

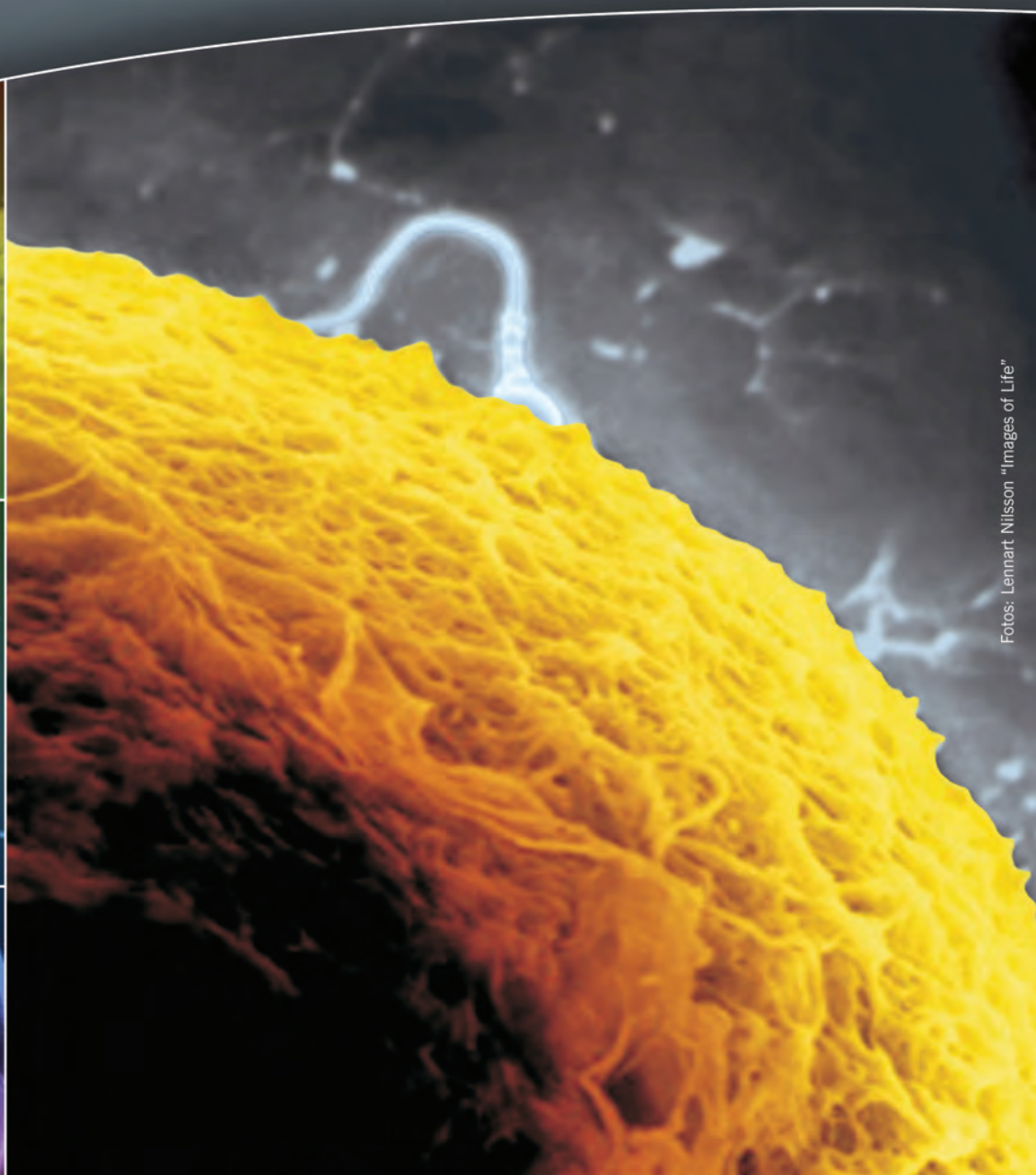
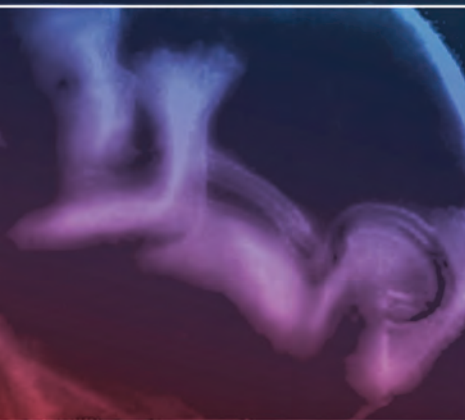
Twenty years of
Art in Latin America

Volume 15
Number 3
May-Jun 2011
ISSN 1517-5693

JBRA

Assisted Reproduction

JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

Merck Serono
Living science, transforming lives

FERRING
PHARMACEUTICALS

HANDLE
COOK

MSD

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Fertilidade.

Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

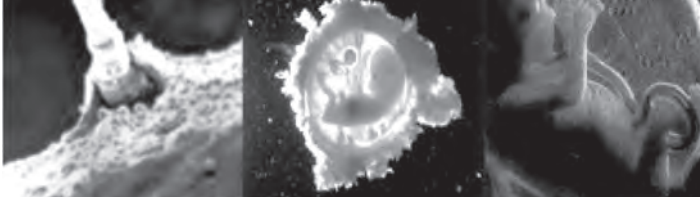
Merck Serono

SAC Merck Serono: 0800.113320

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.

MERCK



JBRA

Assisted Reproduction

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

ISSN: 1517-5693 - V. 15 | nº3 | May-June / 2011

INDEXADO NAS SEGUINTE 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
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
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 (OHSH 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 Equador)

Karen Sermon (VUB Bélgica)

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

Leticia Urdapilleta (Cegyr Argentina)

Lídio Jair Ribas Centa (Androlab/ UFPR Brasil)

Luiz Fernando Dale (C Medicina RJ Brasil)

Madalena Caldas (GERAR PE Brasil)

Marcos Sampaio (Origen MG Brasil)

Mariângela Badalotti (Fertilitat PUC RS Brasil)

Marilena Correa (IMS-UERJ Brasil)

Mario Cavagna (H Perola B/ CRH SP Brasil)

Marisa Decat de Moura (IBRRA/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. Béclère,
University Paris-Sud 11 França)

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

Fertilidade.

Merck Serono

SAC Merck Serono: 0800.113320

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.



DIRETORIA DA SBRA - 2011/2012

PRESIDENTE

 Adelino Amaral Silva

VICE PRESIDENTE

 Edson Borges Júnior

SECRETÁRIO

 Paulo Franco Taitson

TESOUREIRA

 Hitomi Miura Nakagava

DEPARTAMENTO DE PUBLICAÇÕES**EDITORA**

 Maria do Carmo Borges de Souza

EDITOR ADJUNTO

 Paulo Franco Taitson

 e-mail: jornalsbra@cmb.com.br

Diretoria da REDLARA - 2009/2010

DIRETOR EXECUTIVO

 Dr. Ernesto Gallardo Lozano

 México

 E-mail: direjecutiva@redlara.com

www.redlara.com

VICE DIRETORA EXECUTIVA

 Dra. Maria do Carmo Borges de Souza

 Brasil

 E-mail: mariadocarmo@cmb.com.br

DIRETORES REGIONAIS

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

 Dr. Carlos Félix Arce

 México

carfelar@infosel.net.mx

REGIÃO: Bolívia, Chile & Peru

 Dr. Fabrizio Vizcarra Alosilla

 Peru

favizcarraredlara@gmail.com

REGIÃO: Colômbia, Equador & Venezuela

 Dra. María Teresa Urbina

 Venezuela

 E-mail: mturbina@hotmail.com

REGIÃO: Argentina, Paraguai & Uruguai

 Dr. Gabriel Fiszbajn

 Argentina

 E-mail: fiszbajn@cegyr.com

REGIÃO: Brasil

 Dr. Selmo Geber

 Brasil.

 E-mail: selmogeber@origen.com.br

SECRETÁRIA EXECUTIVA

 Marina Diaz

 México

 E-mail: info@redlara.com

Editorial

Bem-vindos, Bienvenidos, Welcome to Rio!

Board of Directors 14

Artigo Original

Evaluación de vacuolas nucleares y apoptosis espermatocítica luego del uso de columnas de anexina V en pacientes con teratozoospermia severa

MS. Cristian Alvarez Sedó, Mariano Lavolpe, Heydy Uriondo, Sergio Papier, Florencia Nodar, Claudio Chillik 10

Estradiol na fase lútea: o intervalo entre a parada e o início do estímulo altera a taxa de maturação folicular (FORT)? - Estudo preliminar.

Maria do Carmo Borges de Souza, Roberto Azevedo Antunes, Ana Cristina Allemand Mancebo, Patrícia Cristina Fernandes Arêas, Marcelo Marinho de Souza, Carlos André Henriques 15

Valor preditivo do Potencial de Implantação Embrionário pela Análise do Perfil Químico de Meios de Cultivo por Espectrometria de Massas (ESI-Q-ToF)

Sylvia S. Cortezzi, Elaine C. Cabral, Marcello G. Trevisan, Christina R. Ferreira, Marcos N. Eberlin, Edson Borges Jr. 18

Locus at chromosome 19 positively influences the number of retrieved oocytes in stimulated cycles

Amanda Souza Setti, Rita de Cássia S. Figueira, Ciro Dresch Martinhago, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Assumpto Iaconelli Jr., Edson Borges Jr. 22

Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) – FISH versus CGH

José Fernando de Macedo, Luiz Mauro Gomes, Joyce Pires, Maristela Rodrigues Oliveira 26

Array-Comparative Genome Hybridization: what expect of a full aneuploidy screening in embryos produced in vitro

Juliana F. Cuzzi, Tania Vulcani de Freitas, Priscila Motta, Mark Hughes, Péricles Assad Hassun Filho 29

Effect of the oxygen conditions on the results of an oocyte donation program: a prospective randomized trial.

Sepúlveda S, Steurer I, Gazzo E, Escudero E & Noriega L. 32

Relevance of laser-assisted hatching in an oocyte donation program using egg-cryobanking: a prospective randomized study

Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Rita de Cássia Savio Figueira, Amanda Souza Setti, Simone Santaguitta Colturato, Assumpto Iaconelli Jr., Edson Borges Jr. 34

Emprego de oócitos de descarte como fonte de blastocistos partenotes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas com grau clínico.

Adriana Bos-Mikich, Rafael Ruggeri, José Luis Rodrigues, Norma P. Oliveira, Melisa Croco, Patrícia H. Prak 38

Choosing to freeze oocytes decrease the chances of pregnancy from fresh oocytes?

Ricardo Azambuja, Lillian Okada, Virginia Lazzari, Luiza Dorfman, Mariangela Badalotti, Alvaro Petracco 41

Reflexión bioética sobre la tecnología reproductiva en parejas homosexuales

Willner R, Rivera S, Arribere R, Coco R 44

Pôsteres

TRA Clínico

P1 - Ovarian reserve in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination is associated to clinical pregnancy rate but not to the number of ovulated follicles

Juan Enrique Schwarze, Jose Balmaceda, Ricardo Pommer 47

P2 -Análisis de los parámetros de buen pronóstico en FIV/ICSI con ovocitos propios y donados

Coco R, Gallo A, Garrido D, Gismondi F, Neuspiller N 47

P3 - Impacto da infecção viral por HIV-1 na qualidade oocitária, embrionária e taxa de gravidez

Lillian Okada, Virginia Lazzari, Ricardo Azambuja, João Michelin, Mariangela Badalotti, Alvaro Petracco 47

P4 - Envelhecendo na fila da inseminação artificial: a realidade dos casais inférteis de baixa renda do Rio de Janeiro

Tatiana Henriques Leite, Whitaker Jean Jaques e Silva, Sirlene Lucena de Moura, Tonia Costa, Marilena Cordeiro Dias Villela Corrêa e Maria do Carmo Borges de Souza 48

P5 - Correlação entre grupos etários x grau de maturação oocitária

Iara Viana, Danielle Araújo, Marjorie Mota, Marcelo Rocha, Marcelo Cavalcante e Oswaldo Dias 48

P6 - Banco de ovocitos vitrificados: resultados de un programa de ovodonación

Portella J, Benavides V, Noriega-P L, Escudero E, Noriega-H L & Sepúlveda S. 48

P7 - Transferencia electiva de un blastocisto

Isaac Benjamin, . Randolpho Medina, María T. Urbina, Jorge Lerner-Biber, Indira Centeno, Luisa Ibarra 49

P8 - Influencia de la respuesta ovárica sobre el resultado de ciclos de fertilización in-vitro al transferir embriones originados con ovocitos propios u ovocitos donados

M.F.Urquiza, M.J. Donaldson, I. Carretero, R.N. Rolando, R.S.Pasqualini , C.J. Quintans 49

P9 - Correlación de los niveles de la hormona anti-mülleriana (HAM) con la respuesta a la estimulación ovárica controlada (H.O.C.) en pacientes bajo tratamiento de reproducción asistida

Mojica Martínez Karlo; Castillo-Baso Jorge; Diaz-Spindola Pablo; Hernández Ayup Samuel; Santos-Halliscak Robert; Galache-Vega Pedro. 50

P10 - Predicting pregnancy in IVF patients using an ultrasonographic score prognostic system

Sepúlveda J, Lara E., Díaz P, Santos R., Hernández S., Patrizio P. 50

P11 - Seminal parameters as prognostic factors for embryonic development in IVF and ICSI patients

Stein AC, Koff WJ, Silva DS, Santos KSD, Genro VK, Cunha Filho JS 50

P12 - Pacientes over 40's: oocytes-reception or intracytoplasmatic sperm injection with their own oocytes? A report of costs

Lopes V.M., Café T.C., Brasileiro J.P.B, Pereira T.R., Zavattiero N.I.T., Santos J.M., Lopes J.R.C. 51

P13 - Transferencia en estado de blastocisto: Resultados

Jimmy Portella Ruiz ,Isabel Steurer Navea, Victor Benavides Soto. 51

P14 - Potencial da técnica do Assisted Hatching em pacientes com mais de 35 anos submetidas a tratamento de reprodução assistida

Tatyane Bandeira Barros, Adriana Fracasso, Darlete Lima Matos, Fúlvia Estefânia Padre e Fechine e Elmar Pequeno, André Luis da Costa 52

P15 - Criopreservación en estadio de blastocisto disminuye la proporción de pacientes con embriones criopreservados

Juan Enrique Schwarze, José Balmaceda, Ricardo Pommer, Francisca Jeria 52

P16 - Análise da influência das diferentes classificações embrionárias sobre a taxa de gravidez

Arildo Nerys da Silva Junior, Maria Cecília de Almeida Cardoso, George Queiroz Vaz, Paulo Gallo de Sá, Maria Cecília Erthal de Campos Martins, Luciene Paschoal Braga Dias 52

P17 - Is there any difference in vitrification and slow freezing protocol for oocyte and embryo cryopreservation?

Virginia Lazzari, Ricardo Azambuja, Lillian Okada, Luiza Dorfman, Mariangela Badalotti, Alvaro Petracco 53

P18 - Post thaw survival rate in an egg-cryobanking

donation program: the oocyte morphology impact	59
Rita de Cássia Savio Figueira, Amanda Souza Setti, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, Matheus de Castro Azevedo, Assumpto Iaconelli, Edson Borges Jr	
P19 - Evaluating results from blastocyst vitrification.	
Ana Márcia de Miranda Cota, Elisa Lopes e Lages, Hérica Cristina Mendonça, Ana Luísa Menezes Silva, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral, João Pedro Junqueira Caetano	54
P20 - Outcomes of assisted hatching in women older than 35 years undergoing in vitro fertilization	
Ana Márcia de Miranda Cota, Alexon Melgaço Racilan, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral, Rívia Mara Lamenta, Ana Luísa Menezes Silva, João Pedro Junqueira Caetano	54
P21 - Efectividad de fertilización in vitro mediante inyección intracitoplasmática para pacientes con azoospermias obstructivas	
Ortega S., Martínez AR.	54
P22 - Viabilidad de embriones de ratón re-vitrificados sucesivamente	
María A. Masciangioli, María Teresa Urbina, Randolpho Medina	54
P23 - Criopreservación en estadio de blastocisto: resultados por congelamiento lento y vitrificación	
Inés Carretero, María Fernanda Urquiza, Mónica J Donaldson, Andréa G Alonso, R Agustín Pasqualini y Carlos Quintans	55
P24 - Pronósticos reproductivos al seleccionar espermatozoides utilizando la técnica "Physiologic ICSI" en pacientes con factor masculino severo	
Castillo Baso Jorge, Santos Haliscak Roberto, Galache Vega Pedro, Diaz Spindola Pablo, Sepúlveda González Jose, García Villafaña Genaro	55
P25 - Utilização de corantes do tipo Diff-Quik para avaliação da integridade da cromatina espermática humana e sua relação com processamento seminal, taxas de fertilização, clivagem embrionária e gravidez	
Franco GRR; Franco ACC	56
P26 - Effect of sperm cryopreservation on fertilization rate and embryo quality depending of fertilization procedure (IVF or ICSI)	
Jose Juan Luna, Nicolás Garrido, Antonio Pellicer, Pedro Cuapio y Marcos Meseguer.	56
P27 - Effects of washed and autoclaved mineral oil overlay used during IVF bovine oocytes on steroid concentration and preimplantational embryo development	
Vireque AA, Watanabe YF, Resende LOT, Bernuci MP, Martins WP, Ferriani RA	56
P28 - Evaluación de un sistema acumulativo de clasificación embrionaria para seleccionar los mejores embriones para transferir	
María Teresa Olivieri, Estrella Rosemberg, Sammy Bronfenmajer	57
P29 - Comparación de resultados de la transferencia de blastocistos desvitrificados en ciclo espontáneo y ciclo artificial	
Alicia Elías Escudero ¹ , Andrea Delgado Elías ¹ , Luis Noriega Portella ¹ , Jimmy Portella Ruiz ²	57
P30 - Criopreservación de ovocitos supernumerarios.	
Isabel Carrasco, Marina Rios, René Salinas, Rodrigo Enriquez, Patricio Donoso, Patricio González	58
Genética e Biología Molecular	
P31 - Polymorphisms A 1298C in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a new marker for ovarian reserve?	
Ciro Dresch Martinhago; Raphaela P Santos; Joji Ueno; Mariana Angelozzi de Oliveira; Luciana Francisco Semião; Ricardo M de Oliveira.	58
P32 - Relación entre la morfología embrionaria y las aneuploidias cromosómicas detectadas por FISH	
Gazzo E, Vizcarra F, Noriega L & Escudero E	58
P33 - Diagnostico genetico preimplantacional, por hibridación genómica comparada (aCGH), en un programa de reproducción asistida: primeros 6 casos	
Gazzo E, Catanzaro G, Noriega L & Sepúlveda S.	
Psicología e aconselhamento	
P34 - Atendimento a casais inférteis: integração entre medicina e psicologia	
Helena Prado Lopes	59
Fertilidade Masculina e Pesquisa básica	
P35 - Anticuerpos antiespermatozoides en mujeres cuya pareja masculina presenta un factor inmunológico	
Molina Rosa, Estofán Gustavo, Kuperman Natalio, Beltramone Fernando, Palena Celina, Estofán Daniel	59
P36 - Comparação da motilidade e morfologia espermática em grupos com diferentes concentrações totais de espermatozoides	
Iara Viana, Danielle Araújo, Marjorie Mota, Marcelo Rocha, Marcelo Cavalcante e Marcelo Gondim Rocha	60
P37 - Estudio de los parámetros seminales y la fragmentación del AND espermático en hombres con sobrepeso y obesidad	
Shalom Valerie, Olivieri María Teresa, Rosemberg Estrella, Bronfenmajer Sammy.	60
P38 - Efectos del sildenafil sobre la motilidad espermática en pacientes con astenozoospermia	
Felipe Arturo Morales Martínez, Martha Merino Ruiz, Eddy Efrén Angulo Velarde, Hilda Magdalena Luna Aranda, Geraldina Guerrero González y Luis H. Sordia Hernández	60
Endometriose e Pesquisa básica	
P39 - Marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular de mulheres inférteis com e sem endometriose: estudo piloto	
Michele Gomes Da Broi, Aline Zyman de Andrade, Jhenifer Kliemchen Rodrigues, Rui Alberto Ferriani, Alceu Afonso Jordão Junior, Paula Andrea Navarro	61
TRA Stem cells	
P40 - O papel das células-tronco mesenquimais de trompa de Falópio na regeneração óssea in vivo em modelo animal	
Jazedje, Tatiana; Bueno, Daniela F; Czeresnia, Carlos E; Perin, Paulo M; Maluf, Mariangela; Zatz, Mayana	61
TRA Pesquisa básica	
P41 - Effects of androgen substrate on bovine cumulus-oocyte complexes steroidogenesis during IVM	
Bulgarelli DL, Vireque AA, Bernuci MP, Pitanguí CP, Sá MFS, Rosa e Silva ACJS	62
Ética e Lei	
P42 - Análisis jurídico de los derechos del embrión en México	
Fernando Manuel Talamantes Ferreira., Alma Belén Aguilar Hernández. Marino Miguel González Cervantes.	62
P43 - Instituição: GyRA. . E. Unidos Mexicanos, en la Endocrinología Predictive factors of metabolic syndrome in adults and adolescents with polycystic ovary syndrome	
Daiana Cristina Chielli Pedroso, Carolina Sales Vieira, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Adriana Lúcia Carolo, Anderson Sanches Melo e Rosana Maria dos Reis	62
Cirurgia Reprodutiva	
P44 - Diseño y uso del Batts (DIU) como profilaxis de las adherencias intrauterina en una clínica de Santa Cruz de la Sierra - Bolivia desde 1995-2010	
Juan Carlos Montalvo Doria Medina y Henry Fulguera Villanueva	63
P45 - Essure® como tratamiento del hidrosalpinx antes de técnicas de reproducción asistida	
Jorge Lerner, José Florencio Jiménez, María Eugenia Zeppenfeldt, Javier Rodríguez Kovacs y Carlos Ramirez	63
Eventos	
	45

Benvindos! Bienvenidos! Welcome to Rio!

The REDLARA welcomes the participants of the 10th General Congress in Rio de Janeiro. The meeting once again strengthens the ties of our 141 centers spread in Latin America and, at the same time, makes our experiences available to anyone who wishes to visit us.

The Board of Directors together with the SBRA have prepared an intensive scientific program, based on current topics that will surely arouse heated debate not only in the auditoriums but also in the halls, corridors and exhibition areas. Pre-Congress Courses, totalling four, favor continuing education, open up opportunities for interaction with gynecologists in general, bring current and controversial aspects of the ethical-legal interface and enable the social debate on assisted reproduction not to mention an unforgettable workshop for embryologists. The Program, again providing the best available knowledge, will be presented by invited Latin American, European and American speakers.

The Examining Board has received 66 submissions. In addition to honoring the 11 oral presentations, included in different round tables, do not forget to visit the 45 posters that will be exhibited. This whole movement of our community shows Latin American research and, of course, seeks new ways to display our scientific expression.

Let's wait for the best works to be defined, which will receive the REDLARA Award of 2011 and the best poster Award, named after Rio de Janeiro.

To the 52 specialists who must give their final exams on the Clinical and Embryologists Programs of Continuing Education (PEC), we wish you good luck!

Special thanks to our sponsors and exhibitors, who are part of our daily work. They have given to RED the support needed to implement all its activities. Furthermore, it is important to register the work of the chairmen and members of the Committees on Accreditation, Education and Ethics as well as the group of the Latin American Register, which constitutes the pillars of our institution.

Finally, it is the duty of RED members to gather the Assembly that will elect the new Director Executive and Vice Director for the 2011-2014 quadrennium. Under the supervision and assistance of our attentive Executive Secretary, Marina Diaz, we will plan strategies for tomorrow.

Um grande abraço !
Saludos !
A warm hug to all of you !

Board of Directors

Evaluación de vacuolas nucleares y apoptosis espermática luego del uso de columnas de anexina V en pacientes con teratozoospermia severa

Nuclear vacuoles and apoptosis markers after annexin V columns in patients with severe teratozoospermia.

Avaliação de vacúolos nucleares e apoptose espermática depois do uso de colunas de anexina V em pacientes com teratozoospermia severa

MS. Cristian Alvarez Sedó^{*1}, MS. Mariano Lavolpe^{*2}, MS. Heydy Uriondo^{*3}, MD. Sergio Papier^{*4}, MS. Florencia Nodar^{*5}, MD. PhD. Claudio Chillik^{*6}

¹Laboratorio de Biología, Investigación y Estudios Especiales (LABINEE)

²Coordinador del Laboratorio de Embriología.

³Miembro del Staff del Laboratorio de Embriología.

⁴Director Médico.

⁵Directora del Laboratorio de Embriología.

⁶Director Científico

* Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR)
Buenos Aires, Argentina.

Lugar de Realización:

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGyR)

Viamonte 1438, C1055ABB, Buenos Aires-Argentina

Teléfono: +54 11-4372-8289

Fax: +54 11-4371-7275

Autor correspondiente:

MSc. Cristian Alvarez Sedó (calvarez@cegyr.com)

RESUMEN

Objetivo: La técnica de Columnas de Anexina V ha sido propuesta como herramienta para disminuir los niveles de apoptosis espermática. El objetivo de este trabajo es evaluar la presencia de vacuolas nucleares y marcadores de apoptosis en las diferentes fracciones luego del uso de columnas y valorar si existe relación entre la tamaño-número de vacuolas con la presencia de apoptosis espermática.

