $-37$  °C para a temperatura de congelamento ( $-196$ °C) deve ser lenta e programada. Congelamento (5-50 °C/min) e descongelamento (4 °C a 37°C/ min) lentos podem ser parcialmente responsáveis pelo aumento na população de espermatozoides capacitados, com acrosoma ativo e funcionalmente viáveis (Bielanski & Vajta, 2009; WHO, 2010).

### CONGELAMENTO

A criopreservação deve ocorrer o mais precocemente possível, podendo ser feita em equipamento programável de congelamento ou em sistema manual. A criopreservação deve ser obtida submetendo a amostra ao congelamento sob variação controlada da temperatura, em processo de congelamento validado, devendo ser registrados os dados pertinentes a curva de redução de temperatura, quando utilizada a técnica de congelamento lento e a origem, o lote e a concentração dos meios e reagentes utilizados. O BCTG deve manter registros da avaliação da viabilidade de cada amostra descongelada para uso.

Os seguintes fatores são importantes para a aplicação de taxa de congelamento adequada:

- viscosidade da solução intracelular,
- área da superfície celular,
- taxa de difusão da água através da membrana celular,
- distância entre a célula e o primeiro cristal de gelo a se formar,
- viscosidade da solução extracelular e,
- permeabilidade do crioprotetor utilizado.

### Crio-injúria

Os meios de criopreservação são, em geral, estocados em baixa temperatura ( $-10$  °C). A adição destes meios ao sêmen a ser criopreservado deve ser feita em temperatura de 37 °C. A inobservância deste procedimento é uma das causas principais de crio-injúria.

Causas individuais de crio-injúria:

- choque frio (temperatura crítica: entre 0 e  $-40$ °C),
- pH,
- gelo intracelular,
- gelo extracelular,
- toxicidade do crioprotetor,
- efeito soluto e,
- efeito volume.

### TEMPO DE ESTOCAGEM

Não existe grande volume de informação científica o tempo de armazenamento do sêmen congelado. Sabe-se hoje, que parâmetros seminais humanos, como moti-

lidade e atividade, tendem a decrescer com o tempo. Quando a estocagem é mantida de forma criteriosa, o sêmen pode ser utilizado em diferentes de técnicas de reprodução assistida, tais como fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Em março de 2004, foi o nascimento de um bebê utilizando-se semen congelado por 21 anos e FIV. Em 2005, foi relatado o nascimento de criança através de inseminação intrauterina combinada com sêmen congelado por 28 anos. (Horne et al., 2004; Feldschuh et al., 2005).

Estudo publicado em 2005 avaliou 238 amostras seminais de 34 indivíduos (18 tinham câncer) no período de 1976 a 1989. Existiam amostras com 21 anos de congelamento. Todas as amostras apresentaram redução considerável da motilidade seminal pós descongelamento em relação ao sêmen fresco (Bolten et al., 2005).

Clarke e colaboradores em 2006, estudando seis amostras congeladas após 28 anos destacaram a motilidade e a habilidade seminal para interação com a zona pelúcida. A reação acrossômica normal foi estabelecida em 4 amostras. Outro estudo mostrou que somente 27% dos homens que congelam sêmen pré tratamento de câncer utilizam as amostras em um tempo inferior a dez anos (Blackhall et al., 2002; Taitson et al., 2009).

### DESCONGELAMENTO

Os espermatozoides são células sensíveis a alteração brusca de temperatura. O descongelamento lento e progressivo de sêmen criopreservado em glicerol reduz as chances de formação excessiva de cristais de gelo intracelular. Fortes indícios revelam tendência do uso, no futuro, da técnica de vitrificação, baseada em congelamento e descongelamentos ultra-rápidos, durante os quais não há tempo suficiente para a formação de cristais (Trummer et al., 1998).

### ANÁLISE PÓS-DESCONGELAMENTO

A redução da atividade espermática pós-descongelamento pode variar de 25-50%. Importância maior é dada às alterações de motilidade, morfologia e percentagem de espermatozoides vivos. Uma análise pós-descongelamento criteriosa possibilita melhores êxitos na utilização de espermatozoides congelados em técnicas de reprodução assistida.

### INDICAÇÕES (Costabile, 1993; Sanger et al., 1992).

A criopreservação de espermatozoides humanos é indicada nas seguintes situações:

- anterior à quimioterapia e /ou radioterapia; o congelamento seminal deve anteceder aos tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos, os quais geralmente ocasionam aplasia germinativa; aproximadamente 30.000 a 40.000 jovens americanos entre 18 e 35 anos são anualmente diagnosticados com câncer; Câncer de testículo, doença de Hodgkin e leucemia são os tipos de neoplasias mais encontradas.
- assincronia da atividade reprodutiva e ciclos induzidos; mulheres com ciclos assíncronicos são cada mais comuns em protocolos de ICSI.
- anterior à cirurgias pélvicas que possam comprometer a fertilidade futura, como microcirurgias reconstrutivas no trato genital masculino (vaso-vaso e vaso-epidídimo anastomoses),
- anterior à vasectomia; indivíduos que necessitam realizar vasectomia podem criopreservar os espermatozoides antes da realização desta cirurgia.