Métodos: Estudio prospectivo de cohorte – doble ciego. Se analizaron 10 muestras de semen que tenían estudio de TUNEL previo (>20%). Se realizó el pasaje de los espermatozoides a través de las Columnas de Anexina V. Se estudiaron 3 poblaciones: luego del gradiente, fracción eluida y la fracción adherida a la columna; se evaluó en cada una de las fracciones el número y tamaño de vacuolas, externalización de fosfatidilserina, caspasa-3 activa y TUNEL.

Resultados: En los 3 marcadores de apoptosis espermática evaluados, se observó una disminución significativa en la población eluida luego del uso de columnas ($p < 0,05$). Sin embargo, tanto el porcentaje de vacuolas, así como el número-tamaño, no mostraron diferencias entre las fracciones estudiadas. En la población adherida a la columna (altos niveles de apoptosis) no se encontró un predominio de espermatozoides con vacuolas, y que estas a su vez, presenten un mayor tamaño.

Conclusión: Los niveles de apoptosis espermática disminuyen significativamente luego del uso de Columnas de Anexina V, pero no así, el porcentaje de espermatozoides vacuolados. Según nuestros resultados, no existe correlación entre el mayor número y tamaño de vacuolas con altos niveles de apoptosis espermática.

Palabras claves: Teratozoospermia severa, vacuolas nucleares, apoptosis, Columnas de Anexina V.

ABSTRACT

Objective: Annexin V columns has been proposed as a tool to reduce levels of sperm apoptosis. The aim of this study was to determine the presence of nuclear vacuoles and apoptotic markers after using Annexin V columns and evaluate the size and number of nuclear vacuoles with sperm apoptosis.

Methods: Double-blind prospective cohort study Ten semen samples, with a previously TUNEL assay (>20%), were analyzed. After two layers gradient, the pellet was eluted through Annexin V column. Three sperm populations were studied: after gradient, eluted fraction and the fraction retained in the column; evaluating the number and size of vacuoles, phosphatidylserine externalization, cleaved caspase-3 and TUNEL.

Results: A significant decrease of apoptotic sperm markers levels was observed after using Annexin V columns (eluted fraction) ($p < 0.05$). However, the number

and size of nuclear vacuoles do not showed a significant difference between fractions. The fraction with high levels of sperm apoptosis (fraction retained in the column) do not showed a prevalence of vacuolated spermatozoa and larger size of vacuoles.

Conclusions: The sperm apoptosis levels significantly decreased after using Annexin V Columns, but not in the same way in relation to the number of vacuolated spermatozoa. There is not a correlation between a major number and size of vacuoles with high levels of sperm apoptosis.

Key words: Severe teratozoospermia, nuclear vacuoles, apoptosis, Annexin V columns.

RESUMO

Objetivo: A técnica de Colunas de Anexina V foi proposta como ferramenta para diminuir os níveis de apoptose espermática. O objetivo deste trabalho é avaliar a presença de vacúolos nucleares e marcadores de apoptose nas diferentes frações depois do uso de colunas e determinar se existe relação entre o tamanho-número de vacúolos e a presença de apoptose espermática.

Materiais/Métodos: Estudo de coorte prospectivo duplo-cego. Foram analisadas 10 amostras de sêmen que tinham teste de TÚNEL prévio (>20%). Foi realizada a passagem dos espermatozoides através das Colunas de Anexina V. Foram estudadas 3 populações: gradiente, eluída e a aderida à coluna, avaliando em cada uma delas número e tamanho de vacúolos, externalização de fosfatidilserina, caspase-3 ativa e TÚNEL.

Resultados/Discussão: Nos 3 marcadores de apoptose espermática avaliados, foi observada uma diminuição significativa na população eluída depois do uso de colunas ($p < 0,05$). Contudo, tanto o percentual de vacúolos, quanto o número-tamanho, não evidenciaram diferenças entre as frações estudadas. Na população aderida à coluna (altos níveis de apoptose) não se encontrou um predomínio de espermatozoides com vacúolos de maior tamanho como é referido na literatura.

Conclusão: Os níveis de apoptose espermática diminuem significativamente depois do uso de Colunas de Anexina V, mas não o percentual de espermatozoides vacuolados. Conforme os nossos resultados, não existe correlação entre o maior número e tamanho de vacúolos e altos níveis de apoptose espermática.

Palavras-chave: Teratozoospermia severa, vacúolos nucleares, apoptose, Colunas de Anexina V.

INTRODUCCIÓN

El análisis de la fragmentación del ADN aportó nuevas expectativas en la búsqueda de explicación a las fallas repetidas de FIV-ICSI. Se ha descrito la importancia de la estabilidad del núcleo espermático relacionado al éxito reproductivo en humanos. Así, el incremento significativo de los niveles de fragmentación del ADN estaría asociado a bajas tasas de fertilización, implantación embrionaria e incremento de abortos (Carrell et al., 2003; Seli et al., 2004; Virro et al., 2004; Lewis & Aitken, 2005; Mesequer et al., 2008; Aitken & De Iulii, 2009; Sakkas & Alvarez, 2010).

Tantos factores físicos como metabólicos pueden inducir el daño del ADN espermático. Este puede ocurrir en la espermatogénesis o durante el tránsito por el epididimo (Aitken et al., 2005; Aitken et al., 2006; Aitken RJ & De Iulii, 2007; Banks et al., 2005). Asimismo, se han identificado factores de riesgo asociados al incremento de la fragmentación del ADN, como: varicocele, criptorquidia, edad avanzada, teratozoospermia severa, episodios de fiebre alta, radio y quimio terapia (Evenson et

al., 2000; Angelopoulou et al., 2007; Delbes et al., 2007; Smith et al., 2007; Smit et al., 2010; Vagnini et al., 2007; Wu et al., 2009; Moskovtsev et al., 2009; Mehdi et al., 2009). El daño en el ADN puede ser de simple y/o de doble cadena, y ha podido ser evaluado por diversos métodos (Evenson et al., 1980; Gorczyca et al., 1993; Fernández et al., 2005; Chohan et al., 2006), destacando entre ellos la técnica de TUNEL ("deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling") (Sakkas & Alvarez, 2010; Sergerie et al., 2005; Greco et al., 2005; Boe-Hansen et al., 2006; Avendaño et al., 2009; Góngora & Fontanilla, 2010). Se ha reportado que la fragmentación del ADN puede estar asociada a eventos de apoptosis espermática (Wu et al., 2009; Sakkas et al., 2002; Sakkas et al., 2003; Oehninger et al., 2003; Singh et al., 2003; Moustafa et al., 2004). Al respecto, se han detectado marcadores de apoptosis en espermatozoides humanos, como: externalización de fosfatidilserina, caspasa 3 activa, etc. (Almeida et al., 2009; Glander & Schaller, 1999; Kotwicka et al., 2008; Paasch et al., 2003; Paasch et al., 2004; Shen et al., 2002). Por otro lado, otros autores han reportado la correlación positiva entre la fragmentación del ADN y la presencia de vacuolas nucleares que ocupan más del 50% de la superficie nuclear (Franco Jr et al., 2008; Nadalini et al., 2009; Oliveira et al., 2010). Sin embargo, otros reportes manifiestan que la presencia de vacuolas podría estar asociada al estado y/o anormalidades del acrosoma y no necesariamente a la fragmentación del ADN (Perdrix et al., 2011; Kacem et al., 2010).

La técnica de Columnas de Anexina V (CA-V) ha emergido como un método capaz de reducir los niveles de apoptosis espermática. Esta técnica se basa en la afinidad entre Anexina V y fosfatidilserina (marcador de apoptosis temprana). Existen publicaciones que demuestran la utilidad de este método en la reducción de la apoptosis espermática e incluso respecto a su uso en reproducción asistida (Said et al., 2005; Said et al., 2006; Dirican et al., 2008; Makker et al., 2008; Rawe et al., 2010; De Vantéry Arrighi et al., 2009; Polak de Fried & Denaday, 2010; Lee et al., 2010).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de vacuolas nucleares y marcadores de apoptosis en las diferentes fracciones obtenidas durante el uso de CA-V y conocer si existe relación entre el tamaño-número de vacuolas con la presencia de apoptosis espermática en pacientes con teratozoospermia severa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Prospectivo de cohorte – doble ciego

2. Población de estudio

Fue considerado un grupo de 10 pacientes varones (Kruger $\leq 4\%$) cuyo nivel de fragmentación del ADN (TUNEL) fue mayor al 20%, teniendo una concentración mayor a $10 \times 10^6/\text{mL}$ y movilidad progresiva mayor al 30% en el diagnóstico previo (no mayor a tres meses) al día del ensayo.

3. Preparación de la muestra

Las muestras fueron evaluadas y sometidas a separación espermática por gradiente de dos capas (ISOLATE-Irvine Scientific) según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992). El pellet obtenido fue lavado con buffer de pegado (BP) ("Binding buffer"-Miltenyi Biotec) (FRACCIÓN INICIAL-FI)

4.- Columnas de Anexina V

Protocolo adaptado a partir del "Death Cell Removal Kit" (Miltenyi Biotec). Brevemente, el "pellet" luego del

gradiente fue resuspendido en las "microbeads" y se incubó por 25 minutos. Se introdujo la columna dentro del imán y se hidrató con 500 uL de BP. Seguidamente se adicionó la suspensión de espermatozoides y simultáneamente 500 µl del BP. El eluido se colectó en HTF modificado (Irvine Scientific) (**FRACCIÓN NEGATIVA-FN**). La **FRACCIÓN POSITIVA-FP** fue colectada retirando la columna del imán y con ayuda del embolo se eluyó bajo presión con BP. De cada fracción se procedió a tomar una alícuota ajustada a un máximo de 2×10^6 /mL para realizar el estudio de MSOME y la evaluación de marcadores de apoptosis.

5.- Evaluación de vacuolas nucleares-MSOME

La evaluación de los espermatozoides se realizó utilizando el microscopio invertido (Nikon (Eclipse TE 200-U) con contraste de fase diferencial (DIC) y un objetivo de 100X de inmersión. Por otro lado se utilizó un sistema secundario de magnificación que posibilitó evaluar los espermatozoides con una magnificación final de hasta 12600X. En las distintas fracciones luego de CA-V se evaluaron 200 espermatozoides, considerando los siguientes patrones: A) Sin vacuola, B) 1 vacuola menor al 25%, C) 2 vacuolas menores al 25%, D) 1 vacuola mayor al 25% y E) Otros-varios (**Fig. 1**).

6.- Evaluación de externalización de fosfatidilserina (EPS) En una alícuota de cada fracción se evaluó la EPS mediante el "Annexin V-FITC Apoptosis Kit" (Abcam). Brevemente, se lavó la muestra con PBS y el "pellet" se resuspendió en 500 uL del BP, se agregó 5 uL de "Annexin V-FITC" y 5 uL de Ioduro de propidio (IP) y se incubó por 5 minutos. La detección fue realizada mediante microscopía de fluorescencia. Se consideró los espermatozoides vivos ($IP^-/Annexin V^+$) más no las células muertas ($IP^+/Annexin V^+$) (**Fig.2**).

7.- Evaluación de la Fragmentación del ADN (TUNEL) y caspasa-3 activa (C3A)

Las muestras se fijaron en PBS-Formaldehído al 2%. Seguidamente fueron lavadas y permeabilizadas con metanol frío. Se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 0,5% en PBS; se agregó el anticuerpo primario anti-C3A (Cell Signaling). Luego se agregó el anticuerpo secundario Alexa-Fluor-568 (Molecular Probes). Posteriormente, se incubó con la solución de TUNEL (Roche) para finalmente lavar y montar con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories). Se contaron 500 espermatozoides de cada fracción. Los patrones observados son representados en la **Fig. 3**.

RESULTADOS

En la **Tabla 1** se muestran los promedios del externalización de fosfatidilserina, caspasa 3 activa y TUNEL de cada fracción luego del uso de CA-V. Los niveles de EPS (marcador inicial de la apoptosis) disminuyeron significativamente de **28.7%** en la **FI** hasta un **2.3%** en la **FN**, presentando un valor de **57.2%** en la **FP** ($p=0.001$). En relación a C3A, los valores disminuyeron de **14.8%** en la **FI** hasta un **4%** en la **FN**, y un valor de **28.4%** en la **FP** ($p=0.002$). De igual manera, los valores de TUNEL en la **FI** disminuyeron significativamente de **32.3%** hasta **9.56%** en la **FN** (siendo este valor considerado como normal) (*Sergerie et al., 2005*). Mientras que la **FP** presentó niveles de **53.7%** ($p=0.001$).

La **Tabla 2** muestra los porcentajes y tipos de vacuolas presentes en las fracciones establecidas. Se observa que el número de espermatozoides sin vacuolas (**A**) no varía significativamente entre las fracciones, encontrándose un **3.6%** en la **FI**, **2.6%** en la **FN** y un **3.6%** en la **FP**. De igual manera los patrones **B**, **C**, **D** y **E** no evidenciaron variación significativa entre las fracciones estudiadas.

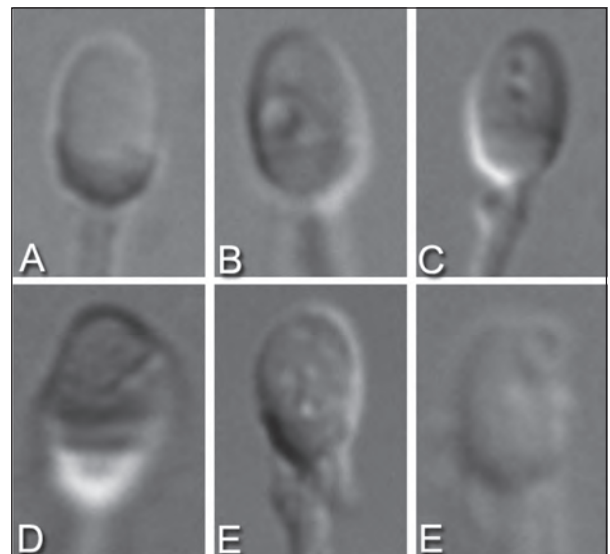


Fig. 1. Patrones evaluados por MSOME

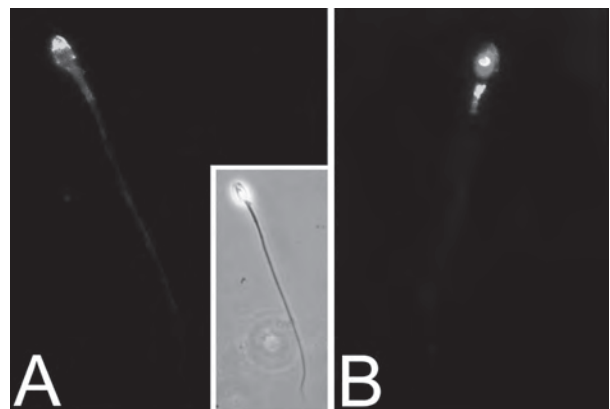


Fig. 2. Patrones observados: A) $IP^-/Annexin V^+$ y B) $IP^+/Annexin V^+$

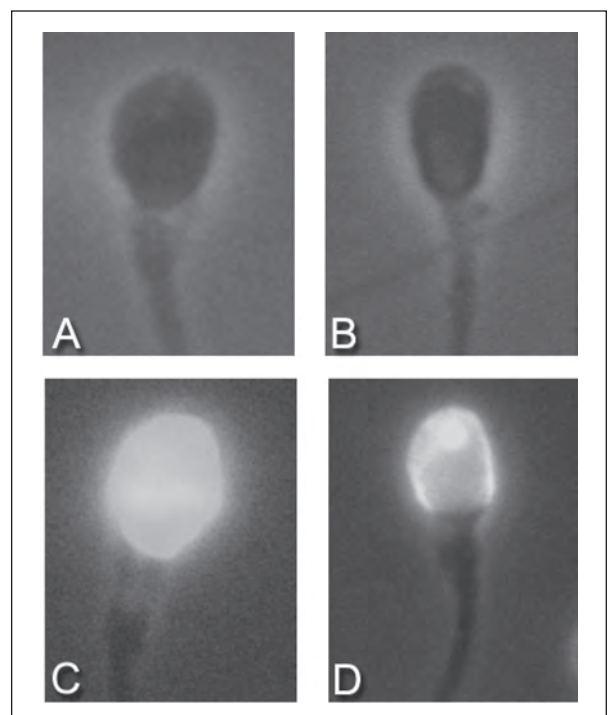


Fig. 3. Patrones observados: A) Normal, B) $C3A^+/TUNEL^-$, C) $C3A^+/TUNEL^+$ y D) $C3A^-/TUNEL^+$

Tabla 2. Niveles de vacuolas nucleares luego del uso de CA-V

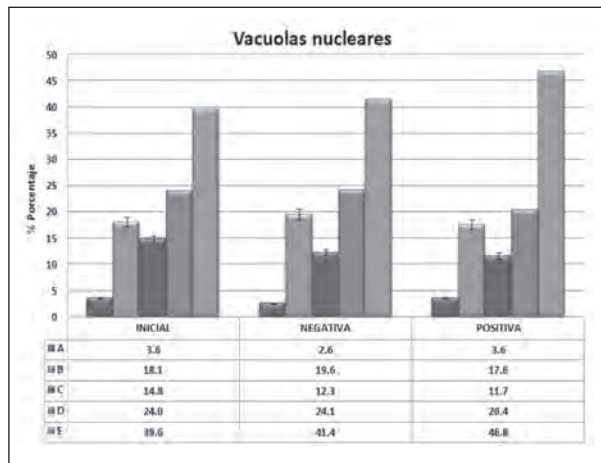
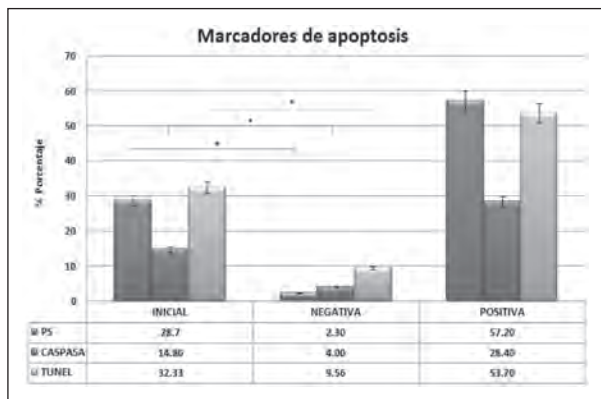


Tabla 1. Niveles de apoptosis espermática luego del uso de CA-V (* p<0.05)



DISCUSIÓN

Nuestros resultados se muestran acordes a lo reportado por otros autores en relación a la disminución de los niveles de apoptosis espermática y fragmentación del ADN luego del uso de Columnas de Anexina V (Said et al., 2005; Said et al., 2006; Dirican et al., 2008; Makker et al., 2008; De Vantéry Arrighi et al., 2009; Rawe et al., 2010; Lee et al., 2010). Sin embargo, nuestro trabajo a diferencia de otros, resalta el haber evaluado muestras con alteraciones severas en la morfología espermática (Kruger <4%). Por otro lado, de acuerdo a la literatura, se ha expresado la correlación existente entre un mayor índice de fragmentación del ADN y la presencia de vacuolas de mayor tamaño (patrón D) (Franco Jr et al., 2008; Nadalini et al., 2009; Garolla et al., 2008; Oliveira et al., 2010). Sin embargo, nuestros resultados manifiestan que en una población enriquecida de espermatozoides con fragmentación del ADN (FP), se observó una presencia **indistinta** de espermatozoides con tamaño-número de vacuolas. Por el contrario, en relación a lo referido anteriormente en la literatura, hubiésemos esperado una mayor cantidad de espermatozoides vacuolados del tipo D. Somos conscientes que son necesarios más trabajos respecto a este tema en particular, sin embargo, creemos que nuestros resultados hasta el momento develan que en pacientes con alteraciones severas en la morfología espermática, no existiría un predominio de mayor tamaño-número de vacuolas en espermatozoides con altos niveles de apoptosis espermática. Por lo que proba-

blemente estos pacientes no se beneficien “del todo” con la elección de espermatozoides seleccionados a mayor magnificación, con fines a elegir un espermatozoide no fragmentado en su ADN.

Finalmente comentar que la técnica de Columnas de Anexina V, se presentan como un método efectivo en la remoción de espermatozoides apoptóticos. Siendo que la **FN** presentó niveles normales de EPS, C3A y TUNEL y esta metodología podría ser empleada para optimizar los resultados de técnicas de reproducción asistida en casos de teratozoospermia severa y apoptosis espermática.

CONCLUSIONES

En pacientes con teratozoospermia severa, los niveles de apoptosis espermática disminuyen significativamente luego uso de CA-V, pero no de la misma manera el porcentaje de espermatozoides vacuolados. No necesariamente existe correlación entre el mayor número-tamaño de vacuolas con altos niveles de apoptosis espermática en este tipo de pacientes. Las CA-V podría considerarse como un método seguro para la reducción de apoptosis espermática en pacientes con teratozoospermia severa.

Referencias

Aitken RJ, Bennetts LE, Sawyer D, Wiklendt AM, King BV. Impact of radio frequency electromagnetic radiation on DNA integrity in the male germline. *Int J Androl.* 2005; 28(3):171-9.

Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(10):4154-63.

Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14(6):727-33.

Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl.* 2009; 32(1):46-56.

Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19(6):770-7.

Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 5:36.

Avenidaño C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2009; 91(4):1077-84.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005; 129(4):505-14.

Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 2006; 21(6):1576-82.

Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003; 49(1):49-55.

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006; 27(1):53-9.

De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod.* 2009; 81(3):517-24.

De Vantéry Arrighi C, Lucas H, Chardonnens D, de Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:1.

Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Camsari C, Kanyılmaz O, Kaya A, Unsal A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25(8):375-81.

- Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapy cocktail used to treat testicular cancer on sperm chromatin integrity. *J Androl.* 2007; 28(2):241-9.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980; 210(4474):1131-3.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl.* 2000; 21(5):739-46.
- Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005; 84(4):833-42.
- Franco JG Jr, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17(1):42-5.
- Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod.* 1999; 5(2):109-15.
- Góngora A, Fontanilla D. The influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2010; 61(2):160-164.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993; 207(1):202-5.
- Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005; 20(1):226-30.
- Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, Wolf J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20(1):132-7.
- Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, Warchol JB. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online.* 2008; 16(5):657-63.
- Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, Lee MS. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 2010; 25(4):839-46.
- Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 2005; 322(1):33-41.
- Makker K, Agarwal A, Sharma RK. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian J Exp Biol.* 2008; 46(7):491-7.
- Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia.* 2009; 41(6):383-6.
- Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril.* 2008; 89(5):1191-9.
- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology.* 2009; 74(4):789-93.
- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004; 19(1):129-38.
- Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19 Suppl 3:45-55.
- Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(4):469-76.
- Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG Jr. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. *Fertil Steril.* 2010; 94(5):1937-40.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl.* 2003; 24(2):246-52.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2004; 81 Suppl 1:802-9.
- Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod.* 2011; 26(1):47-58.
- Polak de Fried E, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril.* 2010; 94(1):351.e15-8.
- Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedó C, Carro M, Papier S, Nodar F. Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2010; 20(3):320-3.
- Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegl C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10(6):740-6.
- Said TM, Agarwal A, Grunewald S, Rasch M, Baumann T, Kriegl C, Li L, Glander HJ, Thomas AJ Jr, Paasch U. Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod.* 2006; 74(3):530-7.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzarro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66(4):1061-7.
- Sakkas D, Seli E, Bizzarro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(4):428-32.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010; 93(4):1027-36.
- Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004; 82(2):378-83.
- Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod.* 2005; 20(12):3446-51.
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.* 2002; 17(5):1266-73.
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003; 80(6):1420-30.
- Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Hum Reprod.* 2010; 25(8):1877-83.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Morales I, Ríos R, Castro A. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev Med Chil.* 2007; 135(3):279-86.
- Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG Jr. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15(5):514-9.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004; 81(5):1289-95.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 1992.
- Wu GJ, Chang FW, Lee SS, Cheng YY, Chen CH, Chen IC. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *Fertil Steril.* 2009; 91(3):831-7.

Estradiol na fase lútea: o intervalo entre a parada e o início do estímulo altera a taxa de maturação folicular (FORT)? - Estudo preliminar.

Luteal estradiol administration: does the interval until periods change follicle output rate (FORT)? A preliminary study.

Maria do Carmo Borges de Souza¹, Roberto Azevedo Antunes¹, Ana Cristina Allemand Mancebo², Patricia Cristina Fernandes Arêas², Marcelo Marinho de Souza¹, Carlos André Henriques¹

¹Médicos

²Embrilogistas

Instituição- G&O Barra RJ- Reprodução Humana
Rio de Janeiro- Brasil

RESUMO

Objetivo: Relacionar a diferença entre o intervalo (dias) até a menstruação numa dosagem fixa de estradiol na fase lútea com a recentemente enunciada taxa de maturação folicular (FORT) em ciclos de ICSI com antagonista de GnRH.

Método: Estudamos retrospectivamente 66 ciclos de ICSI em mulheres com ≤ 39 anos, que receberam 4mg/dia de estradiol a partir do 21º dia da fase lútea anterior, por sete dias, iniciando controle de ultra-sonografia transvaginal no 2º dia do ciclo. O intervalo até o início do estímulo definiu 3 grupos: um dia (n=19); dois a cinco dias (n=32) e ≥ 6 dias (n=15). Com endométrio ≤ 5 mm foi realizada a CFA ($>$ diâmetro entre 3 e 10mm) e iniciado o estímulo. O antagonista foi iniciado quando de foliculo ≥ 14 mm. A aspiração folicular ocorreu 35-36h pós-hCG e a transferência embrionária no dia 3.