### CONCLUSÃO

Passados 60 anos, a habilidade de se congelar espermatozoides tem causado profundo impacto na ciência

reprodutiva. A melhoria da qualidade dos crioprotetores, a forma de acondicionamento do sêmen e o maquinário utilizado, propiciam melhora significativa na viabilidade dos espermatozoides após o descongelamento. Novos modelos de biologia molecular, bioquímica analítica, fisico-química e biologia reprodutiva, são preditivos ao avanço da reprodução humana masculina.

### SUMMARY

This paper provides a review of the present state of technology, practicability, and limits of cryopreservation of human spermatozoa. Thus cryopreservation of semen represents a preventive, concomitant therapeutic option in oncological patients that offers the chance to maintain reproductive abilities.

Key-words: spermatozoa, sperm banking, cryopreservation, male infertility.

### Endereço para correspondência:

Paulo Franco Taitson Ph.D  
Rua Rodrigues Caldas, 600/18  
30190-120 Belo Horizonte – MG/Brasil  
Tel: (31) 33371960  
e-mail: taitson@pucminas.br

### Referências Bibliográficas:

- Al-Hasani S, Zohni K. Futures aspects in human cryopreservation. *J Famil Reproduct Health* 2008; 2: 1-11.
- Allan A, et al. *Sperm banking: Theory and practice*. Cambridge: CUP; 2009.
- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reprod* 2009; 24: 2457-67.
- Blackhall FH, Atkinson A D, Maaya MB, Ryder WDJ, Horne G, Brison DR, Lieberman BA, Radford JA. Semen cryopreservation, utilization and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *BJC* 2002; 87: 381-4.
- Bolten M, Weissbach L, Kaden R. Criopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urology* 2005; 44: 904-8.
- BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 33 de 17 de fevereiro de 2006. Regulamento técnico para funcionamento dos Bancos de células e tecidos germinativos (BCTG).
- Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. *J Androl* 1992; 13: 283-8.
- Clarke, G. N.; Liu, Y.; Baker, H. W. (2006), Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil. Steril* 2006; 86: 721-2.
- Costabile R. The effects of cancer and cancer therapy on male reproductive function. *J Urol* 1993; 149: 1327.
- Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum. Reprod* 2000; 15: 1125-35.
- Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A: Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005; 84: 1017.
- Fischer R, Bankloh V, Naether OGJ, Schulze W, Salzbrunn A, Benson DM. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy. *Human Reprod* 1996; 11: 2197-9.
- Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 2000; 15: 335-43.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser J. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance

- of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril* 1993; 60: 911-8.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
- Horne G, Atkinson AD, Pease EH, Logue JP, Brison DR, Lieberman BA. (2004), Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment case report. *Hum. Reprod* 2004; 19: 1448-9.
- Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human Reprod* 1986; 1:299-303.
- Nieschlang E, Behre HM. *Andrology- male reproductive health and dysfunction*. Berlin: Springer-Verlag; 1997: 437.
- Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 166.
- RED LARA. Manual de procedimentos de laboratório de reprodução assistida. 2006. Acesso em 10 de janeiro de 2010. Disponível em: [www.redlara.com](http://www.redlara.com)
- Sanger WG, Olson JH, Sherman JK. Semen cryobanking for men with cancer criteria change. *Fertil Steril* 1992; 58: 1024.
- Taitson PF, Romano LA. Princípios da criopreservação e uma revisão da criopreservação de espermatozoides humanos. *JBRA - Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2007; 11: 22-26.
- Taitson PF, Souza MCB. Incidência da infertilidade masculina por fatores ocupacionais no Estado de Minas Gerais. *JBRA - Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2008; 12: 14-18.
- Taitson PF, Mourthe Filho A, Faria ARL, Melo UBM, Silva FKL, Souza MCB. Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa: 17 years. *JBRA - Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida* 2009; 13: 39-40.
- Trummer H, Tucker K, Young C, Kaula N, Meacham RB. Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertil Steril* 1998; 70: 1162-4.
- Verheyen G, Pletincx I, Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod* 1993; 8: 1678-84.
- Watson PF, Critser JK, Mazur P. *Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications*. In: Templeton AA, Drife JO. eds. *Infertility*. New York: Springer; 1992: 101-14.
- World Health Organization. *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 5<sup>th</sup> Genève: WHO; 2010.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Mouzon J et al. The International Committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the WHO revised glossary on ART technology 2009; 24: 2683-7.

# Endometriose e fertilização *in vitro*. Aspectos atuais.

## Endometriosis and *in Vitro* Fertilization. New aspects

Ivana Rippel Hauer<sup>1</sup>, Vivian Ferreira do Amaral<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bióloga, doutoranda do Curso de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná

<sup>2</sup> Médica Ginecologista e Obstetra, Professora Adjunta do curso de Medicina e do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Professora Adjunta do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná.

### RESUMO

Endometriose é uma afecção benigna e caracterizada por uma alta taxa de recorrência. A sua etiologia e patogenese permanecem ainda indefinidos. Tipicamente, a endometriose causa dor e infertilidade, apesar de até 20-25% das pacientes serem assintomáticas. O tratamento cirúrgico é realizado pela videolaparoscopia com a exereses dos implantes de endometriose. A associação de tratamento médico clínico ou cirúrgico multiprofissional favorecem a qualidade de vida de mulheres com endometriose. Apesar desta vantagem teórica, não existe evidência de que a combinação do tratamento médico cirúrgico melhore significativamente a fertilidade, e podendo desnecessariamente atrasar os tratamentos especializados. O propósito desta revisão é avaliar se os métodos de tratamento da endometriose podem favorecer os resultados dos programas de Fertilização *in Vitro* e como a endometriose pode afetar o número de oócitos, a qualidade embrionária e a possibilidade de gravidez.

**Palavras-chave:** endometriose, infertilidade, fertilização *in vitro*, qualidade embrionária, implantação.

### ABSTRACT

Endometriosis is a benign condition characterized by high recurrence rates. The etiology and pathogenesis remain unclear. Typically, endometriosis causes pain and infertility, although 20–25% of patients are asymptomatic. Surgical treatment aims of therapy include relief of symptoms, resolution of existing endometriotic implants.

Specific combinations of multiprofessional approach can ameliorate the quality of life of women with endometriosis. Although theoretically advantageous, there is no evidence that a combination medical-surgical treatment significantly enhances fertility, and it may unnecessarily delay further fertility therapy. The purpose of the review was to explore how the endometriosis's treatments can improve the performance of *In Vitro* Fertilization programs, how the endometriosis affects the oocytes numbers, embryos quality and pregnancy outcome.

**Key-words:** endometriosis, infertility, *in vitro* fertilization, embryo quality, implantation.

Endometriosis is a very common debilitating disease that occurs in 6 to 10% of the general female population; in women with pain, infertility, or both, the frequency is 35–50%. (Bullett, C et al, 2010a) Women with endometriosis typically present with pelvic pain, infertility or an adnexal mass. Surgical or medical therapy is efficacious for pelvic pain due to endometriosis, but treatment of endometriosis in the female partner of an infertile couple raises a number of complex clinical questions that do not

have simple answers. There are few infertility problems requiring greater clinical acumen than those needed to plan therapy for an infertile woman with endometriosis. (The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2004)

Fecundity is defined as the probability of a woman achieving a live birth for any given month. In normal couples, fecundity is in the range of 0.15 to 0.20 per month and decreases with age. In untreated women with endometriosis and infertility, monthly fecundity is 0.02 to 0.10. Early studies suggested that 25% to 50% of infertile women have endometriosis and that 30% to 50% of women with endometriosis are infertile. There is a higher prevalence of endometriosis in infertile women (48%) compared with fertile women undergoing tubal sterilization (5%). Others reports have confirmed that infertile women are 6 to 8 times more likely to have endometriosis than fertile women.

The hypothesis that endometriosis causes infertility or a decrease in fecundity remains controversial. Whereas there is a reasonable body of evidence to demonstrate an association between endometriosis and infertility, a cause and effect relationship has not been established.

On the premise that endometriosis does cause infertility, then eradication of the disease should improve fecundity. Two randomized controlled trials (RCTs) have compared outcomes following laparoscopic ablation or expectant management of endometriosis. In the Canadian Collaborative Group on Endometriosis RCT involving 341 women with stage I/II disease followed for 36 weeks after laparoscopy, monthly fecundity was 0.047 and 0.024 in the ablated and untreated groups, respectively.

In the Gruppo Italiano per lo Studio dell' Endometriosi RCT involving 101 women with stage I/II disease followed for 52 weeks after laparoscopy, fecundity was 0.016 and 0.019 in the ablated and untreated groups, respectively. Although fecundity was significantly improved only in the Canadian surgical trial, fecundity remained significantly lower than that observed in normal fertile women. Thus the visible lesions of endometriosis contribute only a small fraction of the reduced fecundity seen in women with endometriosis. (Parazzini, F 1999)

There are several biologic mechanisms that may link endometriosis and infertility, none of these mechanisms has been proven to decrease fecundity in women. These mechanisms are: distorted pelvic anatomy, altered peritoneal function, altered hormonal and cell-mediated function, endocrine and ovulatory abnormalities and impaired implantation. (Schenken, RS 1984, Sunigani et al 1988, Lebovic et al 2001) Whereas medical therapy is effective for relieving pain associated with endome-



triosis, there is no evidence that medical treatment of endometriosis improves fecundity. Several options have been suggested for treatment: danazol, gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRH-a) and antagonists, progestins and combined estrogen-progestin therapy. In stage I/II endometriosis, laparoscopic ablation of endometrial implants has been associated with a small but significant improvement in live birth rates. Stage III/IV endometriosis, without other identifiable infertility factors, conservative surgical treatment with laparoscopy and possible laparotomy may increase fertility. (Bulleti, C et al 2010b)