Resultados: Houve diferença significativa nos grupos 1 e 3 quanto a duração média do estímulo, total de gonadotrofinas e FSH basal. Os níveis de estradiol basal mostraram diferença significativa entre os três grupos, com níveis mais altos respectivamente nos grupos 1, 2 e 3. Não houve diferença quanto ao total de ampolas de antagonista, oócitos aspirados, oócitos M2 e também ao FORT (desfecho primário). O mesmo quanto ao total de embriões, os embriões de boa qualidade transferidos e taxa de gestação por transferência.

Conclusão: Os dados preliminares não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao FORT entre os grupos. O estudo completo incluirá 268 ciclos, com poder de 90% em demonstrar esta diferença.

Palavras-chave: FSH, estradiol, contagem de foliculos antrais, ICSI, estimulação ovariana controlada

ABSTRACT

Objective: To relate the difference between the interval (days) until menstruation in a fixed dosage of estradiol in the luteal phase with the recently stated rate of follicular maturation (FORT) in ICSI cycles with GnRH antagonist.

Methods: We retrospectively studied 66 ICSI cycles in women aged ≤ 39 years who received 4mg/day estradiol starting on the twenty-first day of the luteal phase for seven days, controlling transvaginal ultrasound on the

second day of the cycle. The interval until the onset of the stimulus defined three groups: one day (n = 19), two to five days (n = 32) and ≥ 6 days (n = 15). Stimulus was initiated when endometrium ≤ 5 mm and CFA (> 3 to 10mm diameter) was held. The antagonist was added when a follicle ≥ 14 mm. The oocyte retrieval occurred 35-36h post-hCG and embryo transfer on day 3.

Results: There were significant differences in groups 1 and 3 related to the average duration of stimulation, total gonadotropin and basal FSH. The basal levels of estradiol showed a significant difference among the three groups, with higher levels respectively in groups 1, 2 and 3. There were no differences in total ampoules of antagonist, oocytes, M2 oocytes and FORT (primary outcome). The same applied to the number of embryos transferred of good quality and pregnancy rate per transfer.

Conclusion: Our preliminary data showed no statistically significant difference compared to FORT between groups. The full study will include 268 cycles, with 90% power to demonstrate this difference.

Key words: FSH, estradiol, antral follicles count, ICSI, controlled ovarian hyperstimulation

INTRODUÇÃO

O desenho dos ciclos de estimulação ovariana controlada (COH) não está encerrado, buscando-se sempre parâmetros ou alternativas mais simples. A intensidade da resposta ovariana pré-ovulatória ao estímulo, por exemplo, é função não apenas da sensibilidade dos foliculos antrais ao FSH, mas também do pré-tratamento do tamanho dos foliculos antrais desde a fase lútea anterior (Fanchin et al., 2005). Estes autores preconizam que foliculos antrais tem tamanhos discrepantes na fase folicular inicial, presumivelmente pela subida precoce do FSH durante a fase lútea tardia, 2 a 3 dias antes da menstruação. Isto explicaria o menor número de foliculos maduros obtidos em COH com agonistas em protocolo curto ou nos protocolos com antagonistas (Albano et al., 1999).

Utilizando 4mg de estradiol (E2) a partir do 20º dia do ciclo anterior, até o 2º dia do ciclo de estímulo, Fanchin et al. (2005) verificaram redução no tamanho dos foliculos antrais e no volume ovariano, em relação a controles, o que sinalizaria que esta sincronização poderia ser útil

para aumentar o número de folículos maduros nos protocolos com antagonistas, por exemplo.

Recentemente, Genro et al. (2011) enunciaram o conceito de taxa de maturação folicular (Follicle output rate-FORT), desfecho inovativo que exprime a resposta de maturação folicular relacionada ao *pool* inicial de folículos sensíveis ao FSH, por definição entre 3 e 8 mm. O FORT é calculado dividindo-se o número de folículos ≥ 16 mm presentes no dia do hCG pelo número de folículos antrais $\times 100$.

O objetivo deste trabalho foi revermos nossos dados (Souza et al., 2007), buscando relacionar a diferença entre o intervalo (dias) até a menstruação numa dosagem fixa de estradiol na fase lútea e a taxa de maturação folicular (FORT) em ciclos de ICSI com utilização de antagonista de GnRH.

MÉTODOS

Inicialmente estudamos 66 ciclos de ICSI que chegaram à captação, em mulheres com idade ≤ 39 anos, no ano de 2007, independentemente da etiologia. O critério de inclusão priorizou apenas o não-uso de medicações hormonais em 3 meses, a contagem e mensuração dos folículos antrais (Souza et al. 2008), os dados hormonais de FSH e E2 no dia do início do estímulo e a contagem e mensuração dos folículos no dia do hCG.

Todas as pacientes receberam 4mg/dia de estradiol (Natifá®) a partir do 21º dia da fase lútea anterior, por sete dias, tendo sido instruídas a fazer o primeiro controle de ultra-sonografia transvaginal no 2º dia da menstruação. Os ciclos foram agrupados de acordo com o intervalo (dias) entre o último comprimido de estradiol e o início do estímulo com FSH. Grupo 1: um dia (n=19); Grupo 2: dois a cinco dias (n=32) e Grupo 3: ≥ 6 dias de intervalo (n=15). Com a medida do endométrio ≤ 5 mm, foi realizada a CFA (maior diâmetro entre 3 e 10mm) pelo mesmo examinador, num aparelho Medison® Sono AceX8. Foi iniciado o estímulo neste mesmo dia, com os seguintes protocolos: pacientes com idade entre 25 e 35anos, 150UI ou 225 UI de rFSH (Gonal F®, Merck Serono); naquelas com idade > 35 anos, 150UI rFSH (Gonal F®, Merck Serono) + 75-150UI de HMG (Menopur®, Ferring). No 5º dia do estímulo era realizado novo controle, para avaliar a presença de ao menos um folículo com ≥ 14 mm e iniciar o antagonista (Cetrotide® 0,25mg, Merck Serono) em doses diárias. Doses de gonadotrofinas foram ajustadas a partir deste dia, de acordo com a dosagem do E2 e/ou crescimento folicular. Novos retornos para controle foram individualizados, indicando-se o hCG (Ovidrel® 250 μ g/0,5ml) em presença de pelo menos um folículo ≥ 18 mm e outros dois ≥ 16 mm, sempre maior diâmetro. Todas as pacientes receberam dose do antagonista no dia do rhCG.

A aspiração folicular ocorreu entre 35-36h pós-hCG, (Rombauts et al., 2000) e os procedimentos laboratoriais seguiram protocolo descrito anteriormente (Souza et al., 2009) com transferência embrionária no dia 3 de cultura utilizando-se catéter de Wallace® (Smiths Medical International). A suplementação da fase lútea foi iniciada no dia da captação com administração de progesterona natural micronizada (600mg/dia) via vaginal três vezes/dia (Smitz et al., 1992).

A avaliação estatística foi realizada usando o teste ANOVA. A diferença entre as variáveis analisadas foi considerada estatisticamente significativa quando $P < 0,05$.

Este estudo é retrospectivo e observacional, tendo sido realizado a partir da revisão de prontuários por pesquisadores institucionais, com a verificação de dados rotineiros autorizada em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido prévio.

RESULTADOS

Os 66 ciclos de ICSI estudados foram divididos de acordo com o intervalo (dias) entre o último comprimido de estradiol e o início do estímulo com FSH. Grupo 1: um dia (n= 19); Grupo 2: dois a cinco dias (n=32) e Grupo 3: ≥ 6 dias de intervalo (n=15). Os três grupos estudados

Tabela 1. Comparação do perfil clínico das pacientes nos 3 grupos estudados

Variáveis	Grupo 1 – um dia	Grupo 2 – 2 a 5 dias	Grupo 3 ≥ 6 dias	P valor
Nº de ciclos	19	32	15	
Idade	34.57 \pm 3.80	34.59 \pm 3.73	33.73 \pm 3.21	NS
IMC	23.63 \pm 4.04	23.75 \pm 3.30	22.60 \pm 2.29	NS
Infertilidade				
Primária (%)	74 (14/19)	75 (24/32)	93 (14/15)	NS
Secundária (%)	26 (5/19)	25 (8/32)	7 (1/15)	NS
Indicação				
ESCA	58%	34%	33%	NS
Fator Tubário	10%	13%	7%	NS
Masculino + outras causas	32%	53%	60%	NS

Tabela 2. Resultados da estimulação ovariana nos 3 grupos estudados

Variáveis	Grupo 1 – um dia	Grupo 2 - 2 a 5 dias	Grupo 3 ≥ 6 dias	P valor
Nº de ciclos	19	32	15	
Duração estímulo	10.89 \pm 1.56*	10.18 \pm 1.57	*9.46 \pm 1.45	*p < 0.05
Total Gonadotrofina (UI)	2602.63 \pm 894.15*	2233.59 \pm 696.26	1865.86 \pm 636.82*	*p < 0.05
Ampolas Cetrotide	4.0 \pm 0.74	3.75 \pm 0.76	4.06 \pm 0.70	NS
Estradiol Basal	113.52 \pm 70.93ab	59.87 \pm 34.11a	45.20 \pm 18.34b	ab p < 0.01
FSH Basal	4.20 \pm 1.67*	5.55 \pm 2.47	6.22 \pm 1.42*	*p < 0.05
Oócitos aspirados	6.42 \pm 4.70	8.68 \pm 4.51	7.93 \pm 7.14	NS
Oócitos M2 injetados	4.78 \pm 4.07	5.71 \pm 3.25	5.53 \pm 4.35	NS
FORT	52.21%	47.09%	43.40%	NS

Tabela 3- Descrição dos embriões e gestações obtidas nos 3 grupos estudados

Variáveis	Grupo 1 – um dia	Grupo 2 – 2 a 5 dias	Grupo 3 ≥ 6 dias	P valor
Nº de ciclos	16	29	13	
EB Total	4.43 \pm 3.75	4.86 \pm 2.60	4.00 \pm 3.02	NS
EB boa qualidade	1.25 \pm 0.68	1.34 \pm 0.85	1.23 \pm 0.72	NS
Gestação/ TE	43.75% (7/16)	41.37% (12/29)	38.46% (5/13)	NS

foram semelhantes quanto à média de idade das pacientes, IMC, incidência de infertilidade primária ou secundária e indicação para a realização da ICSI (tabela 1).

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 3 quanto aos seguintes parâmetros: duração média do estímulo ovariano, total de gonadotrofinas utilizado pelas pacientes e FSH basal no dia do início do estímulo. Em relação aos níveis de estradiol basal houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados, sendo os níveis mais altos respectivamente nos grupos 1, 2 e 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao total de ampolas de Cetrotide® utilizado, número total de oócitos aspirados, número de oócitos M2 injetados e também em relação ao FORT (Tabela 2).

Três ciclos não tiveram transferência de embriões, um devido a risco de hiperestímulo, um por falha na captação e outro por formação de apenas um embrião anômalo,

tanto no grupo 1 quanto no grupo 2. No Grupo 3, dois ciclos não tiveram transferência por risco de hiperestímulo. Desta forma, foram realizados 16 ciclos com transferências no grupo 1, 29 no grupo 2 e 13 no grupo 3. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos quanto ao número total de embriões formados, número de embriões de boa qualidade transferidos e taxa de gestação por transferência (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Recentemente tem-se buscado, de forma incessante, parâmetros que nos ajudem a definir a melhor abordagem de cada indivíduo nos casos de reprodução assistida, buscando melhores formatos e preditores (van Loendersloot et al., 2010, McGovern et al., 2009, Hendriks et al., 2007). O uso do estradiol imediatamente antes da COH está estabelecido como método capaz de homogeneizar e reduzir o tamanho dos folículos antrais iniciais. Os resultados do nosso estudo corroboram os resultados prévios de Fanchin et al., (2003), desde que obtivemos diferenças entre os níveis de FSH e E2, na medida em que era maior o intervalo entre a parada do estradiol e o início do estímulo. Entretanto, como pensamos que este tipo de resposta está associado a variações individuais outras numa população em geral, procuramos avaliar se estes três diferentes intervalos até o início do estímulo controlado teriam alguma influência sobre os resultados esperados. A partir da recente instituição de mais um parâmetro clínico, a taxa de maturação folicular (FORT), buscamos correlacioná-lo ao papel da sensibilidade dos folículos antrais ao estímulo detectados no 2º dia do ciclo.

Apesar de até o momento os grupos representarem um número preliminar com critério de inclusão restringindo apenas a idade da mulher, não houve diferenças significativas entre o IMC das mulheres e as causas da infertilidade com protocolos de estímulo padronizados. Isto os tornou comparáveis para o desfecho primário avaliado, que era a avaliação da influência do intervalo livre de estradiol sobre o FORT.

Genro et al. (2011) estabeleceram em população francesa, caucasiana uma correlação positiva entre níveis séricos de hormônio anti-mulleriano (AMH) e a CFA, com o FORT de $47,5 \pm 1,4\%$, não-influenciado pela idade da mulher, pelo IMC, níveis basais de FSH ou E2. A análise dos nossos resultados mostra que o índice de maturação folicular (FORT) não foi influenciado pelo intervalo entre o fim do suplemento de estradiol e o início da COH.

Resta esclarecer o porquê determinadas pacientes apresentam este intervalo variável entre o fim do estradiol suplementar e a menstruação. O grupo 1 apresentou um comportamento semelhante ao das pacientes que fazem uso do protocolo de Fanchin et al. (2003), com estradiol até o dia em que iniciam o estímulo ovariano e os grupos 2 e 3 têm um intervalo variável de 2 a 5 dias ou ≥ 6 dias. Essa ocorrência poderia ser imputada a componente de anovulação nos casos com maior intervalo? a componentes endócrinos como AMH ou inibina?, a polimorfismos genéticos? Houve uma diferença significativa entre os grupos 1 e 3 quando comparamos a duração do estímulo e o total de gonadotrofinas utilizadas, enquanto o número de ampolas de antagonistas do GnRH foi o mesmo nos três grupos. Quando de maior intervalo (grupo 3), as pacientes apresentaram uma menor duração de estímulo e uma menor quantidade de gonadotrofinas utilizadas. Mas, já ficou estabelecido anteriormente que no momento em que cessa o suplemento do estradiol ocorre um aumento progressivo do FSH. Tal acontecimento pode significar um estímulo extra aos folículos que irão ser estimulados pela COH, traduzindo-se em um menor tempo de COH e menor dose de gonadotrofinas utilizadas. Essa suposição pode ser demonstrada na diferença entre o FSH basal no grupo 3 que encontra-se maior no início do estímulo que o do grupo 1 e no estradiol basal que encontra-se menor no grupo 3 que no grupo 1. O intervalo variável nos grupos utilizando protocolo fixo de suplementação do estradiol não evidenciou diferença de maturação folicular, e o número dos oócitos aspirados e oócitos MII injetados não variaram, assim como o total de embri-

ões formados, inclusive os de boa qualidade e o principal: não houve diferenças significativas nas taxas de gestação.

É interessante ressaltar que nos 8 casos em que não houve transferência de embriões, ocorreu uma distribuição similar nos três grupos de casos com congelamento de embriões por risco de hiperestímulo (1, 1 e 2, respectivamente).

Os dados preliminares deste estudo em andamento não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao FORT entre os grupos. O estudo completo deverá incluir 268 ciclos com poder de 90% em demonstrar esta diferença.

Endereço para correspondência:

Av das Américas 4666 salas 312-313 Barra RJ
Brasil Cep 226490900
e-mail: mariadocarmo@cmb.com.br

Referências Bibliográficas

- Albano C., Smitz J, Tournaye H, Riethmüller-Winzen H Devroy P. Luteal phase and clinical outcome after human menopausal gonadotrophin/gonadotrophin releasing hormone antagonist treatment for ovarian stimulation in in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum. Reprod.* 1999; 14: 1426-1430
- Fanchin R, Cunha-Filho, JS, Schonauer LM, Righini C, de Ziegler D & Frydman, R. Luteal estradiol administration strengthens the relationship between day 3 follicle-stimulating hormone and inhibin B levels and ovarian follicular status. *Fertil Steril.* 2003; 75:85-89.
- Fanchin R, Schonauer LM, Cunha-Filho, JS, Mendéz Losano DH, Frydman . Coordination of antral follicle growth: basis for innovative concepts of controlled ovarian hyperstimulation. *Semin Reprod Med.* 2005; 23:354-62.
- Genro VK, Grynberg M, Scheffer B, Roux I, Frydman R Fanchin, R. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod.* 2011; 3:671-77.
- Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, te Velde ER, Brockmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: a comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril.* 2007; 87: 764-75.
- Mc Govern PG et al. Antral follicle count is a significant predictor of live birth in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009; 91. Suppl: 1595-97.
- Rombauts L, Wood CE. Oocyte retrieval. In: Trouson AO, Gardner DK, eds. *Handbook of in vitro fertilization.* New York: CRC Press, 2000. p. 67-83.
- Souza MCB, Rocha CA, Mancebo ACA, Henriques CA, Santos HCN. Luteal estradiol protocol preceding stimulation in GnRH antagonist ICSI cycles; A comparison to non previously treated cycles. *Fertil Steril.* 2007; 88. Suppl I: S151- 152
- Souza MCB, Souza MM, Oliveira JCA, Henriques CA, Cardoso FFO, Mancebo ACA, Rocha CA. Utilização da contagem de folículos antrais para predição do padrão de resposta em ciclos de hiperestimulação controlada com ciclos de antagonista do GnRH. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007; 30: 36-41
- Souza MCB, Mancebo ACA, Rocha CA, Henriques CA, Souza MM, Cardoso FFO. Evaluation of two incubation environments—ISO class 8 versus ISO class 5—on intracytoplasmic sperm injection cycle outcome. *Fertil Steril.* 2009; 91: 1780-84.
- Smitz J, Devroey P, Faguer B, Bourgain C, Camus M, Van Steirteghem AC. A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy, supplement. *Hum Reprod.* 1992; 7:168-75.
- Van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J, Bossuyt PM, Repping S, Predictive factors in in vitro fertilization (IVF); A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010; 16: 577-89.

Valor preditivo do Potencial de Implantação Embrionário pela Análise do Perfil Químico de Meios de Cultivo por Espectrometria de Massas (ESI-Q-ToF)

Embryo implantation prediction by culture media chemical profiling with ESI-Q-ToF mass spectrometry

Sylvia S. Cortezzi¹, Elaine C. Cabral², Marcello G. Trevisan³, Christina R. Ferreira², Marcos N. Eberlin², Edson Borges Jr.^{1,4,5}

¹Associação Instituto Sapientiae - Centro de Estudos e Pesquisa em Reprodução Assistida, São Paulo, SP, Brasil.

²Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

³Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, Alfenas, MG, Brasil.

⁴Fertility - Centro de Fertilização Assistida, São Paulo, SP, Brasil.

⁵Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Este estudo caso-controle aplicou a estratégia de análise do perfil químico de meios de cultivo de embriões humanos via espectrometria de massas para predição do potencial de implantação embrionário.

Métodos: O meio de cultivo foi coletado e armazenado após a transferência de 22 embriões de 13 pacientes submetidas à ICSI. As amostras foram classificadas de acordo com o resultado de implantação embrionária (100%, n = 8 e 0%, n = 14). Estas foram diluídas e analisadas individualmente, por espectrometria de massas com ionização por eletrospray acoplada a um analisador de massas do tipo Quadrupolo-Tempo de Voo (ESI-Q-ToF). Os espectros de massa obtidos foram normalizados em relação ao íon de maior intensidade. A análise multivariada dos dados foi realizada no programa MatLab versão 7.0, utilizando a ferramenta *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*.

Resultados: Foram observados 3027 íons nos espectros. A partir dos perfis químicos dos meios de cultivo oriundos de embriões com 0% e 100% de implantação obtidos por ESI-Q-ToF-MS modelados por estatística multivariada, foi possível prever os grupos de origem de cada amostra. A diferenciação das amostras de cada grupo foi realizada pelos íons presentes em baixas intensidades relativas em ambos grupos.

Conclusões: Os meios de cultivo de embriões com implantação positiva e negativa possuem diferenças significativas entre os perfis bioquímicos, as quais podem ser detectadas de maneira rápida, simples e não-invasiva pela metodologia proposta. Tais diferenças podem auxiliar na seleção de um único embrião para a transferência, visando diminuir o número de embriões transferidos e conseqüentemente, as gestações múltiplas.

Palavras-chave: embriologia, implantação embrionária, seleção de embriões.

ABSTRACT

Objective: This case-control study analyzed mass spectrometry fingerprinting patterns of culture media samples used for embryo culture to predict embryo implantation.

Methods: The culture medium harvested after embryo transfer of 22 embryos from 13 patients was used for the experiments. After embryo transfer, the remaining culture media were collected and samples were split in positive (n=8) and negative (n=14) implantation groups according to implantation outcomes (100% or 0% of implantation). Samples were individually diluted and injected directly to the Electrospray ionization (ESI) MS coupled to a Quadrupole Time-of-flight MS (Q-ToF-MS). Ions relative intensities of each spectrum were considered. Data analysis was conducted in MatLab 7.0 version using Partial Least Squares - Discriminant Analysis toolbox.

Results: There were 3027 observed ions at 100% and 0% implantation groups by ESI-Q-ToF-MS. The statistical model could categorize the samples in two clusters, based on their positive and negative implantation outcomes. Less intense ions present in the mass spectra with statistical significance have contributed to the major differences to group distinction.

Conclusions: Positive and negative implantation embryos showed a specific biochemical pattern present in culture media, which could be detected as a fast, simple and non-invasive way. This biochemical profile could help the selection of the most viable embryo, improving single embryo transfer and thus eliminating the risk and undesirable outcomes of multiple pregnancies

Key words: embryology, embryo implantation, embryo selection.

INTRODUÇÃO

A transferência de um grande número de embriões nas Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) visando taxas

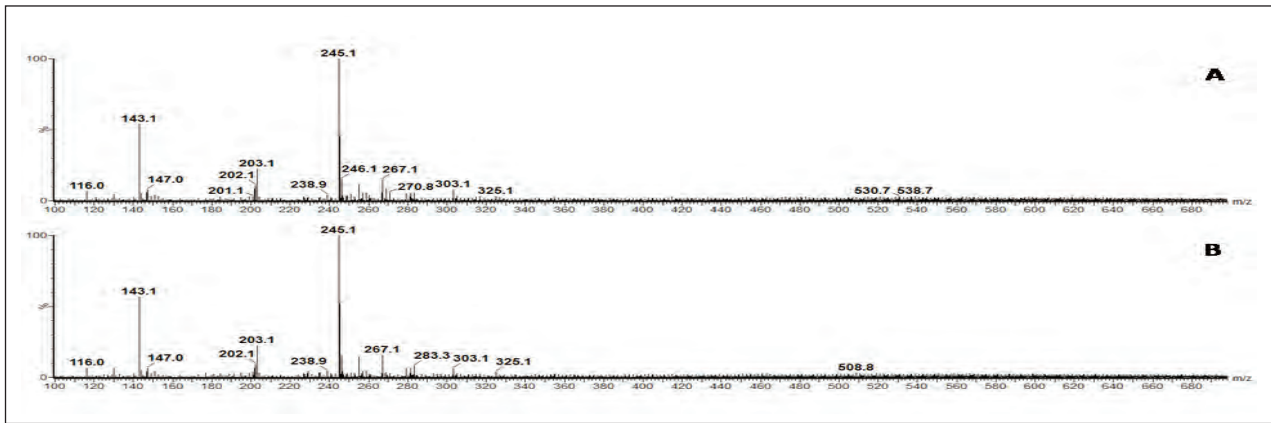


Figura 1. ESI(-)-MS de amostras representativas dos meios de cultivo de um embrião com implantação negativa (A) e com 100% de implantação (B).

de gestação satisfatórias conduz ao risco de gestações múltiplas. Todavia, este resultado apresenta maiores riscos de morbidade e mortalidade materno-fetal. Desta forma, a seleção e transferência de um único embrião com alto potencial de implantação poderiam eliminar as chances de gestações múltiplas. Contudo, o sucesso de gestação com a transferência de um único embrião selecionado por critérios morfológicos é aproximadamente 30% menor quando comparada à transferência de dois embriões (Pandian et al., 2009; Roberts et al., 2011). A seleção embrionária baseada apenas em aspectos morfológicos e na velocidade de clivagem embrionária não são métodos precisos de prever o sucesso de implantação. As limitações das estratégias baseadas em critérios morfológicos têm proporcionado a busca por tecnologias para avaliação não-invasiva da viabilidade embrionária (Katz-Jaffe et al., 2009; Aydiner et al., 2010).

A identificação de biomarcadores não-invasivos, resultantes de estudos de proteômica, secretoma, do turnover de aminoácidos ou do perfil metabólico presente nos meios de cultivo de embriões têm se mostrado uma proposta promissora para a seleção de embriões mais viáveis e com maior sucesso de implantação. A identificação da viabilidade embrionária de uma forma rápida e não invasiva é um dos maiores desafios da Reprodução Humana Assistida (RHA) na atualidade (Bromer, Seli, 2008; Katz-Jaffe et al., 2009; Sturmey et al., 2009; Aydiner et al., 2010; Cortezzi et al., 2010; Seli et al., 2010).