More recent data indicate that the incidence of endometriosis has not increased in the last 30 years and remains at 2.37–2.49/1000/y, which equates to an approximate prevalence of 6–8%. A complex network of humoral and cellular immunity factors modulates the growth and inflammatory behavior of ectopic endometrial implants and affects embryo implantation. (Bulleti, C et al 2010c) Women with endometriosis have an increased volume of peritoneal fluid with a high concentration of activated macrophages, prostaglandins, IL-1, TNF, and proteases. These alterations may have adverse effects on the function of the oocyte, sperm, embryo, or fallopian tube. Moreover, an ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid is thought to be responsible for fimbrial failure of ovum capture

Elevated levels of IgG and IgA antibodies (autoantibodies to endometrial antigens) and lymphocytes may be found in the endometrium of women with endometriosis.

These abnormalities may alter endometrial receptivity and embryo implantation.

Some authors have reported that uterine implantation was affected by changes in receptivity in endometriosis. Uterine contractility (UC) controls the processes of endometrial shedding at the time of menstruation, transport of gametes, conception, implantation, and maintenance of ongoing pregnancies. Abnormal UC patterns are mainly associated with three medical entities: dysmenorrhea, endometriosis, and infertility. Endometriosis and the presence of endometrial cells in the abdomen were recently related to a specific pattern of UC. (Bulleti, C et al 2010d)

The surgical removal of endometriotic implants in minimal-mild severity endometriosis was shown to improve fertility in two randomized controlled studies. IVF-ET is particularly appropriate in cases of infertility associated with a history of endometriosis that involve compromised tubal function, male factor, and/or other treatment failures. In particular, IVF-ET is a powerful therapeutic tool for the treatment of infertility-related endometriosis after failure of other lines of treatment.

Aboulghar suggested that, when the objective is to treat infertility, IVF-ET without prior surgery would probably be the best option. Thus, patients with a diagnosis of advanced endometriosis may be encouraged to undergo IVF-ET as the first-line treatment, before any attempt at surgical treatment (Aboulghar, MA et al 2003).

Despite some evidence showing lower pregnancy rates with IVF in patients with endometriosis compared to patients with other indications for IVF, IVF can be an effective treatment for infertility associated with endometriosis. Surgical removal of endometriosis lesions and adhesions has been shown to improve monthly fecundity rates in women attempting to conceive spontaneously. In addition, we have found in an earlier study higher pregnancy rates in patients who had surgical treatment of endometriosis after a failed IVF attempt compared to those without surgery

Barnhart et al (2002) included data from 22 studies, for a total of 2,377 IVF cycles of women with endometriosis cycles and of 4,383 IVF cycles of women without endometriosis. Table I summarizes all the studies and the results concerning the impact of endometriosis in the IVF treatment. The finding of a negative association of endometriosis and a lower pregnancy rate was consistent in all analyses. The meta-analysis noted a statistically significant negative association in the crude analysis and a stronger negative association after controlling for confounding variables. Additionally, was demonstrated a poorer success with IVF with an increase in severity of the disease. There is a 36% reduction in pregnancy rate for those with severe endometriosis compared with those with mild disease (OR, 0.64; CI, 0.35–1.17).

These data therefore suggest that the presence of endometriosis affects multiple aspects of the reproductive cycle, including oocyte quality, embryogenesis, and/or the receptivity of the endometrium. (Barnhart, K et al 2002) Suzuki et al., 2004 made a retrospective study with 611 cycles divided in three groups: Group A (n=80 cycles) had ovarian endometriomas that were aspirated and identified as "chocolate" cysts at the time of oocyte retrieval, Group B (n=248 cycles) was the endometriosis diagnosed by laparoscopic before IVF cycle and Group C (n=283 cycles) undergoing IVF because of tubal factor without endometriosis previously diagnosed by laparoscopy.

These groups were compared for differences in retrieved number of oocytes, fertilization rate, embryo quality, implantation rate, pregnancy rate, and live birth rate.

Even after two decades of IVF-ET treatment, IVF outcomes in patients with endometriosis remain controversial. Table II shows the results between the three groups.

Some investigators have found no differences in pregnancy rates when comparing patients with and without endometriosis (Diaz, I et al 2000). Alternatively, adverse effects of endometriosis on oocyte and embryo quality, as well as on implantation rates, have been reported by several investigators. Barnhart et al. recently performed a meta-analysis on the effects of endometriosis on IVF; they found that the "pregnancy rate is almost one-half that of women with other indications for IVF" and that "the effect of endometriosis is not exclusively on the receptivity of the endometrium but also on the development of the oocyte and embryo". In Suzuki's study, significantly fewer oocytes were retrieved from the endometriosis groups (group A and group B) than from the nonendometriosis group (group C). Although the fertilization rate was slightly, but not significantly, lower in the endometriosis groups (group A and group B), the depressive effects of endometriosis on oocyte development are consistent with the meta-analysis.