A determinação do perfil químico por espectrometria de massas (também denominado de MS-fingerprinting) representa uma abordagem rápida para obtenção da "assinatura química" de uma amostra. Essa técnica foi aplicada em diversos modelos para estudos de controle de qualidade e adulteração de produtos, entre eles a própolis (Sawaya et al., 2004), perfumes (Marques et al., 2006), vinhos (Catharino et al., 2006), cachaça (de Souza et al., 2007a; de Souza et al., 2007b), óleos vegetais (Saraiva et al., 2009), veneno de cobras (Souza et al., 2008) e recentemente para o controle de qualidade de meios utilizados na produção *in vitro* de embriões bovinos (Ferreira et al., 2009).

O objetivo deste trabalho é aplicar a estratégia de MS-fingerprinting para obter o perfil químico de meios de embriões humanos. Por meio de uma abordagem retrospectiva, a assinatura química ou MS-fingerprinting foi

obtido de meios de cultivo de embriões com implantação negativa ou com 100% de implantação. Os dados de m/z (massa-carga) dos íons presentes nos perfis químicos e os valores de intensidade relativa de cada um foram

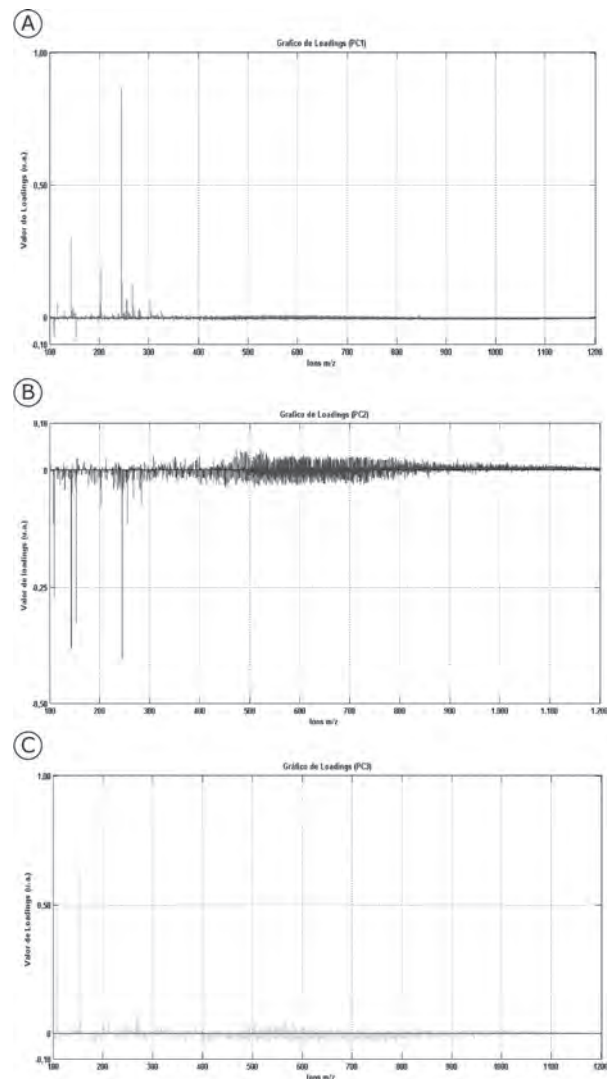


Figura 2. Gráfico da análise de PLS-DA mostrando os valores de loadings (valores de m/z mais significativos para a separação dos grupos) para a Componente Principal (CP) 1 (A), CP 2 (B) e CP 3 (C).

submetidos a análise de *Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (PLS-DA) visando discriminar os dois grupos experimentais (Dill et al., 2010).

Este método é considerado o mais adequado para a classificação de dados complexos, proporcionando a identificação de valores de massa/carga (m/z) responsáveis pela separação dos grupos experimentais, proporcionando a geração de um modelo robusto e eficaz de classificação (Dill et al., 2010).

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

O estudo incluiu amostras de meio de cultivo de 22 embriões oriundos de 13 pacientes submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). As amostras foram classificadas de acordo com o resultado de implantação, sendo 8 amostras com 100% de implantação e 14 amostras com 0% de implantação. Foram obtidos termos de consentimento informado de todas as pacientes, na qual as mesmas concordavam com a divulgação de resultados de seus ciclos para fins de pesquisa.

Estimulação ovariana controlada

A estimulação ovariana controlada foi alcançada por bloqueio pituitário longo usando um agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH α - Lupron Kit™, Abbott S.A Société Française des Laboratoires, Paris, France), seguido de estimulação ovariana com hormônio folículo estimulante (r-FSH – Gonal-F®, Serono, Genève, Switzerland) recombinante. As doses de FSH administradas foram ajustadas conforme a resposta folicular de cada paciente. A dinâmica folicular foi acompanhada por dosagens séricas de E $_2$ e USG. Quando observado um folículo com diâmetro superior a 18mm ou dois folículos com diâmetro superior a 16mm a gonadotrofina coriônica humana recombinante (r-hCG - Ovidrel™, Serono, Genève, Switzerland) foi administrada para maturação folicular final. Trinta e seis horas após a administração do r-hCG, os oócitos foram coletados por folículo-aspiração transvaginal guiada por USG.

Preparação dos oócitos

Após a recuperação, os oócitos foram incubados em meio de cultura (Global® for Fertilization, LifeGlobal, Connecticut, USA) suplementado com 10% de albumina humana sintética (HSA, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) e coberto por óleo mineral (Ovoil™ - Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) por 5 horas a 37°C e 6% de CO $_2$. As células do cúmulus foram removidas por exposição durante 30s ao meio tamponado com HEPES contendo 80 IU/mL de hialuronidase (Irvine Scientific, Santa Ana, USA). Posteriormente, as células restantes do cúmulus foram cuidadosamente removidas por desnudação mecânica usando pipetas Pasteur de vidro afiladas manualmente. Os oócitos desnudados foram então avaliados quanto a sua maturação nuclear. Oócitos que apresentavam a extrusão do primeiro corpúsculo polar foram utilizados para ICSI. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) Para a ICSI, os oócitos foram dispostos individualmente em gotas de 4 μ L de meio tamponado (Global® w/HEPES, LifeGlobal, Connecticut, USA), e os espermatozoides foram colocados em gotas centrais de PVP (PVP, Irvine Scientific, Santa Ana, USA), cobertos com óleo mineral (Ovoil™ - Vitrolife, Kungsbacka, Sweden).

Avaliação da fertilização e transferência embrionária Os embriões foram mantidos em gotas de 50 μ L de meio de cultivo (Global®, LifeGlobal, Connecticut, USA) suplementado por albumina humana sintética (HSA, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) e coberto por óleo mineral

(Ovoil™ - Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) a 37°C e 6% de CO $_2$ até o momento da transferência, no terceiro dia do desenvolvimento.

A avaliação da fertilização foi realizada 18 horas após a ICSI. Em seguida, o meio de cultivo foi renovado e os embriões cultivados por mais 48 horas. Após a transferência embrionária, o meio de cultivo restante foi individualmente coletado e armazenado a -20°C.

Preparo das amostras

Após o diagnóstico de implantação, as amostras de meios de cultivo foram divididas em grupos de implantação positiva (n=8) e negativa (n=14), de acordo com os resultados de implantação (100% ou 0% de implantação). As amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise pelo Espectrômetro de Massas (MS) utilizando Ionização por Eletrospray (ESI -*Electrospray ionization*) acoplada a um analisador de massas do tipo Quadrupolo-Tempo de Vôo (Q-ToF - *Quadrupole Time-of-Flight*) (Waters, Manchester, UK). Para a obtenção do MS-*fingerprinting*, as amostras foram somente diluídas de modo individual em metanol/água 1:1 (v/v) + 0,1% de hidróxido de amônio. As amostras foram injetadas diretamente na fonte de ionização ESI utilizando uma bomba-seringa com fluxo de 10 μ L/min. Os espectros foram adquiridos em modo negativo em uma faixa de m/z de 100 a 1.500 e normalizados em relação ao íon de maior intensidade, mantendo as intensidades relativas dos íons inalteradas.

Análise estatística

A planilha de dados foi organizada, processada e exportada utilizando o módulo XS (Extended Statistics) do software MarkerLynx (Waters, USA), com posterior análise multivariada utilizando o software Matlab 7.0 com *PLS_toolbox* (Eigenvector Co., Seattle, USA).

Resultados e Discussão:

Para a obtenção do perfil químico ou MS-*fingerprinting*, utilizamos MS por infusão direta utilizando somente diluição para o preparo da amostra, em um espectrômetro do tipo ESI-Q-ToF. Essa abordagem tem como vantagens a rapidez, alta sensibilidade e alta resolução para ampla faixa de moléculas. A análise e interpretação do complexo conjunto de dados obtidos pela MS devem ser realizadas por técnicas estatísticas multivariadas para a classificação das amostras em grupos distintos. O método estatístico mais eficiente e empregado em dados MS é o PLS-DA (Dill et al., 2010).

Embora a técnica de MS-*fingerprinting* tenha sido utilizada com sucesso em diversos modelos experimentais e para o controle de qualidade de meios de cultivo de embriões bovinos, em nosso melhor conhecimento, este é o primeiro relato de utilização desta abordagem na avaliação de biomarcadores para avaliação do potencial de implantação em embriões humanos.

Nos espectros de MS-*fingerprinting*, foram observados 3027 diferentes íons. Para a realização da análise de PLS-DA, os espectros de massas foram divididos em conjunto de calibração e de validação. Por meio dessa abordagem, foi gerado um modelo multivariado para classificação utilizando-se quatro variáveis latentes, as quais descreveram mais que 87% dos dados de origem. Este modelo se mostrou eficiente (100%) na classificação das amostras do conjunto de calibração.

Da mesma forma, o modelo estatístico gerado foi hábil em prever com 100% de acerto os grupos de origem de cada amostra, no caso, o perfil químico de embriões com implantação negativa de embriões com implantação 100% positiva. Entretanto, a implantação é um processo

orquestrado que requer a íntima associação entre fatores embrionários e fatores do endométrio materno, com adequada receptividade uterina (Achache, Revel, 2006). Portanto, além da qualidade embrionária, o efeito materno não pode ser descartado no resultado de implantação, apesar das pacientes incluídas no estudo apresentarem preparo endometrial adequado.

Portanto, embora os meios de cultivo de embriões com implantação negativa e com 100% de implantação tenham apresentado perfis químicos semelhantes (Figura 1), por meio de íons presentes em pequena intensidade nos espectros, a análise por PLS-DA proporcionou a diferenciação dos grupos experimentais.

A análise dos *loadings* permitiu observar os valores de *m/z* mais significantes para a separação entre os dois grupos (*m/z* 245, 203, 153, 143, e 109), sendo possível observar íons candidatos a biomarcadores, conforme Figura 2. Foi possível observar que os grupos são separados não apenas pela presença ou ausência de determinados íons, mas também pela sua intensidade relativa no perfil químico (*m/z* 268, 270, 281, 283, 508 e 538).

As tecnologias não invasivas para como valor preditivo do potencial de implantação embrionário, como a ESI-Q-ToF MS entre outras, adicionadas à seleção baseada na morfologia e na taxa de clivagem, podem auxiliar na seleção do embrião mais competente e viável para a transferência, visando diminuir o número de embriões transferidos e conseqüentemente, as gestações múltiplas na RHA (Botros et al., 2008; Bromer, Seli, 2008; Aydiner et al., 2010).

Estão sendo conduzidos novos experimentos para aumentar o número de amostra para melhor avaliação da eficiência de classificação do modelo estatístico proposto.

CONCLUSÕES

A estratégia de MS-*fingerprinting* de análise de meios de cultivo, a qual envolve mínimo preparo de amostra (diluição e injeção direta na técnica de ESI-Q-ToF MS) e avaliação dos perfis de íons por PLS-DA se mostrou promissora para predição da viabilidade embrionária. As diferenças observadas nos íons estão relacionadas às espécies moleculares proveniente do *turnover* de moléculas presentes no meio ou da atividade metabólica embrionária, sugerindo-se que existam diferenças significativas entre os perfis bioquímicos entre embriões viáveis e não-viáveis, os quais podem ser detectados de maneira rápida e simples pela metodologia proposta neste estudo. Esta abordagem pode ser realizada em alta velocidade por meio do uso de sistemas robotizados de nano-ESI (NanoMate, Advion), de forma a permitir sua incorporação na rotina das clínicas de RHA, como uma forma adicional de seleção embrionária além da análise morfológica e da velocidade de clivagem embrionária.

A identificação futura de íons marcadores e de suas funções biológicas permitirá também um maior entendimento do metabolismo embrionário e sua relação com o sucesso nos ciclos de RHA.

Endereço para correspondência:

Edson Borges Jr., M.D. PhD.
Fertility – Centro de Fertilização Assistida
Av Brigadeiro Luis Antônio, 4545 – Jardim Paulista
São Paulo – SP
01401-002
Telefone: (55 11) 3018 8181

Referências Bibliográficas

Achache H. and Revel A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Hum Reprod

Update. 12, 731-746.

Aydiner F., Yetkin C.E., Seli E. 2010. Perspectives on emerging biomarkers for non-invasive assessment of embryo viability in assisted reproduction. Curr Mol Med. 10, 206-215.

Botros L., Sakkas D., Seli E. 2008. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. Mol Hum Reprod. 14, 679-690.

Bromer J.G. and Seli E. 2008. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. Curr Opin Obstet Gynecol. 20, 234-241.

Catharino R.R., Cunha I.B., Fogaca A.O., Facco E.M., Godoy H.T., Daudt C.E., Eberlin M.N., Sawaya A.C. 2006. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom. 41, 185-190.

Cortezzi S.S., Garcia J.S., Souza G.H.M.F., Braga D.P., Eberlin M.N., Borges Jr E. 2010. Human Embryonic Secretome Characterization by gel-free proteomics approach. Fertil Steril. 94, S26.

de Souza P.P., Augusti D.V., Catharino R.R., Siebald H.G., Eberlin M.N., Augusti R. 2007a. Differentiation of rum and Brazilian artisan cachaca via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. J Mass Spectrom. 42, 1294-1299.

de Souza P.P., Siebald H.G., Augusti D.V., Neto W.B., Amorim V.M., Catharino R.R., Eberlin M.N., Augusti R. 2007b. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian artisan cachaca aged in different wood casks. J Agric Food Chem. 55, 2094-2102.

Dill A.L., Eberlin L.S., Zheng C., Costa A.B., Ifa D.R., Cheng L., Masterson T.A., Koch M.O., Vitek O., Cooks R.G. 2010. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 398, 2969-2978.

Ferreira C.R., Souza G.H., Riccio M.F., Catharino R.R., Pontes J.H., Basso A.C., Junior J.C., Perecin F., Eberlin M.N. 2009. Mass spectrometry fingerprinting of media used for in vitro production of bovine embryos. Rapid Commun Mass Spectrom. 23, 1313-1320.

Katz-Jaffe M.G., McReynolds S., Gardner D.K., Schoolcraft W.B. 2009. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. Mol Hum Reprod. 15, 271-277.

Marques L.A., Catharino R.R., Bruns R.E.E., M.N. 2006. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection. Rapid Commun. Mass Spectrom. 20, 3654-3658.

Pandian Z., Bhattacharya S., Ozturk O., Serour G., Templeton A. 2009. Number of embryos for transfer following in-vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. Cochrane Database Syst Rev. 2, CD003416.

Roberts S.A., McGowan L., Mark Hirst W., Vail A., Rutherford A., Lieberman B.A., Brison D.R. 2011. Reducing the incidence of twins from IVF treatments: predictive modelling from a retrospective cohort. Hum Reprod. 26, 569-575.

Saraiva S.A., Cabral E.C., Eberlin M.N., Catharino R.R. 2009. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. J Agric Food Chem. 57, 4030-4034.

Sawaya A.C., Tomazela D.M., Cunha I.B., Bankova V.S., Marcucci M.C., Custodio A.R., Eberlin M.N. 2004. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. Analyst. 129, 739-744.

Seli E., Vergouw C.G., Morita H., Botros L., Roos P., Lambalk C.B., Yamashita N., Kato O., Sakkas D. 2010. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for non-invasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. Fertil Steril. 94, 535-542.

Souza G.H., Catharino R.R., Ifa D.R., Eberlin M.N., Hyslop S. 2008. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. J Mass Spectrom. 43, 594-599.

Sturmey R.G., Hawkhead J.A., Barker E.A., Leese H.J. 2009. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. Hum Reprod. 24, 81-91.

Locus at chromosome 19 positively influences the number of retrieved oocytes in stimulated cycles

Locus no cromossomo 19 influencia positivamente o número de oócitos recuperados em ciclos estimulados

Amanda Souza Setti, B.Sc. Scientific Research^a; Rita de Cássia S. Figueira, M.Sc. IVF Laboratory^b; Ciro Dresch Martinhago, M.D., Ph.D. Director^c; Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, DVM, M.Sc. Scientific Research^{a,b}; Assumpto Iaconelli Jr., M.D. Clinical Department^b; Edson Borges Jr., M.D., PhD. Clinical Department^{a,b,d}

Department affiliations

^aSapientiae Institute – Educational and Research Centre in Assisted Reproduction

Rua Vieira Maciel, 62. São Paulo, SP – Brazil

Zip: 04203-040

Telephone: 55 11 3018-3488

^bFertility – Assisted Fertilization Centre

Av. Brigadeiro Luis, 4545. São Paulo, SP – Brazil

Zip: 01401-002

Telephone: 55 11 3018-8181

^cRDO - Medical Diagnosis

Av. Brasil, 1150. São Paulo, SP – Brazil. Zip: 01430-001

^dDepartment of Gynaecology and Obstetrics - Botucatu Medical

School/UNESP - Distrito de Rubião Junior. Botucatu, SP- Brazil. Zip: 18618-970

RESUMO

Objetivo: Avaliar se os loci associados com a variação da idade normal da menopausa e menopausa precoce podem explicar a má resposta ao estímulo ovariano controlado (EOC).

Métodos: Setenta e uma pacientes, com idade ≤ 35 anos, submetidas à injeção intracitoplasmática de espermatozoides foram testadas para três recém identificadas variantes genéticas associadas com a variação normal na idade da menopausa e a menopausa precoce. As pacientes foram divididas em dois grupos: pobre respondedoras (grupo PR, $n = 21$) e normo-respondedoras (grupo NR, $n = 50$). A influência da frequência do alelo de risco sobre a resposta ao EOC foi avaliada. Modelos de regressão logística foram usados.

Resultados: Não houve diferença significativa na incidência das variantes genéticas entre os grupos NR e PR. O alelo de risco para a variante de cromossomo 19 (*rs4806660*) demonstrou um efeito protetor. A presença de um alelo de risco, seja em homozigose ou heterozigose, foi associado com um aumento da resposta ao EOC, resultando em um maior número de folículos (Coef: 2.54, $P = 0,041$) e oócitos recuperados (Coef: 1,41, $P = 0,041$).

Conclusões: as variantes genéticas *rs244715*, *rs9379896* e *rs4806660* não são fatores de risco para a má resposta ovariana. Em vez disso, a *rs4806660* está associada com maior número de folículos e oócitos recuperados. Pode-se supor que a *rs4806660* está associada a um aumento da resposta ao estímulo com gonadotrofinas.

Palavras-chave: técnicas de reprodução assistida, marcadores biológicos, estímulo ovariano controlado, injeção intracitoplasmática de espermatozoide, polimorfismos de nucleotídeo único.

ABSTRACT

Objective: To evaluate if identified loci associated with normal age of menopause variation and early menopause can account for the poor response to controlled ovarian stimulation.

Methods: A total of 71 patients, with age ≤ 35 years old, undergoing intracytoplasmic sperm injection were tested for three of the four newly identified genetic variants associated with normal variation in menopausal age and early menopause. Patients were divided into two groups: poor responder group (PR group, $n=21$) and normoresponder group (NR group, $n=50$). The influence of risk allele frequency on the response to controlled ovarian stimulation (COS) was evaluated. Logistic regression models were used.

Results: There was no significant difference in the incidence of the genetic variants between NR and PR group. The risk allele for chromosome 19 variant (*rs4806660*) demonstrated a protective effect. The presence of a risk allele, either in homozygosis or in heterozygosis, was associated with an increased response to COS, resulting in an elevated number of follicles (Coef: 2.54, $P= 0.041$) and retrieved oocytes (Coef: 1.41, $P= 0.041$).

Conclusions: Genetic variants *rs244715*, *rs9379896* and *rs4806660* are not risk factors for poor ovarian response. Instead, *rs4806660* is associated with higher number of follicles and retrieved oocytes. It could be hypothesized that *rs4806660* is associated with an increased response to gonadotrophin stimulus.

Key words: assisted reproduction techniques; biological markers; controlled ovarian stimulation; intracytoplasmic sperm injection; single nucleotide polymorphisms.

INTRODUCTION

Women have been postponing childbirth in recent years. This tendency has consequently led to an increase in age-related infertility, subsequently increasing the utilization of assisted reproductive technologies (ART) (Broekmans et al., 2009)B.

Premature reduction of ovarian follicle number has been demonstrated to significantly affect the success of in vitro fertilization (IVF), despite the chronological women age (Templeton et al., 1996), and it is one of the most difficult challenges to those carrying out ART (Setti et al., DOI 10.1007/s10815-010-9516-2).

Despite advances in assisted conception, it has been estimated that among patients undergoing IVF treatment the prevalence of poor ovarian response is 9–24% (Keay et al., 1997). Therefore, poor ovarian response to gonadotrophin stimulation remains a significant problem in modern fertility treatment, especially, in vitro fertilization (IVF) where a large number of oocytes is desirable.

Poor response phenomenon was first described by Garcia et al. (Garcia et al., 1983), who defined this patients as having a peak E2 level of <300pg/mL after standard stimulation with human menopausal gonadotrophin. Poor

Table 1. General characteristics of the cycles and risk allele frequency

Variable	PR group (n=21)	NR group (n=50)	P value
Female age	32.9 ± 2.6	35.5 ± 2.5	0.1191
Dose of FSH administered (IU)	2206.5 ± 700.7	2276.8 ± 669.7	0.9059
Follicles	5.6 ± 2.1	15.5 ± 7.1	0.0002
Retrieved oocytes	3.1 ± 0.8	10.2 ± 3.3	<0.0001
Oocyte recovery rate (%)	60.9	71.8	0.2180
MII oocyte rate (%)	70.2	74.8	0.5950
Risk allele frequency for rs9379896 (%)	90.5	96.0	0.5764
Risk allele frequency for rs244715 (%)	71.4	78.0	0.5537
Risk allele frequency for rs4806660 (%)	42.8	52.8	0.4819

Values are means ± standard deviation, unless otherwise noted. PR, poor responder; NR, normoresponder; IU, international units.

Table 2. Influence of variants on the odds of ovarian response to COS.

SNP	Chromosome	Risk allele frequency	OR (95% CI)	P value
Rs9379896	6	93.2	0.78 (0.34 – 1.81)	0.567
Rs244715	5	74.7	0.68 (0.36 – 1.30)	0.242
Rs4806660	19	47.4	0.81 (0.40 – 1.66)	0.566

SNP, single nucleotide polymorphism; COS, controlled ovarian stimulation; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 3. Influence of risk allele on the response to COS.

Variable	rs9379896			rs244715			rs4806660		
	Coef	R ² (%)	P	Coef	R ² (%)	P	Coef	R ² (%)	P
FSH	137.0	1.5	0.320	-76.8	0.8	0.458	-46.3	0.3	0.676
N° follicles	1.02	0.6	0.517	-0.09	0.0	0.936	2.54	5.9	0.041
N° oocytes	0.324	0.2	0.711	-0.258	0.2	0.692	1.41	5.9	0.041
Recovery (%)	-2.26	0.4	0.616	-1.95	0.5	0.561	-0.21	0.0	0.953
MII oocyte (%)	4.16	1.4	0.329	0.594	0.1	0.852	-2.89	1.0	0.397

COS, controlled ovarian stimulation; Coef, coefficient; P, P value; MII, metaphase II.

Table 4. Incidence of homozygosis and heterozygosis in NR and PR groups

SNP	Homozygous			Heterozygous		
	NR %	PR %	P value	NR %	PR %	P value
rs9379896	70.0	66.7	0.7816	26.0%	23.8	0.8465
rs244715	46.0	28.6	0.1727	32.0	42.8	0.3820
rs4806660	16.0	14.3	1.000	36.0	28.6	0.5949

SNP, single nucleotide polymorphism; NR, normoresponder group; PR, poor responder group

responders have been defined on the basis of mature oocytes (Lashen et al., 1999), elevated early follicular phase of FSH peak (Esposito et al., 2002), number of basal antral follicle (Loverro et al., 2003), number of follicle at the end of ovarian stimulation (Ulug et al., 2003), plasma oestradiol concentration (Surrey and Schoolcraft, 2000) or number of oocytes retrieved (Kumbak et al., 2009).

The current methods for predicting age at menopause are reliant on detecting the peri-menopausal changes in oocyte number and are therefore poor long-range predictors (Lambalk et al., 2009). Hormonal serum levels alter prior to menopause, including follicle-stimulating hormone (FSH), antimüllerian hormone (AMH) and inhibin B. Of these, AMH is the best long-term predictor, with levels decreasing approximately 10 years before menopause (van Rooij et al., 2004; Onland-Moret et al., 2005). In addition to endocrine markers, other markers of ovarian reserve are antral follicle count and ovarian volume (Lambalk et al., 2009).

Genetic predictors of menopausal age have the obvious advantage of being present from birth and thus have the potential to offer women advice about their reproductive lifespan from an early age, enabling them to make informed reproductive choices. Estimations of heritability in menopausal age range from 31 to 87% (Torgerson et al., 1997; Snieder et al., 1998; de Bruin et al., 2001; Murabito et al., 2005; van Asselt et al., 2006).

The most common type of genetic variation is single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are small genetic changes, or variations, that occur every 100 to 300 bases along the 3-billion-base human genome. The genetic code is specified by the four nucleotide "letters" A (adenine), C (cytosine), T (thymine), and G (guanine). The SNP variation occurs when a single nucleotide replaces one of the other three nucleotide letters. On average, SNPs occur in the human population more than 1 percent of the time. Many SNPs have no effect on cell function, but others could predispose people to disease or influence their response to a drug (He et al., 2010; Murray et al., 2010). Recent genome-wide association studies (GWAS) have been successful in identifying genetic loci for many complex traits. Two independent studies identified loci associated with normal age of menopause variation, on chromosomes 5, 6, 19 and 20 (Stolk et al., 2009; He et al., 2010). Moreover, Murray et al. (2010) demonstra-

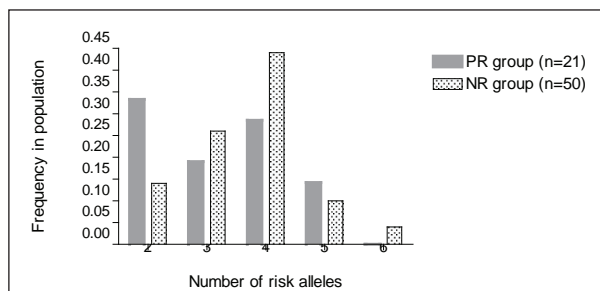


Figure 1. Number of risk alleles for all three SNPs in PR and NR group SNP, single nucleotide polymorphism; PR, poor responder; NR, normoresponder

ted that the four variants increased the odds of having early menopause. However, whether these variants can account for the poor response to controlled ovarian stimulation in IVF patients is still to be elucidated, and therefore was the aim of this study.

METHODS

A total of 71 patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) were included in this study. All patients were 35 years old or younger. We tested three of the four newly identified genetic variants associated with normal variation in menopausal age and early menopause (*rs244715*, *rs9379896* and *rs4806660* in chromosomes 5, 6 and 19, respectively) in our patients.

All the patients had a blood sample collected prior to the beginning of infertility treatment. Blood samples were centrifuged and the white cell buttons were removed, followed by cryopreservation under liquid nitrogen. Upon thawing cell lysis were performed to release DNA.

In the first analysis patients were divided into two groups according to the response to COS: poor responder group (PR group, patients with number of retrieved oocytes ≤ 4 , $n=21$) and normoresponder group (NR group, patients with number of retrieved oocytes from 5 to 15, $n=50$). The incidence of risk alleles were compared between the groups.

In a further analysis, the influence of individual risk allele frequency on the response to COS (total dose of FSH administered, number of follicles, number of retrieved oocytes, oocyte recovery rate and metaphase II (MII) oocyte rate) was evaluated.

The results were expressed as mean \pm standard deviation for numeric variables, while proportions (%) were used for categorical variables. Mean values were compared using a Student's *t* parametric test. Linear regression models were used to determine the effects of the risk allele for each SNP on the variables associated with COS response. Results are expressed as regression coefficients (Coef), R^2 and *P* values.

The influence of risk allele frequency on the odds of being a case was assessed through binary logistic regression and results are expressed as odds ratios (OR), 95% confidence interval (CI) and *P* value. Results were considered to be significant at the 5% critical level ($p < 0.05$). Data analysis was carried out using the Minitab (version 14) Statistical Program.

A written informed consent was obtained, in which patients agreed to share the outcomes of their own cycles for research purposes, and the study was approved by the local Institute review board.

RESULTS

All individuals were successfully genotyped for all three SNPs. The general characteristics of the cycles and risk allele frequency for all SNPs are shown in Table 1.

None of the three variants was a determinant of the odds

of being a case (Table 2).

The influence of risk allele on the response to COS (total dose of FSH administered, number of follicles, number of retrieved oocytes, oocyte recovery rate and metaphase II (MII) oocyte rate) is shown in Table 3.

Out of 71 patients, 4 (5.6%) did not possess risk allele for *rs9379896* (2 in NR group and 2 in PR group); 17 patients (23.9%) did not possess any risk allele for *rs244715* (11 in NR group and 6 in PR group); and 36 patients (50.7%) did not possess any risk allele for *rs4806660* (24 in NR group and 12 in PR group).

The incidence of homozygosis and heterozygosis for all variants in both groups is shown in Table 4.

The distribution of combined risk alleles between the groups is shown in Figure 1. When risk alleles for all three SNPs were combined there was no influence of the number of risk alleles on the odds of being in the case group (OR: 0.69, CI: 0.43 – 1.12, $P = 0.124$).

DISCUSSION

Even though ART relies on a COS for the production of a high number of oocytes, a reasonable percentage of women undergoing IVF do not respond adequately to the stimulus (Keay et al., 1997). The poor response to COS has been associated with premature ovarian failure (Nikolaou et al., 2002). Recently, four loci associated with normal age of menopause variation and early menopause, on chromosomes 5, 6 and 19 and 20, were identified (Stolk et al., 2009; He et al., 2010; Murray et al., 2010). Therefore, we aimed at verifying if three of these four loci were also associated with poor ovarian response in patients undergoing IVF.

Our data suggest that variants associated with normal menopausal age and early menopause are not significant risk factors for poor response to COS in IVF cycles. For all three tested SNPs there was no evidence that the odds of being a PR case, per risk allele, were different from the odds of being a NR case.

Our results demonstrated that the risk allele for chromosome 19 variant (*rs4806660*) demonstrated a protective effect for poor ovarian response. The presence of a risk allele, either in homozygosis or in heterozygosis, was associated with an increased response to COS, resulting in an elevated number of follicles and retrieved oocytes. Although more than 99% of human DNA sequences are the same, variations in DNA sequence can have a major impact on how humans respond to drugs (Shasstry, 2002). Therefore, it could be hypothesized that the genetic variant *rs4806660* is associated with an increased response to gonadotrophin stimulus, in Brazilian patients undergoing ART.

Indeed, the results of the different genetic studies on menopausal age show the difficulties in finding genetic loci for this complex trait. When comparing the different types of studies, there is almost no overlap in the genes that are associated with menopausal age (Voorhuis et al., 2010). One major reason for inconsistency in these findings may be differences in ethnicity. Race-specific variation in the distribution of polymorphism has already been demonstrated (Allocco et al., 2007; Barbosa et al., 2010). Indeed, the difficulty, in our country, of correlating any findings with ethnicity has been previously discussed (Pena, 2005). In Brazil, it gets even more complicated by the fact that our population is miscegenated (Ribeiro Junior et al., 2009).

CONCLUSIONS

Genetic variants *rs244715*, *rs9379896* and *rs4806660* are not risk factors for poor ovarian response in women

undergoing ART. Instead, *rs4806660* is associated with higher number of follicles and retrieved oocytes. It could be hypothesized that the genetic variant *rs4806660* is associated with an increased response to gonadotrophin stimulus, in Brazilian patients undergoing ART.

References

- Allocco DJ, Song Q, Gibbons GH, Ramoni MF Kohane IS. Geography and genography: prediction of continental origin using randomly selected single nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics*. 2007;8:68.
- Barbosa AA, Pedrazzoli M, Koike BD Tufik S. Do Caucasian and Asian clocks tick differently? *Braz J Med Biol Res*. 2010;43:96-9.
- Broekmans FJ, Soules MR Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev*. 2009;30:465-93.
- de Bruin JP, Bovenhuis H, van Noord PA, Pearson PL, van Arendonk JA, te Velde ER, Kuurman WW Dorland M. The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum Reprod*. 2001;16:2014-8.
- Esposito MA, Coutifaris C Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod*. 2002;17:118-23.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA Wright G, Jr. Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: phase II, 1981. *Fertil Steril*. 1983;39:174-9.
- He C, Kraft P, Chasman DI, Buring JE, Chen C, Hankinson SE, Pare G, Chanock S, Ridker PM Hunter DJ. A large-scale candidate gene association study of age at menarche and age at natural menopause. *Hum Genet*. 2010;128:515-27.
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997;104:521-7.
- Kumbak B, Ulug U, Erzik B, Akbas H Bahceci M. Early clinical pregnancy loss rate in poor responder patients does not change compared to age-matched normoresponders. *Fertil Steril*. 2009;91:106-9.
- Lambalk CB, van Disseldorp J, de Koning CH Broekmans FJ. Testing ovarian reserve to predict age at menopause. *Maturitas*. 2009;63:280-91.
- Lashen H, Ledger W, Lopez-Bernal A Barlow D. Poor responders to ovulation induction: is proceeding to in-vitro fertilization worthwhile? *Hum Reprod*. 1999;14:964-9.
- Loverro G, Nappi L, Mei L, Giacomoantonio L, Carriero C Tartagni M. Evaluation of functional ovarian reserve in 60 patients. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:200-4.
- Murabito JM, Yang Q, Fox C, Wilson PW Cupples LA. Heritability of age at natural menopause in the Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3427-30.
- Murray A, Bennett CE, Perry JR, Weedon MN, Jacobs PA, Morris DH, Orr N, Schoemaker MJ, Jones M, Ashworth A Swerdlow AJ. Common genetic variants are significant risk factors for early menopause: results from the Breakthrough Generations Study. *Hum Mol Genet*. 2010;20:186-92.
- Nikolaou D, Lavery S, Turner C, Margara R Trew G. Is there a link between an extremely poor response to ovarian hyperstimulation and early ovarian failure? *Hum Reprod*. 2002;17:1106-11.
- Onland-Moret NC, Peeters PH, van Gils CH, Clavel-Chapelon F, Key T, Tjonneland A, Trichopoulou A, Kaaks R, Manjer J, Panico S, Palli D, Tehard B, Stoikidou M, Bueno-De-Mesquita HB, Boeing H, Overvad K, Lenner P, Quiros JR, Chirlaque MD, Miller AB, Khaw KT Riboli E. Age at menarche in relation to adult height: the EPIC study. *Am J Epidemiol*. 2005;162:623-32.
- Pena SD. [Reasons for banishing the concept of race from Brazilian medicine]. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005;12:321-46.
- Ribeiro Junior CL, Arruda JT, Silva CT Moura KK. Analysis of p53 codon 72 gene polymorphism in Brazilian patients with endometriosis. *Genet Mol Res*. 2009;8:494-9.
- Setti AS, Braga DP, Figueira RD, Azevedo MD, Iaconelli A, Jr. Borges E, Jr. Are poor responders patients at higher risk for producing aneuploid embryos in vitro? *J Assist Reprod Genet*. DOI 10.1007/s10815-010-9516-2;
- Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet*. 2002;47:561-6.
- Snieder H, MacGregor AJ Spector TD. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1875-80.
- Stolk L, Zhai G, van Meurs JB, Verbiest MM, Visser JA, Estrada K, Rivadeneira F, Williams FM, Cherkas L, Deloukas P, Soranzo N, de Keyzer JJ, Pop VJ, Lips P, Lebrun CE, van der Schouw YT, Grobbee DE, Witteman J, Hofman A, Pols HA, Laven JS, Spector TD Uitterlinden AG. Loci at chromosomes 13, 19 and 20 influence age at natural menopause. *Nat Genet*. 2009;41:645-7.
- Surrey ESandSchoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril*. 2000;73:667-76.
- Templeton A, Morris JK Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*. 1996;348:1402-6.
- Torgerson DJ, Thomas RE Reid DM. Mothers and daughters menopausal ages: is there a link? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997;74:63-6.
- Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HF, Akman MA Bahceci M. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:439-43.
- van Asselt KM, Kok HS, van der Schouw YT, Peeters PH, Pearson PL Grobbee DE. Role of genetic analyses in cardiology: part II: heritability estimation for gene searching in multifactorial diseases. *Circulation*. 2006;113:1136-9.
- van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Schefker GJ, de Jong FH, Themmen AP te Velde ER. Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause*. 2004;11:601-6.
- Voorhuis M, Onland-Moret NC, van der Schouw YT, Fauser BC Broekmans FJ. Human studies on genetics of the age at natural menopause: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;16:364-77.

Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD)– FISH *versus* CGH

Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD)- FISH *versus* CGH

José Fernando de Macedo, Luiz Mauro Gomes, Joyce Pires, Maristela Rodrigues Oliveira.

Reproferty, São José dos Campos- SP, Brazil.

RESUMO

Objetivos: Determinar a viabilidade de embriões através do diagnóstico genético pré implantacional por hibridização *in situ* fluorescente ou hibridização genômica comparativa.

Material e Métodos: Foram realizadas biopsias de 57 embriões de pacientes com casos clínicos e idades similares. Desses, 13 apresentaram ausência ou degradação de DNA, 17 foram analisados pela hibridização genômica comparativa, 18 por hibridização *in situ* fluorescente com 11 sondas e 9 com 9 sondas. Foram analisados os percentuais dos resultados de aneuploidias obtidos por cada técnica.

Resultados preliminares: Dentre os embriões diagnosticados com aneuploidia por hibridização *in situ* fluorescente com 9 sondas, 60% poderiam ser diagnosticados usando 5 ou 7 sondas. Os resultados dos métodos com 11 sondas, indicam que 80% dos embriões com aneuploidia poderiam ser diagnosticados com 5 sondas, 86,7% através do uso de 7 sondas e 100% com 9 sondas. Em relação à hibridização genômica comparativa, poderiam ser diagnosticados 53,8% das aneuploidias nos embriões por 5 sondas, 69,2% por 7 sondas e 84,6% usando-se 9 ou 11 sondas.

Conclusões: O uso do diagnóstico por hibridização genômica comparativa oferece resultados mais precisos. Sua indicação para pacientes com falhas recorrentes na implantação e idade materna avançada deve ser considerada, por permitir a seleção dos melhores embriões. Entretanto, os dados demonstram que o diagnóstico por hibridização *in situ* fluorescente pode ser suficiente para identificar a maior parte dos casos de aneuploidias, sem a necessidade de maiores investimentos. Deve-se enfatizar que o tamanho das amostras é bem pequeno, deste modo, o estudo deve continuar para obtermos resultados mais conclusivos.

Palavras-chaves: aborto espontâneo, FISH, CGH, aneuploidia.

ABSTRACT

Objective: To determine embryos viability in preimplantation genetic diagnosis by Fluorescent *In Situ* Hybridization or Comparative Genomic Hybridization.

Materials and Methods: Were biopsied 57 embryos from patients with clinical cases and similar age. Of these, 13 had DNA degraded/ absent, 17 were analyzed by Comparative Genomic Hybridization, 18 by Fluorescent *In Situ* Hybridization with 11 probes and 9 with 9 probes. We analyzed the percentage of aneuploids results that could have been obtained by each technique.

Preliminary Results: Among embryos diagnosed with aneuploidy by Fluorescent *In Situ* Hybridization with 9 probes, 60% could be diagnosed using 5 or 7 probes. The

results of the method with 11 probes indicated that 80% of embryos with aneuploidy could have been diagnosed by 5 probes, 86.7% through the use of 7 probes and 100% with 9 probes. In relation to Comparative Genomic Hybridization, could have been diagnosed 53.8% of aneuploid embryos by 5 probes, 69,2% by 7 probes and 84,6% using 9 or 11 probes.

Conclusions: Diagnosis by Comparative Genomic Hybridization provides more accurate results. Its indication for patients with recurrent implantation failure and maternal advanced age should be considered because allowing the selection of best embryos. However, our data demonstrate that diagnosis by Fluorescent *In Situ* Hybridization may be sufficient to identify the most cases of aneuploidies, without need for further investment. Is important emphasize that the sample size is still small, so the study will continue to obtain more conclusive results.

Key words: spontaneous abortion, FISH, CGH, aneuploidy

INTRODUCTION

The Pre-implantation Genetic Diagnosis (PGD) is indicated for patients undergoing treatment for Assisted Reproduction (AR) and that fall into at least one of the following cases (Wilton, 2005): (I) recurrent failure of implantation, ie failure in more than three cycles of RA in which good embryos were transferred, (II) women over 35 years, due to the high incidence of chromosomal abnormalities derived from meiotic alterations, such as non-disjunction, which occur with advancing maternal age (Margalioth et al., 2006; Andersen et al., 2000; Romero- Maldonado et al., 2002), (III) patients with recurrent spontaneous abortions.

The chromosomal anomalies have an important contribution in spontaneous abortions and recurrent implantation failure in cases *in vivo* and *in vitro*. Its incidence reaches including embryos with good morphological quality and high rates of development (Voullaire et al., 2002; Margalioth et al., 2006). It is estimated that 70% of the normal embryo are in fact aneuploid and about 37% of trisomic embryos reach the blastocyst stage (Sandalinas et al., 2001).

The chromosomal numeric abnormalities are the most common in samples from spontaneous abortions: 50 to 60% of trisomy, 20 to 25% poliploidy and 15 to 25% monosomy of the chromosome X. The genetic factor is related to the occurrence of abortion and its subsequent repetition. Fetal chromosomal abnormalities are the cause of 50-60% of spontaneous abortions occurring during the first trimester of pregnancy (Munné et al., 2002).

The most plausible explanation for the high incidence of chromosomal abnormalities in cases of spontaneous abortions is that the most chromosomal damages results in a disorganized development of the conceptus, which

Table 1. Main panels used by FISH

Number of Probes	Chromosomes evaluated
5	13, 18, 21, X e Y
7	13, 16, 18, 21, 22, X e Y
9	13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X e Y
11	13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, X e Y

is incompatible with uterine survival and birth. According to literature, the degree of selection among different chromosomal defects is highly variable. For example, in trisomy of 21, responsible for Down Syndrome, about a third of the fetuses surviving to term gestation, whereas in cases of triploidy, ie in which all pairs have an extra chromosome, less than 1 % reach the third trimester of development (Rodini et al., 2004).

To complement the selection of embryos based on morphology and thereby improve the success rates of pregnancy, one of the techniques available for PGD it is the Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) performed on biopsied cells from embryos during cleavage stage (Gutierrez-Mateo et al., 2004). This method uses specific probes for chromosomes related to aneuploidy commonly found in newborns and fetuses spontaneously aborted. The number of chromosomes evaluated, as well as the cost of examination per embryo, varies with the amount of probe used. The numbers of probes most used are 5, 7, 9 and 11. The chromosomes evaluated according to each panel of probes are shown in Table1.

Although imply increases in success rates of RA, the use of FISH is limited by the small number of chromosomes analyzed simultaneously and reduced accuracy when many probes are combined (Abdelhadi et al., 2003). Some studies indicate that 25-30% of chromosomal abnormalities remain undiagnosed using FISH, which entails transferring aneuploid embryos incorrectly diagnosed as normal (Sandalinas et al., 2001).

By allowing complete chromosome analysis and then detect the aneuploidies that are unable to be diagnosed by a set of FISH probes, the Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a promising alternative (Wilton et al., 2005; Gutierrez- Mateo et al., 2004). This is a molecular cytogenetic technique that can be applied to individual cells in interphase and allows the simultaneous analysis of each chromosome (Voullaire et al., 1999; Wells et al., 1999). However, it presents high costs and its benefits need to be properly assessed before his indication for the patient.

The objective of this study was to determine whether the more complex techniques, and consequently more expensive, are necessarily the most suitable for PGD in patients under AR treatment. We compared the results of aneuploidy in embryos subjected to the methodologies by CGH and FISH with 5, 7, 9 and 11 probes.

MATERIALS AND METHODS

This is an ongoing prospective study. Biopsies were performed on third day of developing embryos of 57 patients with similar clinical cases and mean age of 35 years. The blastomeres of each embryo were sent to a laboratory expert in PGD. Of these, 13 had DNA degraded or absent, 17 were analyzed by CGH, 18 by FISH with 11 probes and 9 by FISH with 9 probes.

For each method, we analyzed results of aneuploidy which could have been obtained using a smaller number of probes. For example, an embryo diagnosed by CGH with trisomy on chromosome 17 could have been properly diagnosed as aneuploid with the use of FISH with a panel

of nine probes, since it has the probe to detect this chromosome. However, using 5 or 7 probes, this aneuploidy wouldn't be detected. On the other hand, a monosomy of chromosome 2, for example, only can be detected by CGH (see Table 1). The data obtained allowed to establish a comparison between the methodologies' viability based on the percentage of diagnoses that can be obtained by less expensive techniques.

PRELIMINARY RESULTS

Among the embryos analyzed by CGH, two were considered euploid, ie, the karyotype with exactly 23 chromosomes pairs. The analysis by FISH with 9 and 11 probes found 4 and 3 embryos without alteration, respectively. Of the 44 embryos analyzed, 35 (78.5%) were diagnosed with aneuploidy. Among the aneuploid embryos analyzed by FISH with 9 probes, 60% could be diagnosed using 5 or 7 probes. The results of the method with 11 probes indicate that 80% of embryos with aneuploidy could have been diagnosed with only 5 probes, 86.7% by 7 probes and 100% through the use of 9 probes. In relation to CGH, could have been diagnosed 53.8% of aneuploid embryos using 5 probes, 62.9% through the use of 7 probes and 84.6% using 9 or 11 probes.

Moreover, 4 embryos (11.4%) would only be correctly diagnosed as aneuploid by CGH, because the abnormalities found are related to chromosomes that aren't analyzed by the probes commonly used in FISH, and these were trisomies of chromosomes 10 and 5, monosomy of chromosomes 2 and 4 and deletion of the short arm of chromosome 1.

CONCLUSIONS

It is known that CGH allows to obtain more accurate results and its indication for patients with recurrent implantation failure and advanced maternal age should be considered because allowing the selection of best embryos and thus increase the chances of successful treatment (Romero-Maldonado et al., 2002). However, our data show that the FISH with few probes may be sufficient to identify more than half cases of aneuploid embryos, avoiding the investment in more expensive techniques. This is explained by the fact that the chromosomes selected for investigation by FISH are precisely those with a higher frequency of chromosomal anomalies and, thus, are directly involved with the major genetic diseases and causes of spontaneous abortions (Andersen et al., 2000; Rodini et al., 2004).

It is important to emphasize that in cases in which FISH did not detect changes, the diagnosis of aneuploidy may not necessarily be excluded, since abnormalities may occur in chromosomes non-assessed by the probes used. In these cases, the CGH is the only methodology available of detecting all aneuploidies and its indication is mainly recommended for patients with advanced maternal age.

The use of the techniques of PGD is a useful tool to identify embryos with high implantation potential (Fragouli et al., 2010) and should be approached with the couple for a decision on do or not to do embryo biopsy after being informed about the risks of technique.

It should be noted that the sample size is still small, so the study will continue to obtain more conclusive results.

Correspondence to:

José Fernando de Macedo.
Rua Santo Agostinho, 179 - Vila Adyanna
São José dos Campos-SP
Tel: +55-12-3941-5199
e-mail: fernandomacedo@reproferty.com.br

References

- Abdelhadi I, Colls P, Sandalinas M, Escudero T and Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for 13 chromosomes. **Reprod Biomed Online** 6,226–231, 2003.
- Andersen AN, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. **BMJ**, 320:1708-12, 2000.
- Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall N, Mania A, Griffiths T *et al.* Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation (abst). **Hum Reprod**, 2010.
- Gutiérrez-Mateo C, Wells D, Benet J, Sánchez-García JF, Bermúdez MG, Belil I, Egozcue J, Munné S, Navarro J. Reliability of comparative genomic hybridization to detect chromosome abnormalities in first polar bodies and metaphase II oocytes. **Hum Reprod Update** 19, 2118-2125, 2004.
- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. **Hum Reprod**, 21 (12), 3036-3043, 2006.
- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. **Hum Reprod**, 21(12), 3036-3043, 2006.
- Munné S, Cohen J, Sable D. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. **Fertil Steril**. 2002;78(2):234-6.
- Rodini ESO, Tsuribe PM, Moreira LMV, Souza MO, Capannacci J, Agostinho MAB. Spontaneous abortions: cytogenetic studies and risks of occurrence. **Arq Ciên Saúde**, 11(1):37-9, 2004.
- Romero-Maldonado S, Quezada-Salazar CA, Lopez Barrera MD, Arroyo Cabrales, LM. Effect of risk on the child off an older mother. **Ginecol Obstet Mex**, 70:295-302, 2002.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J and Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. **Hum Reprod** 19,1954–1958, 2001.
- Voullaire L, Wilton L., Slater H, Williamson R. The detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridisation. **Prenat. Diagn.**, 19, 846–851, 1999.
- Voullaire L, Wilton L, McBain J, Callaghan T, Williamson R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. **Mol Hum Reprod**, 8 (31), 1035-1041, 2002.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. **Nucleic Acids Res.**, 27, 1214–1218, 1999.
- Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. **Hum Reprod Update** 11, 33-41, 2005.

Array-Comparative Genome Hybridization: what expect of a full aneuploidy screening in embryos produced *in vitro*

Hibridação Genômica Comparativa por *arrays*: o que esperar da análise completa de aneuploidias em embriões produzidos *in vitro*

Juliana F. Cuzzi, PhD^{1**}, Tania Vulcani de Freitas, PhD¹, Priscila Motta, BSc¹, Mark Hughes, MD, PhD² & Péricles Assad Hassun Filho, PhD¹

¹Genesis Genetics Brasil, São Paulo, SP, Brazil

²Genesis Genetics Institute, Detroit, MI, USA

This study was done in Genesis Genetics Brasil, supervised by Péricles Assad Hassun Filho.