The results from Suzuki's retrospective study suggest that endometriosis does not affect embryo quality and the related parameters of pregnancy, as indicated by the fertilization rate, embryo quality, implantation rate, pregnancy rate, and live birth rate, independent of an ovarian endometrioma. However, these results also demonstrate that endometriosis, even after diagnostic laparoscopy with treatment when necessary, clearly affects the number of oocytes, irrespective of the presence of an ovarian endometrioma.

Shahine et al., 2009a hypothesize that surgical removal of endometriosis lesions may result in improved embryo quality and if this is true, it may partially explain the higher pregnancy rates observed after surgery for endometriosis in some patients, comparing embryo quality in the same patients undergoing IVF cycles before and after surgical treatment of endometriosis to examine whether

**Table I.** Results of bivariate analysis and multiple logistic regression analyses comparing endometriosis patients with controls.

Outcome	Endometriosis	Control	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR <sup>a</sup> (95% CI)
All patients <sup>b</sup> (n = 2,909)				
Pregnancy rate	25.42	29.52	0.81 (0.72–0.91)	0.63 (0.51–0.77)
Fertilization rate	59.69	65.94	0.95 (0.94–0.95)	0.87 (0.85–0.88)
Implantation rate	12.72	18.08	0.86 (0.85–0.87)	0.86 <sup>c</sup> (0.85–0.88)
Mean no. of oocytes	7.81	7.30	1.06 (1.04–1.08)	0.92 (0.85–0.99)
Peak E2	3545.04	4399.93	N/A	N/A
Endometriosis only vs. tubal factor only <sup>d</sup> (n = 2,893)				
Pregnancy rate	25.38	27.71	0.88 (0.79–1.00)	0.56 (0.44–0.70)
Fertilization rate	59.50	66.09	0.95 (0.94–0.95)	0.81 (0.79–0.83)
Implantation rate	12.72	18.08	0.86 (0.85–0.88)	0.86 <sup>c</sup> (0.85–0.88)
Mean no. of oocytes	7.79	7.30	1.06 (1.04–1.08)	0.82 (0.75–0.90)
Peak E2	3545.04	4399.93	N/A	N/A
Stage I–II <sup>e</sup> (n = 2,602)				
Pregnancy rate	21.11	27.71	0.70 (0.56–0.87)	0.79 (0.60–1.03)
Fertilization rate	58.38	66.09	0.93 (0.92–0.94)	0.94 (0.93–0.96)
Implantation rate	11.31	18.08	0.80 (0.78–0.82)	0.88 (0.85–0.90)
Mean no. of oocytes	8.19	7.30	1.11 (1.06–1.14)	0.56 (0.49–0.65)
Peak E2	5813.38	4399.93	N/A	N/A
Stage III–IV <sup>f</sup> (n = 2,575)				
Pregnancy rate	13.84	27.71	0.42 (0.31–0.57)	0.46 (0.28–0.74)
Fertilization rate	74.47	66.09	1.08 (1.06–1.10)	1.54 (1.39–1.70)
Implantation rate	10.23	18.08	0.75 (0.72–0.79)	not interpretable
Mean no. of oocytes	6.70	7.30	0.94 (0.91–0.98)	not interpretable
Peak E2	1447.74	4399.93	N/A	N/A

Note: P < .001 comparing endometriosis with control group in every outcome category. N/A = not applicable.

a Adjusted for stimulation regime, publication date, and age except where noted.

b Includes endometriosis patients with other concurrent infertility factors; controls include all factors except endometriosis.

c Adjusted for publication date and age.

d Includes only endometriosis patients (all stages) with no other infertility factors, controls are tubal factor only.

e Compares stages I–II endometriosis patients with tubal factor controls.

f Compares stages III–IV endometriosis patients with tubal factor controls.

Barnhart. IVF in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2002.

**Table II.** IVF outcomes among the groups.

	Group A	Group B	Group C
Cycles	80	248	283
Age (y)	34.6 ± 3.3	34.7 ± 3.3	34.0 ± 8.8
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.3 ± 0.5	21.7 ± 0.9	22.1 ± 0.8
No. of oocytes retrieved	4.40 ± 2.99	4.48 ± 2.81	5.34 ± 2.99
	(P = .0037 vs. group C)	(P = .0001 vs. group C)	
Fertilization rate (%)	77.5 ± 28.1	78.8 ± 27.9	82.0 ± 21.9
Good quality rate <sup>a</sup> (%)	67.2 ± 32.5	63.0 ± 36.8	58.1 ± 35.1
Transferred embryos	2.20 ± 0.86	2.35 ± 0.83	2.67 ± 0.89
	(P = .0001 vs. group C)	(P = .0001 vs. group C)	
Implantation rate (%)	14.1	11.7	11.3
Pregnancy rate per ET (%)	25.3	22.3	23.9
Live birth rate per ET (%)	14.7	15.0	15.4

Note: Values are mean ± SD. IVF = in vitro fertilization; BMI = body mass index; ET = embryo transfer.

a Embryos were graded from 1 to 5 according to the classification of Veeks and defined as "good quality" when the embryo was 1 or 2 grade; 80 cycles had ovarian endometriomas that were aspirated and identified as "chocolate" cyst(s) at the time of oocyte retrieval (group A); 248 cycles did not have cysts at the time of oocyte retrieval, while endometriosis was diagnosed by laparoscopy or laparotomy before IVF (group B); 283 cycles had tubal factor without endometriosis, as diagnosed by previous laparoscopy (group C).