ABSTRACT

Objective- Aneuploidy is the principal genetic factor affecting reproductive success in humans. A great number of morphologically normal embryos either do not implant or spontaneously abort early in pregnancy because their chromosome number deviates from the normal diploid 46.

Material and methods- The present study used comparative genomic hybridization by microarrays (aCGH), a molecular cytogenetic method that allows simultaneous enumeration of all chromosomes to establish a review of a full aneuploidies screening in FIV embryos.

Results- The present study illustrates that aneuploidy can affect any chromosome with a slightly higher prevalence of monosomies, suggesting that good quality embryos revealed that even the most severe chromosomal abnormalities (e.g. monosomy, imbalance affecting the largest chromosomes and aneuploidy affecting multiple chromosomes) were often capable of surviving up to the blastocyst stage.

Key-words: CGH, arrays, aneuploidy, embryos, implantation rate, PGD

RESUMO

Objetivo: Aneuploidia é o principal fator genético que afeta o sucesso reprodutivo em humanos. Um grande número de embriões humanos morfológicamente normais ou não implantam ou são abortados espontaneamente no início da gravidez porque o seu número de cromossomos difere da norma diplóide de 46.

Material e métodos: O presente estudo usou a hibridização genômica comparativa por *microarrays* (aCGH), um método de citogenética molecular que permite a contagem simultânea de todos os cromossomos para estabelecer a revisão de um rastreio completo de aneuploidias em embriões de FIV. Resultados- O presente estudo mostra que aneuploidia pode afetar qualquer cromossomo, com uma prevalência ligeiramente maior de monossomias. Mesmo com as anormalidades cromossômicas mais graves (por exemplo, monossomia e aneuploidia), embriões foram muitas vezes capazes de sobreviver até o estágio de blastocisto.

Palavras-chave: CGH, matrizes, aneuploidia, embriões, taxa de implantação, PGD

INTRODUCTION

Aneuploidy is one of the main causes behind low pregnancy rates in humans (Obradors et al., 2010). Chromosome abnormalities are found in early cleavage stage embryos and first trimester, spontaneously aborted fetuses (Boue et al., 1985; Munne et al., 1995). More than 70% of all In Vitro Fertilization (IVF) embryos fail to implant, and only 35% - 40% of all cycles succeed after an IVF procedure. It is believed that the single major cause of IVF failure is the quality of harvested eggs, and up to 75% of such eggs are aneuploid (Fishel et al., 2010).

Chromosomal abnormalities arising after fertilization, at the cleavage stage, have also been the subject of cytogenetic study. The technique routinely used for aneuploidy screening in IVF embryos is fluorescence in situ hybridization (FISH), which is a fast and easy method to perform. While this approach has provided a useful insight into aneuploidy during early human development, most chromosomes remain untested and the cytogenetic assessment is therefore incomplete, once the most common FISH diagnosis analysis from 5 to 12 chromosomes in one cell.

While many studies have investigated chromosomes in cleavage stage embryos, the cytogenetics of human blastocysts (5 or 6 days post-fertilization) has received comparatively little attention.

Recently, there have been efforts to provide a more detailed characterization of blastocyst cytogenetics, using methods such as Comparative Genome Hybridization (CGH), a molecular cytogenetic method that allows simultaneous enumeration of all chromosomes (Fraagouli et al., 2008). From the clinical perspective, there has been increasing interest in screening blastocyst-stage embryos for chromosomal abnormalities, with a view to detecting and preferentially transferring euploid normal embryos during IVF cycles. Early clinical data suggest that an approach combining blastocyst biopsy and comprehensive chromosome screening using CGH or microarray-CGH (aCGH) may represent the optimal approach for preimplantation genetic screening (PGS) (Fragouli et al., 2011).

The aim of the present study is to report an overview of the chromosomal condition of 172 embryos of patients undergoing routine assisted reproduction treatment (ART), using the aCGH technique.

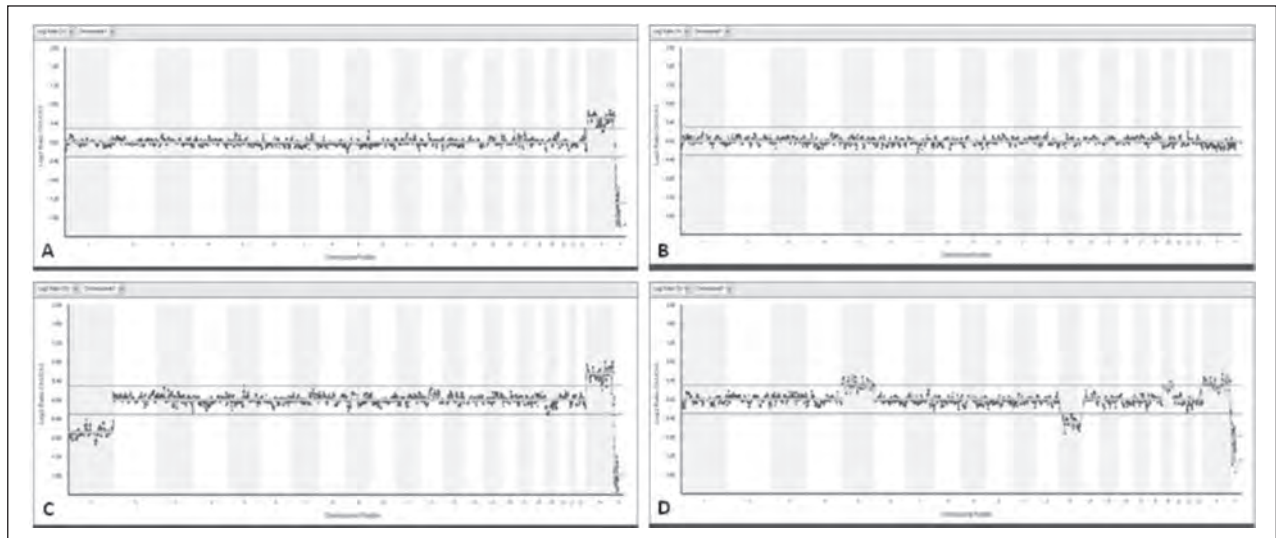


Figure 1. A: Example of a normal female embryo analyzed from a trophoctoderm biopsy by aCGH. B: Example of a normal male embryo analyzed from a trophoctoderm biopsy by aCGH. C: aCGH analysis of an embryo with a karyotype: 45,XX,-1. D: aCGH analysis of an embryo with a karyotype: 47,XX,+5,-13,+19.

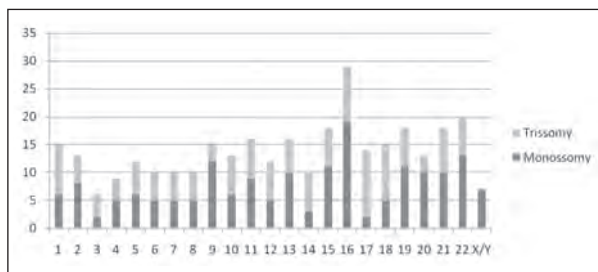


Figure 2. Presence of aneuploidies affecting all the chromosomes with a slightly higher prevalence of monosomies mainly those involving the chromosome 16.

MATERIAL AND METHODS

Patients Details and Biopsy

Data presented were derived from 53 patients undergoing assisted reproductive treatment. The average maternal age was 38 (30-45) years. The chromosome screening was offered to these patients for advanced reproductive age, history of unsuccessful IVF attempts (>2 attempts) and miscarriages.

Forty six of these patients had their embryos biopsied on day-5 during blastocyst stage and transferred after the aCGH analysis, on day-6, without vitrification. Seven patients had her embryos biopsied on day-3 and the euploid embryos were transferred to uterus on day-5. Array-CGH results were available for 161 of the 172 embryos biopsied. Eleven biopsied samples had degraded DNA that did not enable the analysis.

Comparative Genome Hybridization microarray (aCGH)

Each sample biopsied (trophoctoderm and blastomes) 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 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 (Figure 1).

RESULTS

Of the embryos tested, 68,3% were found to be chromosomally abnormal (110 out of 161). A wide variety of aneuploidies was detected. Indeed, it was found that any chromosome can be affected by aneuploidy in IVF embryos (Figure 2). Monosomies and trisomies represented almost equally, with a slightly higher prevalence of monosomies mainly those involving the chromosome 16. Sixteen of the abnormal embryos were a consequence of chromosome breakage, resulting in partial losses or gains of chromosomal material, most of which affected the larger chromosomes (chromosomes 1–11 and chromosome X). Although the majority of embryos could be incompletely diagnosed by FISH for 9 chromosomes (13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X and Y), 37 of them (23%) would be classified as completely normal and probably transferred. Complex abnormalities (more than 3 aneuploidies in the same embryo) were seen in 32 embryos. As expected, a strong association between advancing maternal age and aneuploidy was observed. The number of normal embryos obtained from patients 30–37 (mean 34.1) years old were compared with those from patients 38–45 (mean 41) years old and we found out that the number of normal embryos in the first group is 2 fold higher than the second group (34/17).

DISCUSSION

Earlier studies have reported associations between aneuploidy and several distinct abnormal morphologies (Bielansk et al., 2002; Munne et al., 2006; Moayeri et al., 2008). However, in most cases the correlations have been weak, and no morphologic marker permitting accurate differentiation of euploid embryos from those with a lethal chromosome abnormality has yet been identified. This failure may simply demonstrate that cleavage stage morphology is a poor guide to aneuploidy.

The present study illustrates that aneuploidy can affect any chromosome (Figure 2). It is therefore inevitable that some embryos from earlier studies, with abnormalities affecting untested chromosomes, were wrongly categorized as euploid, like was seen in ~23% of all analyzed embryos in this report, that could be misdiagnosed by FISH 9 chromosomes and then transferred to uterus and fail to implant.

In the present study, aCGH analysis was used, allowing all of the chromosomes to be accurately assessed. Furthermore, the majority of the embryos tested was based on the analysis of several cells rather than just one, an approach that theoretically reduces the risk of misclassification due to mosaicism (Fragouli et al., 2008). Around 70% of all embryos analyzed (68,3%) were chromosomally abnormal. A strong association between maternal age and aneuploidy was observed, decreasing the number of normal embryos from 34 in patients aged 31–37 (mean 34.1) years to 17 in the embryos of women aged 38–47 (mean 41) years.

With few exceptions, abnormalities affecting the largest chromosomes, monosomies, and abnormalities affecting multiple chromosomes simultaneously are not observed during prenatal testing. This suggests that such “severe” anomalies are lethal before the end of the first trimester of pregnancy, although the precise point at which affected embryos succumb remains to be defined. In contrast to our data, almost totally obtained from trophoctoderm biopsies, one earlier study suggested that most monosomies are incapable of forming viable blastocysts (Sandalinas et al., 2001). A detailed evaluation of all the chromosomes in 158 good quality blastocysts revealed that even the most severe chromosomal abnormalities (e.g. monosomy, imbalance affecting the largest chromosomes and aneuploidy affecting multiple chromosomes) were often capable of surviving up to the blastocyst stage (Fragouli et al., 2008).

In conclusion, our results are in agreement with a previous investigation of more than 2000 embryos (personal communication with Genesis Genetics Institute) that found the same proportion of monosomies and trisomies involving all the chromosomal complement and confirm that even though some women of advanced reproductive age can produce embryos capable of becoming blastocysts, they have an elevated risk of carrying chromosome errors compared with embryos from younger women.

** Corresponding author:

Juliana F. Cuzzi, BSc, PhD

juliana@genesisgenetics.com.br

Rua Mato Grosso, 306, conjunto 506

Higienópolis

São Paulo, SP, Brasil

CEP 01239-040

Telefone: +55 11 2114 6654

References

- Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation
Boue A, Boue J, Gropp A. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Adv Hum Genet.* 1985;14:1–57.
development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod.* 2002;17:413–9.
- Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K. Live birth after polar body array comparative genome hybridization prediction of embryo ploidy - the future of IVF? *Fertil Steril.* 2010; 93: 1006-10.
- Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2008;23:2596–608.
- Fragouli E, Wells D, Delhanty JD. Chromosome Abnormalities in the Human Oocyte. *Cytogenet Genome Res.* 2011; 133(2-4):107-18.
- Moayeri SE, Allen RB, Brewster WR, Kim MH, Porto M, Werlin LB. Day-3 embryo morphology predicts euploidy among older subjects. *Fertil Steril.* 2008;89:118–23.
- 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. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006;12: 234–53.
- Obradors A, Rius M, Cuzzi J, Daina G, Gutierrez-Mateo C, Pujol A, Marina F, Marquez C, Benet J, Navarro J. Errors at mitotic segregation early in oogenesis and at first meiotic division in oocytes from donor females: comparative genomic hybridization analyses in metaphase II oocytes and their first polar body. *Fertil Steril.* 2010;93:675–679.
- Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2001;16:1954–8.

Effect of the oxygen conditions on the results of an oocyte donation program: a prospective randomized trial.

Efeito das condições de oxigênio no resultado de um programa de ovo-doação: estudo prospectivo e randomizado.

Sepúlveda S, Steurer I, Gazzo E, Escudero E & Noriega L.

Grupo PRANOR de Reproducción Asistida, Lima, Perú.

SUMMARY

Introduction- objective. The human embryo culture is performed in incubators with an atmosphere of ~20% oxygen, a different situation from the human tube, estimated at 5%. Currently, there are trigas incubators where the embryos can be grown in this condition. The aim of this study was to compare pregnancy and implantation rates in oocyte donation cycles, when using incubators with ~ 20% oxygen versus incubators with 5% oxygen.

Material and methods- we designed a prospective randomized study with 50 cycles per arm. Blastulation rate, proportion of vitrified embryos and the quality of the inner cell mass of the embryo were also compared.

Results-The pregnancy rate was similar in both conditions, 55.3% for 5% oxygen and 54.6% for ~ 20% oxygen. The implantation rate was 36.8% for ~ 20% and 41.8% for 5%. Patients using trigas incubators had a higher rate of embryo freezing: 30.8% versus 19.2% ($p < 0.0003$) of patients using conventional incubators. This means that 55.4% of embryos developed in trigas was of good quality, versus only 41.8% in conventional ($p < 0.0002$).

Conclusion- we suggest that trigas incubators are more efficient and allow the development of higher quality embryos compared to conventional incubators. We expect that will be reflected in the cumulative pregnancy rate.

Keywords: blastocyst culture - oxygen tension

RESUMO

Introdução- objetivo- O cultivo de embriões é realizado em incubadoras com uma atmosfera de oxigênio de ~20%, uma situação diferente das trompas uterinas, onde se estima em 5%. Atualmente, existem incubadoras trigas, que podem cultivar os embriões nestas condições. Comparamos as taxas de gestação e implantação em ciclos de doação de óvulos, com incubadoras com oxigênio ~ 20% versus incubadoras com 5% de oxigênio.

Material e método- Estudo prospectivo e randomizado com 50 ciclos por grupo. Também comparamos a taxa de blastulação, a proporção de embriões vitrificados e a qualidade da massa celular interna do embrião.

Resultados- A taxa de gestação foi semelhante em ambas as condições, de 55,3% para 5% e 54,6% para ~ 20%. A taxa de implantação foi de 36,8% para ~ 20% e 41,8% para 5%. Pacientes em uso de incubadoras de trigas apresentaram uma maior taxa de congelamento de embriões, 30,8% versus 19,2% ($p < 0,0003$) do que pacientes em uso de incubadoras convencionais. Isso fez com que 55,4% dos embriões se desenvolveram com boa qualidade em trigas, versus 41,8% no convencional ($p < 0,0002$).

Conclusão- Sugerimos que uma incubadora trigas é mais eficiente para permitir o desenvolvimento de embriões de melhor alta qualidade, que será refletido na taxa de gravidez cumulativa.

Palavras-chave: cultura de blastocisto - tensão de oxigênio

RESUMEN

Introducción- objetivo- El cultivo de embriones humanos se realiza en incubadoras que tienen una atmósfera de ~20% de oxígeno, situación diferente a la trompa materna, que se estima en 5%. Actualmente, existen incubadoras trigas, donde se puede cultivar en esta condición. Comparamos las tasas de embarazo e implantación en ciclos de ovodonación, cuando se utilizaba incubadoras con ~20 % de oxígeno versus incubadoras con 5% de oxígeno.

Materiales e método- se diseñó un estudio prospectivo al azar, con 50 ciclos por brazo. Se comparó además, tasa de blastulación, proporción de embriones vitrificados y la calidad de la masa celular interna del embrión.

Resultados- La tasa de embarazo fue semejante en ambas condiciones, 55.3% para 5% y 54.6% para ~20 %. La tasa de implantación fue 36.8 % para ~20 % y 41.8 % para 5%. Pacientes que utilizaron las incubadoras trigas, tuvieron una mayor tasa de congelación de embriones, 30.8 % versus 19.2 % ($p < 0.0003$) de las pacientes que usaron las incubadoras convencionales. Esto hace que un 55.4 % de los embriones desarrollados en trigas fuera de buena calidad, versus un 41.8 % en convencional ($p < 0.0002$).

Conclusion- se sugiere una mayor eficiencia de las incubadoras trigas, al permitir el desarrollo de un mayor número de embriones de óptima calidad, lo cual se verá reflejado en la tasa de embarazo acumulativa.

Palabras clave: cultivo a blastocisto – tensión oxígeno

INTRODUCTION

Human embryo culture is performed in incubators with an atmosphere of approximately 20% oxygen, a situation different from the tube, which is estimated at 5%. Currently, there are trigas incubators, which can be grown in this condition of hypoxia, similar to the maternal condition. These incubators are also heat stable and open recovery is much faster, lasting between 1 and 10 minutes instead of 4 hours.

Trigas incubators are easy to clean and its microenvironment is insulated from changes in the environment, as the gases come in a ready-mix, directly to the hatchery tank.

Several authors agree that the presence of oxygen is detrimental to embryonic development despite the fact that you can obtain blastocysts and have an apparently normal morphology. It has been reported that culture of embryos in low oxygen concentrations does not have an adverse effect on fertilization and early development of embryos (Dumoulin *et al.*, 1999; Kovacic & Vlaisavljević, 2008). However, it has shown differences in the development of inner cell mass of the blastocyst which will develop into an embryo (Bavister, 2004; Kea *et al.*, 2007). This is reflected in a higher rate of implantation and live birth (Meintjes *et al.*, 2009).

A retrospective analysis comparing the oxygen conditions on the results of our assisted reproduction program, suggested best results when the gametes and embryos were cultured in trigas incubators. Therefore, we designed a prospective, randomized study within an egg donation program, growing oocytes and embryos of 50 recipients in the conventional incubator (~ 20% O₂) and the other 50 recipients in incubators with (5% O₂). The aim of this work was to analyze the different outcome obtained when using 5% oxygen versus ~20%. We compared the embryonic development and fertilization, pregnancy and implantation rates.

MATERIAL AND METHODS

A randomized prospective study was designed in an oocyte donation program, growing oocytes and embryos from 100 cycles of recipients in the two study conditions, placing 50 cycles for each arm.

The day before aspiration, when the culture plates were prepared for the following morning, the recipients were randomly distributed in the two different types of incubators: 20% oxygen (standard) or 5% oxygen (trigas). Cycles were excluded for medical indications, which led to change the date of transfer or send the case to genetic diagnosis. Gametes and embryos were cultured in Global family media, until day 5 of development. Embryo quality was evaluated and blastocysts were graded, according to protocols already described (Sepúlveda *et al.*, 2009). A maximum of two embryos was transferred to each patient. The preparation of the endometrium in patients receiving embryos was performed by oral administration of estradiol valerianate (Progynova®, Schering) with 2 to 6 mg per day, in ascending order on day 2 or 3 of the cycle. Receptors required an endometrial thickness of 8 mm minimum before receiving progesterone. They received 600 mg micronized progesterone (Geslutin®, Tecnofarma) daily by vaginal route, starting on the day of follicular puncture for oocyte donor up to the day of the pregnancy test (quantification of the beta subunit of hCG). If the pregnancy test was positive, progesterone supplementation continued for 3 months.

RESULTS AND DISCUSSION

Groups analyzed were similar as described in Table 1, both for the age of the donor, the recipient's age and the number of embryos transferred.

The fertilization rate for the trigas group was 72.4% compared to 71.7% (Table 2) for the standard group. Nor was there any difference in pregnancy rates which were 55.3% and 54.6%, respectively (Table 3). There is an upward trend in the rate of multiple pregnancies, 46.2% versus 29.2%, but is not significant (Table 3). Kovacic *et al.* (2010) found no differences in pregnancy rates in ICSI cycles. However, if they compared the cumulative pregnancy rate, it was higher in trigas incubators.

We conclude that there was no difference in pregnancy rate since, in all cases, there were many embryos from which to perform a selection, only the 2 best being transferred. The implantation rate in the trigas group was 41.8% while the standard group was 36.8% (Table 4). Again, a trend in favor of trigas was observed but it is not significant. Blastulation rate was 46.2% in 5% oxygen and 40.0% in ~ 20% oxygen (Table 5). If we analyze the quality of blastocysts, using as parameter the quality of inner cell mass (ICM), there is a significant difference in favor of low oxygen culture, where 46.8% of blastocysts showed a good quality MCI.

Since the data suggests, although it does not show, a better embryo quality, we analyzed the quality of the blastocysts and the number of good quality embryos produced in both conditions, adding the transferred embryos and vitrified embryos (Table 6). It is possible to see that there is a higher percentage of embryos frozen in the trigas group (30.8% vs 19.2%) and there is significant difference when comparing the proportion of good quality embryos.

CONCLUSION

Culture in low oxygen conditions would be favorable for embryonic development up to day 5. Although there is no significant difference in pregnancy and implantation rates, there was a higher number of blastocysts of good quality under these conditions, leading to a higher proportion of vitrified embryos, for a next cycle. This could be reflected in the cumulative pregnancy rate

Corresponding author:

Soledad Sepúlveda
Manuel Olguin 1045, Lima, Perú.
Teléfono: 511-4342130
Fax: 511-4378114
soledads@fertilidadperu.com

References

- Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online*. 2004; 9: 484-6.
- Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*. 1999; 14: 465-9.
- Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B. Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2007; 87: 213-6.
- Kovacic B, Vlaisavljević V. Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 Aug;17(2):229-36.
- Kovacic B, Sajko MC, Vlaisavljević V. A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):511-9.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*. 2009 Feb;24(2):300-7.
- Sepúlveda S, García J, Arriaga E, Díaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5): 1765-70.

Relevance of laser-assisted hatching in an oocyte donation program using egg-cryobanking: a prospective randomized study

Relevância do *assisted hatching* com laser em um programa de ovo-doação utilizando banco de óvulos criopreservados: um estudo prospectivo randomizado

Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga, DVM, M.Sc. Scientific Research ^{a,b}; Rita de Cássia Savio Figueira, M.Sc. IVF Laboratory ^b; Amanda Souza Setti, B.Sc. Scientific Research ^a; Simone Santaguitta Colturato, B.Sc. IVF laboratory ^b; Assumpto Iaconelli Jr., M.D. Clinical Department ^b; Edson Borges Jr., M.D., PhD. Clinical Department ^{a,b,c}

Department affiliations

^aSapientiae Institute – Educational and Research Centre in Assisted Reproduction
Rua Vieira Maciel, 62. São Paulo, SP – Brazil
Zip: 04203-040

Telephone: 55 11 3018-3488

^bFertility – Assisted Fertilization Centre
Av. Brigadeiro Luis, 4545. São Paulo, SP – Brazil
Zip: 01401-002

Telephone: 55 11 3018-8181

^c Department of Gynaecology and Obstetrics - Botucatu Medical School/UNESP - Distrito de Rubião Junior. Botucatu, SP- Brazil. Zip: 18618-970

RESUMO

Objetivo: Este estudo prospectivo randomizado avaliou se há melhora nos resultados clínicos quando o *assisted hatching* é realizado em embriões provenientes de oócitos vitrificados em um programa de ovo-doação.

Métodos: Sessenta receptoras submetidas ao programa de doação usando oócitos vitrificados foram aleatoriamente alocadas no grupo *assisted hatching* (AH, n = 30) ou grupo controle (n = 30). As taxas de gestação e implantação foram comparadas entre os grupos. A vitrificação e procedimento de aquecimento foram realizados de acordo com o método Cryotop. Imediatamente antes da transferência de embriões, os embriões submetidos ao *assisted hatching* tiveram sua zona pelúcida aberta com um laser de diodo de comprimento de onda igual a 1,48 mμm.

Resultados: Dos 288 oócitos vitrificados, 273 (94,8%) sobreviveram. Os oócitos sobreviventes foram injetados e 228 fertilizaram 16-18h após a injeção (83,5%). Um total de 172 bons embriões foi transferido. Vinte e quatro pacientes (40%) obtiveram gestação clínica. A taxa de gestação não diferiu entre os grupos AH e controle (44,4% e 33,3%, respectivamente, p = 0,1967), porém o AH resultou em uma taxa de implantação significativamente maior (31,6% e 18,4%, p = 0,0206). Estes resultados foram confirmados pelos modelos de regressão, tanto para a gestação (OR = 1,14; IC 95% = 0,80-1,72, p = 0,766), quanto para a implantação (RC: 19,45, P = 0,041).

Conclusões: Nossas evidências demonstram a eficácia do AH em embriões derivados de oócitos aquecidos e sugerem que a criopreservação de oócitos é uma ferramenta valiosa para obtenção de sucesso em um programa de ovo-doação.

Palavras-chave: vitrificação de oócito, *assisted hatching*, programa de ovo-doação, banco de oócitos criopreservados.

ABSTRACT

Objective: This prospective randomized trial evaluated if there is an improvement in clinical outcomes when assisted hatching is performed in embryos derived from vitrified oocytes in an ovum donation program.

Methods: Sixty oocyte recipients undergoing donation program using egg-cryobanking were randomly allocated to the assisted hatched (AH, n=30) or control group (n=30). Pregnancy and implantation rates were compared between the groups. Vitrification and warming procedure were carried out according to the Cryotop method. Immediately before embryo transfer, embryos undergoing laser-assisted hatching had the zona pelúcida thinned using a 1.48 μm wavelength diode laser.

Results: A total of 288 vitrified MII oocytes were warmed for the 60 recipients (4.8 oocytes per recipient). Out of 288 vitrified oocytes, 273 (94.8%) survived. All surviving oocytes were sperm injected and 228 displayed 2 pronucleus 16-18h after injection (83.5%). There were 172 good quality embryos transferred. Twenty four patients achieved clinical pregnancy (total pregnancy rate of 40%). The clinical pregnancy rate did not differ between AH and control groups (44.4% and 33.3%, respectively, p=0.1967), however AH resulted in a significant higher implantation rate (31.6% and 18.4%, p=0.0206). These findings were confirmed by the regression models either for pregnancy (OR = 1.14; IC 95% = 0.80 - 1.72; p= 0.766), as for the implantation rate (RC: 19.45, P=0.041).

Conclusions: Our evidences demonstrated the effectiveness of the AH in embryos derived from warmed oocytes and suggest that oocyte cryopreservation is a valuable tool to provide successful outcomes in an egg donor program.

Key words: oocyte vitrification, assisted hatching, egg donation program, egg-cryobanking

INTRODUCTION

Ovum donation is a successful practice that is commonly applied as a response to many clinical situations, and leads to the highest pregnancy rates reported for any assisted reproductive method (Sauer and Kavac, 2006).

The clinical outcome of oocyte donation requires a receptive endometrium, usually prepared by exogenous hormone replacement (Pados et al., 1994; Nadalini et al., 2009), and a well-synchronized replacement of good-quality embryos. For the synchronization, several strategies have been employed with varying levels of success, but certainly the most crucial factor is the availability of oocyte banks. The establishment of banks of donated oocytes considerably simplified the logistics and means by which oocytes could be donated.

In spite of the numerous studies conducted over the last 20 years, the reliability of oocyte cryopreservation has only recently been confirmed. Since the first report of a child birth after oocytes cryopreservation has been reported (Chen, 1986), the slow cooling method has been applied with varying success (Fabbri et al., 2001; Allan, 2004; Levi Setti et al., 2006; Oktay et al., 2006; Nadalini et al., 2009). Novel approaches to slow freezing have been introduced with improved oocyte survival rates and subsequent embryo development. As an alternative to slow freezing, the vitrification procedure has been recently applied for human oocytes and embryos (Kupker et al., 1995; Vajta and Nagy, 2006), allowing improvements in cell survival, fertilization, embryo development and clinical outcomes (Kuwayama et al., 2005a; Lucena et al., 2006; Vajta and Nagy, 2006; Kuwayama, 2007; Chian et al., 2008).

This procedure uses very high cooling rates and high concentrations of cryoprotectants in which a solution or specimen solidifies to form a glass-like, or vitreous, structure without any ice crystal formation during cooling. This state is maintained throughout the whole warming procedure (Kuwayama, 2007).

The difficulties associated with oocyte cryopreservation are mostly related to the special structure and sensitivity of this cell, the exposure time to the cryoprotectant solutions, the concentration of the cryoprotectants, the equilibrium temperature and the extra- and intracellular ice formation that affect the viability and physiology of oocytes (Gardner et al., 2007). Moreover zona pellucida hardening of cryopreserved oocytes was also shown to be increased by the freeze-thaw process (Manna et al., 2001). Hatching of the blastocyst from the zona pellucida is a prerequisite for implantation in the uterus. In fact, it has been demonstrated that an reduced implantation ability observed following *in vitro* fertilization (IVF) embryo transfers may be because of the inability of the embryo to hatch out of the zona pellucida (Hazout et al., 2006).

In the past decade, several techniques for assisted hatching (AH) in IVF programmes have been introduced to breach or to thin the zona pellucida and assist in the natural process of hatching. However, few randomized studies have specifically addressed the issue of AH performed on frozen-thawed embryos during IVF cycles, and previous studies reported controversial results with decreased (Primi et al., 2004), similar (Hughes et al., 1994) or increased (Gabrielsen et al., 2004) implantation rates in the AH group compared to the control group. Moreover, there is no available literature supporting the AH relevance in embryos derived from vitrified/warmed oocytes.

The goal of this current prospective randomized trial was to verify whether there is an improvement in clinical outcomes when AH is performed in embryos derived from vitrified/warmed oocytes in an ovum donation program using egg-cryobanking.

METHODS

Study Design

Sixty oocyte recipients undergoing donation program using egg-cryobanking were randomly allocated to the assisted hatched (AH, n=30) or control group (n=30). Patient's randomization was carried out using SAS System for Windows and performed just before embryo transfer by IVF laboratory staff. Pregnancy and implantation rates were compared between the groups.

Pregnancy was defined as the presence of fetal heart activity by ultrasound at 6 to 7 week's gestation and implantation was defined as the presence of gestational sac visualized on ultrasound 4 to 6 weeks after embryo transfer.

A written informed consent was obtained, in which patients agreed to share the outcomes of their own cycles for research purposes, and the study was approved by the local Institute review board.

Preparation of oocytes and vitrification/warming process

Retrieved oocytes were maintained in culture media (global® for fertilization, LifeGlobal, Connecticut, USA) supplemented with 10% protein supplement (LGPS, LifeGlobal, Connecticut, USA) and covered with paraffin oil (Paraffin oil P.G., LifeGlobal, Connecticut, USA) for two to three hours before cumulus cell removal. Surrounding cumulus cells were removed after exposure to a HEPES buffered medium containing hyaluronidase (80IU/mL., LifeGlobal, Connecticut, USA). The remaining cumulus cells were then mechanically removed by gently pipetting with a hand-drawn Pasteur pipette (Humagen Fertility Diagnostics, Charlottesville, USA).

Denuded oocytes were then assessed for nuclear status. Oocytes that were observed to have released the first polar body were considered mature and vitrified three hours after collection and cryo-stored. Vitrification and warming procedure were performed using the Cryotop method (Kuwayama, 2007).

Intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed two hours after warming, in micro-injection dish, prepared with 4 µL droplets of buffered medium (Global® w/HEPES, LifeGlobal, Connecticut, USA), and covered with paraffin oil on a heated stage at 37.0 ± 0.5°C of an inverted microscope. Approximately 16 hours after ICSI, fertilization was confirmed by the presence of two pronuclei and the extrusion of the second polar body. Embryos were kept in a 50µl drop of culture medium (Global®, LifeGlobal, Connecticut, USA) supplemented with 10% protein supplement covered with paraffin oil in a humidified atmosphere under 6% CO₂ at 37°C for three days.

Good quality embryos were defined as those having all of the following characteristics: 7 to 10 cells, less than 15% fragmentation, symmetric blastomeres, absence of multinucleation, colorless cytoplasm with moderate granulation with no inclusions, absence of perivitelline space granularity and absence of zona pellucida dysmorphism. Immediately before embryo transfer, embryos undergoing laser-assisted hatching had the zona pellucida drilled by making a small (30µm) opening, away from the edges of the holes, using a 1.48 µm wavelength diode laser (Fertilase, OCTAX Laser Shot™, Herbron Germany), under an inverted Nikon Diaphot microscope (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Mean values were compared by a Student's *t* or Mann-

Whitney test as appropriate and proportions were compared by the chi-squared test. Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for numeric variables and proportions (%) for categorical variables.

To study the influence of the AH on pregnancy outcome, binary logistic regression was performed, and to study the influence of the AH on implantation, linear logistic regression was conducted.

All regression analysis was adjusted for maternal age, number of retrieved oocytes, endometrium thickness, and fertilization rate, as these would be considered potential confounders of the association between the factor evaluated and the ICSI outcomes.

Results were expressed as odds ratios (OR) and 95% confidential interval (CI) or regression coefficients (RC), and *P* value.

Results were considered to be significant at the 5% critical level ($p < 0.05$). Data analysis was carried out using the Minitab (version 14) Statistical Program.

RESULTS

A total of 288 vitrified MII oocytes were warmed for the 60 recipients (4.8 oocytes per recipient). Out of 288 vitrified oocytes, 273 (94.8%) survived. All surviving oocytes were submitted to ICSI and 228 displayed two pronucleus 16-18h after injection (83.5%). There were 172 good quality embryos selected for transfer (75.4%), in which 43 implanted (25.0%, Figure 1).

Demographic and cycles characteristics were not significantly different between the groups (Table 1).

A total of 24 patients achieved clinical pregnancy after vitrification/warming oocyte donation (total pregnancy rate of 40%). The clinical pregnancy rate did not differ between AH and control groups (44.4% and 33.3%, respectively, $p=0.1967$), however AH resulted in a significant higher implantation rate (31.6% and 18.4%, $p=0.0206$).

These findings were confirmed by the regression models either for pregnancy (OR = 1.14; IC 95% = 0.80 - 1.72; $p=0.766$), as for the implantation rate (RC: 19.45, $P=0.041$).

DISCUSSION

The successful hatching of embryos is thought to be a key event in the implantation process. If the hatching does not take place, further embryo development will not occur. It has been reported that cryopreservation-thawing procedure may impact on embryos implantation potential by hardening of the zona pellucida (Hazout et al., 2006). Therefore, assisted zona hatching was introduced in IVF programmes to breach the zona pellucida and assist on the natural process of hatching (Hazout et al., 2006). The present study investigated the contribution of laser AH in embryos derived from vitrified/warmed oocytes and a positive effect on embryo implantation potential was noted.

While some authors reported the benefits of AH in frozen/thawed embryos (Gabrielsen et al., 2004; Antinori et al., 2008; Valojerdi et al., 2008), other failed in detect the same effect (Hughes et al., 1994; Sifer et al., 2006). In addition, the literature regarding the effects of AH in embryos derived from vitrified/warming oocytes is quit scarce.

Oocyte freezing may offer the possibility of extending the reproductive capability of young women with malignant diseases in cases where the treatment involving surgery, chemotherapy or radiotherapy may compromise the ovarian reserve (Yang et al., 2007). Cryopreservation can also offer alternatives for infertile patients who are subject to ovarian hyper-stimulation syndrome, those who are poor responders to ovarian stimulation or women who are undergoing premature ovarian failure (Esfandiari et al., 2005). Moreover, human oocyte cryopreservation

Table 1. Characteristics of patients in which embryos were submitted to assisted hatching or not.

Groups	Control	Assisted Hatched	<i>P</i>
Female age	42.5 \pm 0.5	42.6 \pm 0.8	0.201
Fertilization rate	84.4 %	82.6 %	0.324
High-quality embryos rate	74.9%	75.8%	0.789
Embryos transferred	2.2 \pm 0.9	2.1 \pm 1.0	0.479

Mann-whitney and Chi squared tests

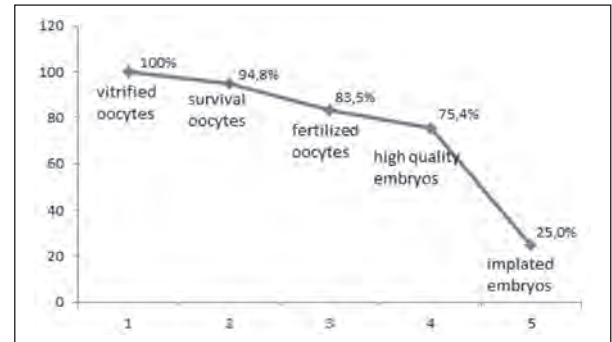


Figure 1: Graphic illustration of the percentage of vitrified oocytes, survival oocytes, fertilized oocytes, high quality embryos and implanted embryos.

solves the legal restrictions and ethical problems associated with the cryopreservation of embryos in patients undergoing IVF (Parmegiani et al., 2008).

Additionally, successful oocyte freezing/thawing technology would potentially aid donation programs (Adams et al., 1985), which are strongly limited currently in their efficiency by different factors including availability of qualifying donors, expense, delay in synchronization, and ethical concerns regarding supernumerary embryo disposition. Oocyte cryo-bank would provide the more efficient sharing of donor eggs between multiple recipients, improving the cost effectiveness through better use of resources.

Clearly, the most crucial prerequisite for a successful egg cryo-banking program is to have an efficient oocyte freezing/thawing technology. However, in spite of the evident clinical relevance, the development of efficient cryopreservation techniques has represented a real challenge, as both freezing and thawing exposes cells to severe stress and can potentially cause cell damage. On the other hand, oocyte cryopreservation by vitrification represents a feasible alternative that has been producing satisfactory outcomes (Grifo and Noyes, 2010).

These gametes must withstand the vitrification/warming process to generate competent embryos capable of implanting. Although it is well known that several factors my influence this intricate process, in the present study satisfactory survival, fertilization and implantation rates were observed for warming oocytes. Moreover, concerns related to the zona pellucida hardening, was alleviated, as demonstrated by the higher implantation rate observed when AH was performed.

Our rates are consistent with other studies which have reported improved survival, implantation, and pregnancy rates, when vitrification was used instead of the slow freezing method (Kuwayama et al., 2005b; Lucena et al., 2006; Antinori et al., 2008; Cobo et al., 2010).

Together with the above cited studies, the current study results support the concept that oocyte cryopreservation can be performed successfully in a routine IVF program,

providing the foundation for the egg-cryobanking employment especially in donor–recipient programmes. Nagy et al (Vajta and Nagy, 2006) compared the results of fresh and frozen oocyte donation cycles and showed that the number of oocytes allocated per recipient was about five times higher in fresh cycles. The number of warmed oocytes per recipient was relatively low as a consequence of high survival rates, confirming previous observations when vitrification was used. In fact, since many or most recipients end up having many more embryos in a fresh donation cycle than they would possibly ever use; most of them remaining frozen, adding to the ever-increasing problem of cryo-stored embryos.

In the present study, the implantation rate calculated on the number of oocytes warmed thus reached almost 15.0%. This favorable outcome confirms the potential of oocyte vitrification and suggests that the efficiency of oocyte donation can be significantly improved using cryobanking. Oocyte cryo-banking may also reduce frozen embryo storage and, as described before, may help with donor–recipient synchronization and possibly reduce cost.

CONCLUSIONS

Our evidences demonstrated the effectiveness of the AH in embryos derived from warmed oocytes and suggest that oocyte cryopreservation can be considered as a tool to provide highly successful outcomes in an egg donor program.

References

Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J Jacobs HS. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet*. 1985;2:1375-9.

Allan J. Re: Case report: Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2004;44:588.

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D Antinori S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:835-41.

Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. 1986;1:884-6.

Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, Ruvalcaba Castellon LA, Garcia Amador MI Montoya Sarmiento JE. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;16:608-10.

Cobo A, Garrido N, Pellicer A Remohí J. Development of a predictive model for donor's vitrified oocyte's survival in an egg-bank. *Fertil Steril*. 2010;94:S20.

Esfandiari N, Ryan EA, Gottlieb L Casper RF. Successful pregnancy following transfer of embryos from oocytes with abnormal zona pellucida and cytoplasm morphology. *Reprod Biomed Online*. 2005;11:620-3.

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 2001;16:411-6.

Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, Feldinger B, Lindenberg S Fedder J. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod*. 2004;19:2258-62.

Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007;67:64-72.

Grifo JA and Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril*. 2010;93:391-6.

Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant

to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:19-25.

Hughes SM, Huang ZH, Morris ID, Matson PL, Buck P Lieberman BA. A double-blind cross-over controlled study to evaluate the effect of human biosynthetic growth hormone on ovarian stimulation in previous poor responders to in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1994;9:13-8.

Kupker W, al-Hasani S, Schulze W, Kuhnel W, Schill T, Felberbaum R Diedrich K. Morphology in intracytoplasmic sperm injection: preliminary results. *J Assist Reprod Genet*. 1995;12:620-6.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005a;11:608-14.

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

Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67:73-80.

Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod*. 2006;21:370-5.

Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. 2006;85:108-11.

Manna C, Rienzi L, Greco E, Sbracia M, Rahman A, Poverini R, Siracusa G De Felici M. Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. *Zygote*. 2001;9:201-10.

Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 3:45-55.

Oktay K, Cil AP Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006;86:70-80.

Pados G, Camus M, Van Steirteghem A, Bonduelle M Devroey P. The evolution and outcome of pregnancies from oocyte donation. *Hum Reprod*. 1994;9:538-42.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Ciampaglia W, Infante F, Pocognoli P, de Fatis CT, Troilo E Filicori M. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/rapid thawing protocol with high sucrose concentration. *Hum Reprod*. 2008;23:1771-7.

Primi MP, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A, Barri P Germond M. A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *Hum Reprod*. 2004;19:2325-33.

Sauer MV and Kavic SM. Oocyte and embryo donation 2006: reviewing two decades of innovation and controversy. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:153-62.

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Hugues JN Wolf JP. A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod*. 2006;21:2384-9.

Vajta GandNagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:779-96.

Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L Ashtiani SK. Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*. 2008;90:84-91.

Yang D, Brown SE, Nguyen K, Reddy V, Brubaker C Winslow KL. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. *Fertil Steril*. 2007;87:1469 e1-4.

Emprego de oócitos de descarte como fonte de blastocistos partenotes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas com grau clínico.

Adriana Bos-Mikich¹, Rafael Ruggeri², José Luis Rodrigues², Norma P. Oliveira³, Melisa Croco⁴, Patricia H. Prak⁴

¹Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Laboratório de Biotécnicas da Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz, Porto Alegre, RS.

⁴Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil; Instituto de Pesquisa com Células-tronco.

RESUMO

Em ciclos de reprodução assistida (RA) é comum a presença de oócitos imaturos na coleta ou oócitos em MII que não foram fertilizados após inseminação, os quais serão descartados. Estes oócitos podem ainda responder a um estímulo externo levando à produção de embriões com capacidade de desenvolvimento limitada, mas capazes de gerar linhagens de células-tronco embrionárias humanas (CTEh). Esta estratégia de geração de embriões contorna problemas éticos envolvendo a utilização de embriões humanos gerados com fins reprodutivos para criação de linhagens de CTEh. Neste estudo, oócitos humanos descartados de ciclos de RA e oócitos bovinos obtidos de abatedouro e maturados *in vitro* foram ativados partenogeneticamente com SrCl₂ ou com o ionoforo de Ca²⁺. Em humanos, a ativação por 4 ou 22 hrs com SrCl₂ levou a taxa de ativação de 9,7 e 8,3% e de desenvolvimento embrionário de 6,4 e 8,3%, respectivamente. A exposição de 7 oócitos ao ionoforo de Ca²⁺ resultou na ativação e clivagem de 2 partenotes. Em bovinos, a taxa de ativação e de desenvolvimento embrionário com Sr²⁺ ficaram entre 2,6 e 26,3%. Com o ionoforo de Ca²⁺ a ativação e o desenvolvimento embrionário ficaram entre 47 e 69%, respectivamente. Dos embriões clivados, 23% atingiu o estágio de blastocisto após exposição ao ionoforo e 3,5hrs ao 6-DMAP. Esses resultados sugerem que o ionoforo de Ca²⁺ juntamente com o 6-DMAP é um agente mais eficiente para induzir a ativação partenogenética em oócitos humanos e bovinos e este sistema será doravante utilizado na ativação de oócitos humanos visando a criação de colônias de CTEh com grau clínico pré-GMP (*good manufacturing practice*) para futuro emprego em medicina regenerativa.

Palavras-chave: oócito, partenogênese, células-tronco embrionárias, medicina regenerativa.

ABSTRACT

The presence of immature or fail to fertilize oocytes is not uncommon in Assisted Reproduction (AR) cycles and they are usually discarded. These oocytes may still respond to an external stimulus to generate embryos with limited developmental capacity, but capable to give rise to human embryonic stem cell (hESC) lines. This strategy overcomes ethical problems involved in the use of human embryos generated for reproductive reasons to create hESC lines. In the present study discarded human oocytes and bovine oocytes obtained from an abattoir

and matured *in vitro* were parthenogenetically activated using SrCl₂ or Ca²⁺ ionophore. Human oocytes cultured for 4 or 22hrs in presence of SrCl₂ showed 9,7 and 8,3% of activation and 6,4 and 8,3% of embryonic development, respectively. The exposure of 7 oocytes to medium containing Ca²⁺ ionophore resulted in 2 activated and cleaved parthenotes. In bovines, activation and embryonic development after exposure to Sr²⁺ were 2.6 and 26.3%, respectively. Using the ionophore, activation and embryo development rates were 47 and 69%, respectively. Among the cleaved embryos, 23% of them reached the blastocyst stage after exposure to the ionophore followed by 3.5hrs in 6-DMAP. These results suggest us that Ca²⁺ ionophore together with 6-DMAP represents a better activating agent to induce embryo development in human and bovine oocytes. This system will be used now on to activate human and bovine oocytes aiming to establish a protocol for the creation of hESC colonies with clinical pre-GMP (*good manufacturing practice*) grade for future use in regenerative medicine.

Keywords: oocytes, parthenogenesis, embryonic stem cell, regenerative medicine.

INTRODUÇÃO

O oócito pode ser considerado a célula fonte de todas as células e tecidos de um novo organismo. Em ciclos de reprodução assistida (RA) é bastante comum a presença de oócitos imaturos em metáfase I (MI) ou vesícula germinativa (VG), no momento da coleta ou oócitos que não fertilizaram após inseminação por FIV ou ICSI. Geralmente, este material é descartado, mas se exposto a um estímulo adequado, capaz de acionar seu ciclo celular, ele tem ainda potencial de desenvolvimento embrionário. Tal processo é conhecido como partenogênese, uma modalidade de reprodução comum em alguns grupos animais. Em mamíferos, embriões partenotes não têm qualquer potencial de desenvolvimento fetal a termo. Entretanto, estes embriões podem ser utilizados como fonte de células pluripotentes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas (CTEh) que viriam a beneficiar uma significativa parcela da população, sem envolver dilemas éticos do emprego de embriões gerados com fins reprodutivos. A ativação partenogenética de oócitos murinos com o agente químico SrCl₂ acarreta em um desenvolvimento embrionário bastante satisfatório até o estágio de blastocisto (Bos-Mikich et al., 1995; 1997). Em humanos, ativação partenogenética

de oócitos previamente criopreservados com ionomicina, um ionoforo de Ca^{2+} levou a índices de ativação de até 86% e 16.7% de formação de blastocistos (De Fried et al., 2008). Estes fatos justificam a utilização de agentes como o SrCl_2 , um agente indutor de ondas de Ca^{2+} intracitoplasmático semelhantes às observadas durante o processo de fertilização (Bos-Mikich et al., 1993) ou o ionoforo de Ca^{2+} (Brevini et al., 2011) para ativação partenogenética de oócitos humanos imaturos ou falhas de fertilização como alternativa para geração de células-tronco embrionárias humanas (CTEh). Este estudo objetivou testar dois sistemas de ativação partenogenética, pelo sal SrCl_2 e pelo ionoforo de Ca^{2+} A 23187, em oócitos humanos descartados de ciclos de RA, para a elaboração de um protocolo eficaz de ativação e desenvolvimento embrionário partenogenético humano com a finalidade de derivação e formação de colônias de CTEh com grau clínico pré-boas práticas de manufatura (cGMP). Devido a relativa pequena disponibilidade de gametas humanos encaminhados à pesquisa e a facilidade de obtenção de ovários bovinos de abatedouro, o trabalho utilizou também este modelo animal para aumentar o número amostral e a confiabilidade nos resultados alcançados. O modelo bovino foi escolhido por ser o que mais se aproxima da fisiologia ovariana e oocitária da mulher, sendo uma espécie mono-ovulatória, e com a formação de um folículo dominante, situações semelhantes àsquelas encontradas em ovários humanos (Bianchi et al., 2010). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP-UFRGS).

MATERIAL E MÉTODOS

Oócitos humanos

Oócitos humanos imaturos (MI) ou maduros (MII) coletados em ciclos de estimulação hormonal controlada que não fertilizaram após inseminação por FIV ou ICSI foram encaminhados ao estudo após concordância e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos casais envolvidos em tratamentos de RA no Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz (CPRHNF).

Os oócitos coletados imaturos em metáfase I foram expostos a 10mM de SrCl_2 (Sigma) em meio Human Tubal Fluid (HTF-Irvine) por 22hrs e cultivados por até 48hrs em meio HTF para observação de progresso além da MI e neste caso, encaminhados à meio HTF acrescido de 10mM SrCl_2 e 5µg/ml de citocalasina D.

Oócitos em MII que não mostraram sinais de fertilização até 24 a 30hrs após inseminação por FIV ou ICSI foram encaminhados à ativação em meio HTF contendo 10mM SrCl_2 , por 4 ou 22 hrs ou em meio suplementado com 5mM de ionoforo de Ca^{2+} (A 23187, Sigma). Após a exposição ao meio de ativação, todos oócitos e potenciais zigotos partenotes foram cultivados em meio Global (LifeGlobal) até parada do desenvolvimento ou estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário foi aferido a cada 24 horas.