Suzuki. IVF outcomes with endometriomas. *Fertil Steril* 2005.

**Table III.** IVF parameters in cycles before and after laparoscopic treatment of endometriosis (N=30)

	IVF cycle before surgery	IVF cycle after surgery
Days on OCPs	20.3±3.2	18.4±4.6
Days of stimulation	10.5±2.4	10.9±1.9
Amount of gonadotropins in IU	4,950±540	5,025±420
Endometrial lining in mm	10.0±1.2	10.1 ±/1 1.8
Number of follicles	15.2±2.6	12.8±1.8
Number of oocytes	11.6±2.3	9.9±3.3
ICSI	17%	23%
Fertilization rate	65% IVF	68% IVF
	70% ICSI	75% ICSI
Assisted hatching	53%	67%
Number of ET	2.8±1.1	3.3±0.9
Number of eight cell day 3 embryos	2.6±1.1	2.3±0.9
Number of day 3 embryos six cell or higher & Grade I or II	3.8±1.2	3.3±1.6
Blastocyst (day 5) transfers	13%	20%
Number of blastocysts frozen	2.1±1.3	2.8±2.1

No P-value < 0.05

or not surgery alters embryo quality in patients with endometriosis - related infertility.

Cycles with donor oocytes, preimplantation genetic diagnosis, and frozen embryo transfer were excluded. All patients had the same male partner during treatment in this time period. Embryos were examined for cleavage (cell number) and grade, which includes cytoplasmic fragmentation. Embryos were graded as follows on day 3: Grade 1, blastomeres have equal size and no cytoplasmic fragmentation; Grade 2, blastomeres have equal size and minor cytoplasmic fragmentation involving < 10% of the embryo;

Grade 3, blastomeres have unequal size and fragmentation involving 10–20% of the embryo; Grade 4, blastomeres have equal or unequal size, and moderate to significant cytoplasmic fragmentation covering 20–50% of the embryo; and Grade 5, few blastomeres and severe fragmentation covering ≥50% of the embryo (Shahine et al 2009b). The embryo quality was similar before and after surgical treatment of endometriosis.

The average number of eight cell embryos and good quality embryos (defined as six cell or more and grade I or II) was not significantly different (Table III). A similar percentage of patients met criteria for and underwent blastocyst transfer in the cycles before and after surgery. There was no significant difference in good quality (3BB or better) blastocysts transferred on day 5 in the cycles before surgery compared to those after surgery (Shahine et al ,2009c)

The live birth rate per IVF cycle after surgical treatment of endometriosis was 43%.

The average time between surgery and retrieval date for IVF cycle after surgery was 211 days in patients that conceived compared to 263 days in those that did not (P=0.4). Live birth rate was 53% for patients with Stage I–II endometriosis and 31% for those with Stage III–IV endometriosis with the second IVF cycle. As the embryo quality appears similar in both cycles, the mechanism for the higher pregnancy rate after surgery may be related to an improved environment for implantation.(Shahine et al 2009d)

The clinical management of an infertile couple should take into account the age of the female, duration of infertility, male factor, duration of medical attention, pelvic pain, stage of endometriosis, and family history. In the management of infertility associated with endometriosis, clinical decisions are difficult because few Randomized Controlled Trials have been conducted to evaluate and compare the effectiveness of the various forms of treatment. Effective, evidence-based treatments of endometriosis-associated infertility include conservative surgical therapy and assisted reproductive technologies.

Patients with endometriosis who are interested in fertility may gain limited benefits with medical therapy. Although theoretically advantageous, there is no evidence that the combination of medical and surgical treatments can signi-

ficantly enhance fertility, and it may unnecessarily delay further fertility therapy.

Without clear understanding of how endometriosis fully affects fertility, it is difficult to conclude how treatment with IVF or surgery improves pregnancy rates in patients with endometriosis-related infertility.

## References

- Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Al-Inany HG, Aboulghar MM. The outcome of in vitro fertilization in advanced endometriosis with previous surgery: a case-controlled study. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(2):371–5. Disponível em : [http://www.ajog.org/article/S0002-9378\(02\)71343-4](http://www.ajog.org/article/S0002-9378(02)71343-4). Acessado em : 28/09/2010
- Barnhart K et al .Effects of endometriosis on in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* .Vol77 , N° 6 June 2002 . 1148-1155. Disponível em : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0015-0282/PIIS0015028202031126.pdf>. Acessado em 28/09/2010
- Bulletti C , Coccia ME , Battistoni S , Borini A . Endometriosis and Infertility. *J. Assist.Reprod. Genet.*(2010)27:441-447. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/a8626061qp986762/> Acessado em : 28/09/2010
- Diaz I, Navarro J, Blasco L, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Impact of stage III–IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *FertilSteril* 2000;74(1):31– 4. Disponível em : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0015-0282/PIIS0015028200005707.pdf>. Acessado em : 28/09/2010
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *FertilSteril* 2001;75:1–10. Disponível em : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0015-0282/PIIS0015028200016307.pdf>. Acessado em : 28/09/2010
- Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. *Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. Hum Reprod* 1999;14:1332–4. Disponível em : <http://humrep.oxfordjournals.org/content/14/5/13.32.long>. Acessado em : 28/09/2010
- Schenken RS, Asch RH, Williams RF, Hodgen GD. Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions and spontaneous abortions. *Fertil. Steril* 1984;41:122–30.
- Shahine L , Burney R ,Behr B , Milki A , Westphal L , Lathi R. Embryo quality before and after surgical treatments of endometriosis in infertile patients. *J. Assist .Reprod . Genet.* (2009) 26, 69-73. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/815623r813m06h78/> Acessado em : 28/09/2010
- Suginami H, Yano K. An ovum capture inhibitor (OCI) in endometriosis peritoneal fluid: an OCI-related membrane responsible for fimbrial failure of ovum capture. *FertilSteril* 1988;50:648–53. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertility and Sterility* .Vol 81 , n° 5 , May 2004 , 1441-1445. Disponível em : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0015-0282/PIIS001502820400086X.pdf>. Acessado em : 28/09/2010
- Takashiro Suzuki et al. Impact of ovarian endometrioma on oocytes and pregnancy outcomes in in vitro fertilization . *Fertility and Sterility* Vol83 .n° 4 April 2005 .908-913 Disponível em : <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0015-0282/PIIS001502820403198X.pdf>. Acessado em 28/09/2010





CONGRESSO BRASILEIRO DE  
**XV** REPRODUÇÃO  
ASSISTIDA

24 A 27 DE AGOSTO DE 2011 - COSTÃO DO SANTINHO - FLORIANÓPOLIS/SC



**24 a 27**

**Agosto 2011**

[WWW.REPRODUCAOASSISTIDA2011.COM.BR](http://WWW.REPRODUCAOASSISTIDA2011.COM.BR)



*Costão do Santinho*

Florianópolis/SC



MOTIVOS DE SOBRA PARA VOCÊ PARTICIPAR.

PROMOÇÃO

APOIO

AGÊNCIA OFICIAL DE TURISMO

INSCRIÇÕES E INFORMAÇÕES

**SBR**  
SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA

  
FLORIANÓPOLIS e REGIÃO  
Convention & Visitors Bureau

  
AÇORIANA

**Praxis**  
FEIRAS E CONGRESSOS

48 3028.5154 - [www.praxis.srv.br](http://www.praxis.srv.br)



## MARCH

**2011 Annual Meeting on Women's Cancer****Sponsor:** Society of Gynecologic Oncologists**Dates:** March 6-9, 2011**Location:** Hilton Orlando Bonnet Creek & Waldorf Astoria, Orlando, FL, USA**For More Information:** <http://www.sgo.org>**2011 CREOG and APGO Annual Meeting****Dates:** March 9-12, 2011**Location:** JW Marriott San Antonio Hill Country, San Antonio, TX, USA**For More Information:** <http://www.apgo.org>**SGI 2011 Annual Meeting****Sponsor:** Society for Gynecologic Investigation**Dates:** March 16-19, 2011**Location:** Fontainebleau Hotel, Miami Beach, FL, USA**For More Information:** <http://www.sgonline.org>**26th Annual Congress of the European Association of Urology (EAU)****Dates:** March 18-22, 2011**Location:** Vienna, AUSTRIA**For More Information:** <http://www.eauvienna2011.org>**2nd International Congress of the Society of Cross-Border Reproductive Care****Dates:** March 24-27, 2011**Location:** Florence, ITALY**For More Information:** <http://www.icgrt.com>**36th Annual Meeting of the Society for Sex Therapy and Research****Dates:** March 31-April 3, 2011**Location:** Four Seasons Resort, Palm Beach, FL, USA**For More Information:** <http://www.sstarnet.org>

## APRIL

**ASA 36th Annual Meeting****Sponsor:** American Society of Andrology**Dates:** April 2-5, 2011**Location:** Hyatt Regency Montreal, Montreal, CANADA**For More Information:** <http://www.andrology.society.com>**AACE 20th Annual Meeting and Clinical Congress****Sponsor:** American Association of Clinical Endocrinologists**Dates:** April 13-17, 2011**Location:** Manchester Grand Hyatt and San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA**For More Information:** [www.aace.com](http://www.aace.com)**2011 PCRS****Sponsor:** Pacific Coast Reproductive Society**Dates:** April 13-17, 2011**Location:** Rancho Las Palmas, Rancho Mirage, CA, USA**For More Information:** <http://www.pcrsonline.org>**2011 NEFS Annual Meeting****Sponsor:** New England Fertility Society**Dates:** April 29-30, 2011**Location:** Water's Edge, Westbrook, CT, USA**For More Information:** <http://www.nefs.org>**2011 ACOG Annual Clinical Meeting****Dates:** April 30 - May 4, 2011**Location:** Washington, DC, USA**For More Information:** <http://www.acog.org/>

## MAY

**2011 Frontiers in Reproduction (FIR)****Dates:** May 1 - June 11, 2011**Location:** Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA**Application Deadline:** January 18, 2011**For More Information:** <http://fir.mbl.edu>**10º. Congresso Geral da REDLARA****Data:** 19-22 de maio, 2011**Localização:** Rio de Janeiro, Brasil**Informações:** [http://www.redlara.com/congresso\\_rio/programa.asp](http://www.redlara.com/congresso_rio/programa.asp)

## JUNE

**2011 OSSD Fifth Annual Meeting****Description:** Organization for the Study of Sex Differences**Dates:** June 2-4, 2011**Place:** Oklahoma City, OK, USA**For More Information:** <http://www.ossdweb.org>**13th World Congress on Menopause****Sponsor:** International Menopause Society**Dates:** June 8-11, 2011**Location:** Rome, ITALY**For More Information:** <http://www.imsociety.org>**ISSCR 9th Annual Meeting****Sponsor:** International Society for Stem Cell Research**Dates:** June 15-18, 2011**Location:** Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Ontario, CANADA**For More Information:** <http://www.isscr.org>**2011 AMA Annual Assembly Meeting****Dates:** June 18-22, 2011**Location:** Chicago, IL, USA**For More Information:** <http://www.ama-assn.org>

## JULY

**ESHRE 2011****Description:** 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology**Dates:** July 3-6, 2011**Location:** Stockholm, SWEDEN**For More Information:** <http://www.eshre.eu>

## AUGUST

**XV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA****Data:** 24 a 27 de agosto, 2011**Local:** Costão do Santinho - Florianópolis/SC.**Informações:** [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)

## SEPTEMBER

**6th Congress of the Asia Pacific Society for the Study of Aging Male (APSSAM)****Dates:** September 1-4, 2011**Location:** Busan, KOREA**For More Information:** <http://www.aspsam2011.org>**2011 World Endometriosis Congress****Dates:** September 4-11, 2011**Location:** Montpellier, FRANCE**For More Information:** <http://www.wce2011.com>**11th Congress of the Latin American Society for Sexual Medicine (SLAMS)****Dates:** September 8-11, 2011**Location:** Buenos Aires, ARGENTINA**For More Information:** <http://www.slams2011.org>

## OCTOBER

**ASRM 2011****Description:** 67th Annual Meeting of the ASRM**Dates:** October 15-19, 2011**Place:** Orange County Convention Center, Orlando, Florida, USA**For More Information:** view the ASRM Annual Meeting page

## NOVEMBER

**XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia****Dias:** 22/11 a 26/11/2011**Localização:** Florianópolis – SC**Informações:** <http://www.sbu2011.com.br/>**14th World Congress on Human Reproduction****Dates:** November 30-December 3, 2011**Location:** Melbourne, AUSTRALIA**For More Information:** <http://www.humanreproduction2011.com>

# **SBRA**

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

## **Venha para a SBRA!**

### **Para ser sócio da SBRA:**

**1- Link na pagina [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br), novos sócios,  
seguida de emissão de boleto bancário**

**2- depósito direto na conta da sociedade:  
R\$ 190,00:0 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.**

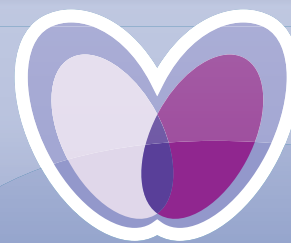
### **Benefícios aos Associados:**

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



# NOVIDADE!

Seu novo ambiente de Atualização,  
Consulta e Debate Científico



Portal da  
Fertilidade



- Artigos Científicos
- Artigos Comentados
- Aulas livres
- Casos Clínicos
- Entrevistas
- Eventos

Apoio



Elaborados por renomados especialistas  
em Reprodução Assistida.

Um portal interativo onde você pode emitir sua opinião,  
enviar materiais científicos e debater com os colegas.

Participe!

[www.portaldafertilidade.com.br](http://www.portaldafertilidade.com.br)



**FALE FERRING**  
0800 772 4656

**Laboratórios Ferring - Brasil**  
Pça. São Marcos, 624 - 1º andar - 05455-050  
São Paulo - Brasil - PABX - 55 11 3024.7500  
70.060.021 - F/003/Dez/10