Oócitos bovinos

Oócitos bovinos foram aspirados de ovários de abatedouro trazidos ao laboratório à aproximadamente 30-35°C até 4hrs após o abate. Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) de boa qualidade (células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo) foram maturados por 24 horas em meio TCM 199 (Forell, 2008). Após o período de maturação, os oócitos foram expostos ao SrCl_2 por 4, 8 e 20hrs. A seguir, comparou-se o melhor resultado obtido com o sal, com os resultados alcançados pelo

Tabela I. Resultados de ativação e desenvolvimento embrionário de oócitos humanos após exposição ao SrCl_2

	4 horas	22 horas
Nº de oócitos expostos ao Sr^{2+}	31	46
Nº. Oócitos com Pn (%)	3/31 (9,6)	3/46 (6,5)
Nº Clivagem /Nº. exposto(%)	2/31 (6,4)	3/46 (6,5)
Nº. Mórulas/Nº. Exposto (%)	-	1/46 (2,1)
Nº de Mórulas/Nº. clivagem (%)	-	1/3 (33)

Tabela II. Resultados de ativação de oócitos bovinos com diferentes períodos de exposição ao SrCl_2

	4 horas	8 horas	20 horas
Número de Repetições	3	4	4
Nº de COCs em IVM	45	49	63
Nº de COCs expostos ao Sr^{2+}	38	44	57
Nº Clivagem /Nº. exposto(%)	1/38 (2,6)	7/44 (15,9)	15/57 (26,3)
Nº. Mórulas/Nº. exposto (%)	-	-	2/ 57 (3,5)
Nº de Mórulas/Nº. clivagem (%)	-	-	2/15 (13,3)

Tabela III- Resultados comparativos de ativação de oócitos bovinos com SrCl_2 e ionoforo de Ca^{2+} com diferentes períodos de exposição ao 6-DMAP

	Sr^{2+} 20h	Ca^{2+} /6-DMAP 3hrs	Ca^{2+} /6-DMAP 3,5hrs
Número de Repetições	3	3	4
Nº de COCs em IVM	41	100	77
Nº de COCs expostos ao Sr^{2+} ou Ionof de Ca^{2+}	35	95	67
Nº Clivg/ Nº. exposto (%)	11/35 (31,4)	45/95 (47)	52/67 (69)
Nº. Mor.ou blast/ Nº. expostos (%)	3/35 (8,3)	1/45 (2,2)	12/52 (23)
Nº de Mór/ Nº.clivagem (%)	3/11 (27,2)	-	-
Nº de blats/ No.clivagem(%)	-	1/45 (2,2)	12/52 (23)

tratamento por 5 minutos em meio contendo Ionoforo de Ca^{2+} (Wang et al., 2008) seguido de 3 ou 3.5 hrs em meio suplementado com 6-DMAP. Após as ativações, os COCs foram cultivados em meio *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) e avaliados às 48 e 168 hrs de desenvolvimento *in vitro* em atmosfera de 5% de CO_2 a 38.5°C. Devido a dificuldade de visualização dos pronúcleos em zigotos bovinos, as taxas de ativação basearam-se na constatação de clivagem, 48hrs após exposição ao agente ativador. Foram realizadas 3 ou 4 réplicas de cada experimento de ativação.

RESULTADOS

Dentre os 18 oócitos coletados em MI e deixados por 22hrs em presença do sal SrCl_2 , 6 (33%) atingiram MII sem haver progresso à formação de pronúcleos e desenvolvimento embrionário, após subseqüente exposição ao SrCl_2 acrescido de citocalasina D.

A Tabela I mostra os resultados de ativação de oócitos humanos em MII que falharam a fertilização e foram

encaminhados à ativação partenogenética com SrCl_2 . Dentre o total de 46 oócitos, 36 provieram de falhas de fertilização por ICSI e deles foram gerados os partenotes. Dez oócitos provenientes de uma falha de fertilização por FIV não apresentaram quaisquer sinais de ativação. Subseqüentemente, sete oócitos, falhas de fertilização por ICSI foram expostos ao ionoforo de Ca^{2+} sendo que 2 destes apresentaram pronúcleos e clivagem até estágio de 2 e 4 células.

Na primeira fase dos experimentos com oócitos bovinos (Tabela II), 157 COCs foram maturados *in vitro* por 24 hrs. Destes, 139 COCs foram expostos à meio contendo 10mM SrCl_2 por 3 diferentes períodos, conforme mostra a Tabela II. As taxas de clivagem foram progressivamente maiores, 2.6%, 15.9% e 26.3% conforme aumentou o período de cultura em presença do sal de 4 para 8 e 20 hrs, respectivamente. Houve a formação de 2 mórulas após 20hrs de exposição dos COCs ao meio contendo Sr^{2+} , sem a formação de qualquer blastocisto (13.3% de desenvolvimento sobre o total ativado). Na segunda etapa dos experimentos (Tabela III), 41 COCs maturados *in vitro* por 24 hrs foram expostos ao meio contendo 10mM SrCl_2 por 20hrs e 100 e 77 COCs foram ativados por exposição ao ionoforo de Ca^{2+} por 5min seguidos de 3 e 3.5hrs de exposição ao 6-DMAP, respectivamente. Nesta série de experimentos, o índice de ativação e clivagem até o estágio de mórula com SrCl_2 foi de 31.4% e 27.2%, respectivamente. Os resultados com ionoforo de Ca^{2+} mostraram índices de ativação de 47 e 69% nos grupos seguidos de 3hrs e 3.5hrs de exposição ao 6 DMAP, respectivamente, resultados estatisticamente diferentes daqueles alcançados com o sal de Sr^{2+} . Ainda, no grupo ativado com o ionoforo e exposto por 3hrs ao 6-DMAP, houve a formação de um blastocisto (2.2%) e no grupo exposto por 3.5hrs houve a formação de 12 blastocistos ou 23% dos oócitos que clivaram após ativação.

DISCUSSÃO

Os resultados de ativação e clivagem de oócitos humanos com o SrCl_2 aqui descritos são inferiores àqueles apresentados por outros autores utilizando outros sistemas de ativação (De Fried et al., 2008), indicando que este talvez não seja o melhor método de indução do desenvolvimento partenogenético para oócitos humanos. Os experimentos com ionoforo de Ca^{2+} parecem mais promissores, apesar de que o número reduzido de oócitos expostos ao agente não nos permite concluir que este seja um sistema o melhor de ativação para humanos. Os resultados com oócitos bovinos corroboram os resultados com SrCl_2 em humanos e reforçam a sugestão de que o ionoforo de Ca^{2+} seja o agente mais apropriado para induzir a partenogênese em oócitos humanos e bovinos. De Fried e colaboradores (2008) já haviam relatado a indução do desenvolvimento partenogenético de oócitos humanos utilizando a ionomicina, outro ionoforo de Ca^{2+} com resultados muito satisfatórios de ativação e desenvolvimento ao estágio de blastocisto. Entretanto, o SrCl_2 foi utilizado com sucesso para induzir a formação de pronúcleos e desenvolvimento embrionário humano em casos de falha de fertilização por ICSI (Kyono et al., 2009), e em bovinos produziu índices de ativação e desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto entre 34 e 53% e entre 11 e 13%, respectivamente (Méo et al., 2005). Uma das possibilidades da dificuldade em ativar oócitos humanos com o sal seria a idade pós-coleta dos gametas no momento da ativação. Em murinos, a ativação ocorria 2 horas após a coleta dos oócitos (Bos-Mikich et al.,

1997) e em bovinos 2hrs após 24 hrs de maturação *in vitro* dos gametas (Méo et al., 2005). Outra possibilidade para o baixo índice de ativação em oócitos humanos seria a presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} no meio de ativação, conforme observaram Méo e colaboradores (2005), corroborando resultados apresentados anteriormente em murinos (Bos-Mikich et al., 1995; 1997).

Linhagens de CTEh partenogenéticas já foram descritas na literatura (Mai et al., 2007; Lin et al., 2007; Revazova et al., 2007). Estas linhagens, como a grande maioria das linhagens existentes de CTEh não têm potencial de uso clínico por terem sido geradas em presença de componentes animais no meio de derivação ou de proliferação e crescimento das colônias. A partir dos resultados alcançados com estas séries experimentais partiremos para a derivação em substrato definido visando a produção de linhagens de CTEh partenogenéticas livres de componentes animais para futuro emprego terapêutico em medicina regenerativa.

Correspondência:

adriana.bosmikich@gmail.com

Referencias Bibliográficas

- Bianchi P, Serafini P, Rocha AM, Hassun P, Motta E, Baruselli P, Baracat E. Follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation Protocols. *Reprod Sci.* 2010; 17: 1135-1143.
- Bos-Mikich, A., Swann, K., and Whittingham, D. G. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 41:84-90.
- Brevini TA, Pennarossa G, Deeguleor M, Tettamanti G, Ragni G, Paffoni A, Gandolfi F. Parthenogenetic cell lines: Na unstable equilibrium between pluripotency and malignant transformation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;;12:206-12.
- Bos-Mikich A, Whittingham DG, Jones KJ Meiotic and Mitotic Ca^{2+} Oscillations Affect Cell Composition in Resulting Blastocysts. *Dev. Biol.* 1997;182:172-179.
- De Fried EP, Ross P, Zang G, Cunniff K, Denaday F, Salamone D, Kiessling A, Cibelli J. Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 2008;89:943-947.
- Forell F .Otimização do sistema de produção de clones por transferência nuclear com a utilização de oócitos vitrificados e diferentes tipos celulares como doadores de núcleo. Tese de Doutorado. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2008).
- Kyono K, Kumagai S, Nishinaka C, Nakaio Y, Uto H, Toya M, Sugawara J, Araki Y. Birth and follow-up of babies born following ICSI using SrCl_2 oocyte activation. *Reprod Biomed Online.* 2008; 7:53-58.
- Lin G, OuYang Q, Zhou X, Gu Y, Yuan D, Li W, Liu T, Lu G .A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following *in vitro* fertilization procedure. *Cell Res.* 2007; 17:999-1007.
- Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, Zhou C, Zhou Q. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts *Cell Res.* 2007; 17: 1008-1019.
- Méo SC, Yamazaki W, Leal CLV, Oliveira JÁ, Garcia JM. Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology.* 2005; 63:2089-2102.
- Revazova ES, Turovets NA, Kochetkova LB, Kuzmichev LN, Janus JD, Pryzhkova MV. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. *Cloning Stem Cells.* 2007; 9:432-449.

Choosing to freeze oocytes decrease the chances of pregnancy from fresh oocytes?

Congelando oócitos diminui a chance de engravidar com oócitos à fresco?

Ricardo Azambuja¹, Lilian Okada¹, Virginia Lazzari¹, Luiza Dorfman¹, Mariangela Badalotti¹, Alvaro Petracco¹

¹ Clínica Fertilat, Porto Alegre, RS, Brasil

Local do estudo: Fertilat - Centro de Medicina Reprodutiva, Porto Alegre, RS

RESUMO

Objetivo: A idéia de congelar oócitos e consequentemente evitar problemas éticos, religiosos e administrativos que o congelamento de embriões pode gerar, trás outra preocupação: Poderia congelando oócitos e consequentemente inseminando menos oócitos diminuir a chance de gravidez para os casais usando Técnicas de Reprodução Assistida? Nossa clínica vem congelando oócitos desde 2000; desta forma estes dados foram avaliados para responder esta questão. Este estudo foi observacional retrospectivo, com o objetivo de comparar resultados de pacientes que decidiram congelar oócitos versus aqueles pacientes que decidiram inseminar todos os oócitos nestes últimos 11 anos.

Material e métodos: Nossos dados, de 2000 a 2010, incluem congelamento de oócitos pelo método lento e por vitrificação. Todos os pacientes com mais de 10 oócitos era oferecido à possibilidade de criopreservar os seus oócitos. Um total de 2106 ciclos foi comparado, destes, em 372 ciclos os pacientes decidiram criopreservar oócitos. Quando os pacientes decidiram congelar oócitos, o número de oócitos inseminados (de 5-8) dependendo da idade da mulher, enquanto que os outros oócitos eram congelados. Todos os pacientes seguiram o protocolo de inseminação, cultivo e transferência da clínica. No dia da aspiração folicular, os pacientes iniciavam a utilizar 90mg de progesterona vaginal gel diariamente. Progesterona era administrado até o teste de hCG, e aqueles pacientes que apresentavam resultados acima de 25UI/mL, progesterona era mantida até 12 semanas de gestação. A transferência de embriões foi realizada com cateter, sob controle de ultra-som. **Resultados:** Diferença estatística foi observada no número de oócitos inseminados, taxa de fertilização, e média de embriões transferidos ($p < 0.05$), enquanto que taxa de implantação e gestação clínica não houve diferença ($p > 0.05$).

Conclusões: Desta forma estes resultados mostram que inseminando seis oócitos não diminui a chance de gravidez dos casais.

Palavras chave: taxa de gravidez, taxa de fertilização, oócito, criopreservação

ABSTRACT

Objective: The idea of freezing oocytes and consequently avoiding all ethical, religious, and administrative problems that frozen embryos might generate, brings another concern: Could freezing oocytes and consequently inseminating less fresh oocytes decrease the chance of pregnancy to the couples using ART? Our clinic has

been freezing oocytes since 2000; therefore these data were evaluated to answer this question. This study was an observational retrospective cohort, with the objective to compare results from patients that decided to freeze oocytes versus those patients that have decided to inseminate all oocytes for the last 11 years.

Material and Methods: Our data, from 2000 to 2010, includes frozen oocytes from slow freezing and vitrification techniques. All patients with more than 10 oocytes were offered the possibility to cryopreserve their oocytes. A total of 2106 cycles were compared, from those, in 372 cycles, the patients decided to cryopreserve oocytes. When the patients decided to freeze oocytes, the number of oocytes inseminated (from 5-8) depended on the women's age, while the extra oocytes were frozen. All patients followed clinical protocol for insemination, culturing and transferring embryos. On the day of follicular aspiration, the patients started using 90mg progesterone vaginal gel daily. Progesterone was maintained until the hCG blood test, and for those patients with results above 25UI/mL, progesterone was kept until 12 weeks of pregnancy. The embryo transfers were performed with a catheter, under ultrasound control.

Results: Statistical difference was observed in the number of oocytes inseminated, rate of fertilization and average of embryo transfer ($p < 0.05$), but not in implantation and clinical pregnancy rates ($p > 0.05$).

Conclusions: Therefore these results have shown that inseminating 6 oocytes did not decrease any chance of pregnancy to the couples.

Key words: pregnancy rate, fertilization rate, oocyte, cryopreservation,

INTRODUCTION

Embryo cryopreservation techniques have improved, allowing storage of viable surplus embryos for an indefinite period of time. However, the disposition of surplus frozen embryos has sparked significant debate regarding the disposition of these embryos when they are no longer required of their parents or the parents die. A possible solution to this problem is to cryopreserve supernumerary oocytes rather than embryos (Azambuja et al., 2011). The first birth of a baby after oocyte cryopreservation occurred in 1986 (Chen, 1986). Since then, improvements in technology have made this a feasible possibility for young women at risk of premature ovarian failure, and for those women who require radiotherapy or chemotherapy for cancer. Among other indications there is the possibility of freezing oocytes in order to avoid all ethi-

cal, religious, and administrative problems that frozen embryos might generate. Therefore it means that less oocytes would be inseminated. This may bring another concern: Could frozen oocytes and consequently inseminating less fresh oocytes decrease the chance of pregnancy to the couples using ART? This is a concern that the literature has not tried to address yet. Our clinic has been freezing oocytes since 2000; therefore these data were evaluated to try to answer this question. This study had the objective to compare the fertilization, cleavage, pregnancy, and implantation rate between patients that decided to freeze oocytes versus those patients that have decided to inseminate all oocytes for the last 11 years.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patient characteristics

This was an observational retrospective cohort study. The study population consisted of patients who sought medical assistance for treating conjugal infertility. The data were collected from the medical records at the clinic between 2000 and 2010, with administrative authorization. All the patients were informed and gave signed informed consent before the fertilization treatment, granting their data for scientific purposes. The patients that did not wish to freeze supernumerary embryos and had frozen oocytes were included in this data. The oocytes were frozen either by using slow freezing or vitrification techniques. All patients with at least 10 oocytes were offered the possibility to cryopreserve their oocytes, regardless of their age. A total of 2106 cycles were compared, from those, in 372 cycles, the patients decided to cryopreserve oocytes. When the patients decided to freeze oocytes, part of oocytes were inseminated (from 5-8) depending on the women's age, while the other part of the oocytes were frozen (Group 1). The mean maternal age for this group was 32.7. Group 2 had a mean maternal age of 34.8 years and consisted of patients inseminating a minimum of 08 oocytes. Even inseminating a maximum of 5 eggs (group 1), there were some viable embryos that needed to be frozen after fresh transfer (this possibility was also included in the informed consent).

Freezing oocytes

The cryopreservation protocol consisted of a slow freezing-rapid thawing method, using a choline based medium. After 2-4 h of incubation in HTF® (human tubal fluid, Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) supplemented with 7.5% SSS (Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) the oocytes were transferred to a 4-well dish (Nunclon, Roskilde, Denmark) where removal of the cumulus cells were performed. Approximately 6-7 good quality MII oocytes were fertilized by ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), and a minimum of 6 oocytes were cryopreserved. The oocytes, to be frozen, were then placed in a Choline based medium with 1.5M PrOH for 15 min, and then held for an additional 15 min in a Choline based medium with 1.5M PrOH plus 0.2M sucrose (Stachecki et al., 1998). The oocytes were loaded in plastic straws (IMV International, Minneapolis, Mn, USA) and transferred into a programmable freezer: Freeze Control (Cryologic CL 8000, Victoria, Australia).

The initial chamber temperature was 20°C. The temperature was slowly reduced to -7°C at a rate of -2°C/min. Ice nucleation was induced manually at -7°C. After holding for 10 min at -7°C, the straws were cooled slowly to -33°C at a rate of 0.3°C/min, rapidly cooled to -120°C and held for approximately 10-15 minutes to allow stabilization of the final temperature, and then transferred

Table 1. Results from patients that choose to freeze oocytes versus patients that decided to inseminate all oocytes.

Groups	1 (Freezing Oocytes)	2 (All Oocytes Inseminated)
Cycles, n	372	1734
Average Women Age (±SD)	32.3 (± 4.2)	34.8(± 4.8)
Oocytes Inseminated, n	2414	17688
Average Oocytes Inseminate (±SD)*	6.5(± 0.9)	10.2(± 4.5)
Oocytes Fertilized, n (%)*	1893 (78.4)	13090 (74.0)
Embryos Cleaved, n (%)	1840 (97.2)	12731 (97.2)
Average Embryo Transfer (±SD)*	2.4 (± 0.7)	3.1(± 0.9)
Pregnancies, n (%)	214 (57.5)	924 (53.3)
Clinical Pregnancies, n (%)	186 (50.0)	793 (45.7)
Implantation, n (%)	266 (29.7)	1211 (22.3)
Live Birth/ on going pregnancies, n (%)*	164 (44.1)	665 (38.4)

*p<0.05

into liquid nitrogen tanks for storage until thawing.

The cryotop method for oocyte vitrification was used as previously described (Kuwayama et al., 2005). Oocytes were equilibrated in 7.5% (v/v) ethylene glycol (EG) + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in TCM 199 medium + 20% synthetic serum substitute (SSS) referred to as equilibrium solution-ES at room temperature for 15 minutes. The oocytes were then placed into "vitrification solution-VS" that was the same as "ES" except that the concentrations were 15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.5M sucrose. After 1 minute in this solution, oocytes were placed on the cryotop strip (Kuwayama et al., 2005) and immediately submerged into new liquid nitrogen.

Stimulation and endometrial preparation

The use of Gonadotropin Releasing Hormone Analogue (a-GnRH) started on the second phase of the menstrual cycle prior to the IVF cycle (down regulation). It is done by sequential administration of the medication until it reaches a complete pituitary blockage, shown by serum levels of estradiol less than 40pg/ml. After that, the gonadotropins are added to stimulate the follicular development. The gonadotropins were administered until the follicles reach 18-20mm, when the human chorionic gonadotropin (hCG) is administered. After 33-36 hours the administration of hCG the oocytes were retrieved. On the day of oocyte retrieval the patients started with progesterone gel 8%. The semen preparation and insemination were performed accordingly to laboratory's procedure. The fertilization was checked 18-20 hours after the insemination. The criteria for normal fertilization were the presence of 2 pronuclei and 2 polar bodies. The embryos were observed daily and on the day of the transfer were selected based on best morphological aspect (Red Latino Americana, 1998). The embryo transfer to the uterus was done on the second or third day after the follicle aspiration, guided by ultrasound. Clinical pregnancy was confirmed with the presence of a gestational sac and fetal heart beat on ultrasound exam. Progesterone supplement were kept until 12 weeks of pregnancy.

Statistical Analysis

The average oocytes inseminated, and average of embryos transferred were compared through Mann-Whitney test (p<0.05), while the fertilization, cleavage, implantation, and pregnancy rates were compared through the chi-square test (p<0.05).

RESULTS/DISCUSSION

As shown in table 1, in 372 cycles the patients decided to freeze part of their oocytes, and in 1734 cycles, the patients decided to inseminate all oocytes. Statistical difference was found in the number of oocytes inseminated, fertilization rate, number of embryos transferred, and the delivery rate between the 2 groups ($p < 0.05$).

The difference in the number of oocytes inseminated (6.5 versus 10.2) in each group was related to the desire of the patients to not freeze supernumerary embryos. All patients were informed that sometimes even inseminating a maximum of 5 oocytes, it decreases but does not eliminate the chance to freeze embryos. The fertilization rates were significantly different between groups ($P < 0.05$), as this value for group 1 was 78.4%, whereas for group 2 was 74%. A possible explanation for this difference, since all oocytes were fresh and all submitted to the same laboratory procedure, might be related to the fact that the oocytes inseminated in group 1, where submitted to a preselection, where the best oocytes with a uniform cytoplasm and no vacuoles were chosen to be inseminated, while in group 2 all Metaphase II oocytes were inseminated. Our overall fertilization rate in the clinic is about 78%, which is similar to obtained in group 1. In both groups the fertilization rate, were higher than the 67% observed when fresh oocytes from donor cycles were used (Nagy et al., 2009), and lower than the 82.2% found in another group (Cobo et al., 2008) also using donor cycles, where the mean age was 26.7 years old. Also, the average embryo transfer was statistically different between the 2 groups ($p < 0.05$): an average of 2.4 embryos transferred for group 1 where part of the oocytes were inseminated versus 3.1 embryos/transfer in group 2 where all oocytes were inseminated. This might be related to the patient's age, since the mean age was different between both groups, and until recently, patients above 35 years old, had 3 embryos transferred. However, even transferring more embryos in group 2, this did not result in higher clinical pregnancy, or implantation rates ($p > 0.05$) when compared to group 1. The literature reporting double embryo transfers has obtained similar clinical pregnancies rates from 35.8 to 44% (Martikainen et al., 2001; Thurin et al., 2004; Lukassen et al., 2005; Van Moonfort et al., 2006), lower than our 50%, and 45.7 pregnancy rates observed in groups 1 and 2 respectively, although the average of 3 embryo/transfer in group 2. The implantation rate observed in our paper (29.7 and 22.3%) was lower than the 34.3% reported in the double embryo transfer study (Moustafa et al., 2008). However it was higher than the 17.2% implantation rate observed, when a mean of 2.2 embryos per transfer were performed (Aflatoonian et al., 2010). Considering that this paper reports data from the past 10 years, it may explain why the mean of 3 embryos were transferred in group 2. Also the main point of this report was the number of mature oocytes that each patient had available for insemination or freezing regardless their age for each cycle. This factor may reflect the average of embryos transferred in both groups, but specifically in group 2. The 44.1% delivery rate in group 1 was higher than the 38.4% found in group 2. This difference may change since many pregnancies are still ongoing, however these results are similar to the 42% observed in a meta-analysis report where included 8 reports (McLernon et al., 2010).

CONCLUSIONS

These results have shown that inseminating from 5-8 fresh oocytes did not decrease any chance of pregnancy to the couples submitted to an ART. Therefore the possibility to freeze oocytes does not decrease any chance to get the

couples pregnant, and should be used worldwide in those cases where the patients do not wish to freeze embryos.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o manuscrito é original; não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no JBRA Assisted Reproduction; todos os autores participaram ativamente na elaboração do estudo e aprovaram a versão final do texto e não existem conflitos de interesse (financeiro ou de outra natureza).

Ricardo Azambuja; Lilian Okada; Virginia Lazzari; Luiza Dorfman; Mariangela Badalotti; Alvaro Petracco.

Contato:

Ricardo Azambuja
Clinica Fertilitat, Av. Ipiranga 6690/801
Porto Alegre, RS, 90610-000
E-mail: ricardo@fertilitat.com.br
Tel.: 55-51-33391142

References

- Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L. 2010. Can fresh embryo transfer be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfer in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. *J. Assist Reprod. Genet.* 27: 357-363.
- Azambuja R, Petracco A, Okada L, Michelon J, Badalotti F, Badalotti M., 2011. Experience of freezing human oocytes using sodium-depleted media. *Reprod Biomed Online* ;22:83-87.
- Chen, C., 1986. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1, 884-886.
- Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J, 2008. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh oocytes and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*, 89:1657-1664.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP, 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* ; 11:300-8.
- Lukassen HG, Braat DD, Wetzels AM, Zielhuis GA, Adang EM, Scheenjes E, Kremer JA. 2005. Two cycles with single embryo transfer versus one cycle with double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Human Reprod.* 20: 702-708.
- Martikainen H, Tiitinen A, Tomás C, Tapanainen J, Orava M, Tuomivaara L, Vilska S, Hydén-Granskog C, Hovatta O. 2001. One versus two embryo transfer after IVF and ICSI: a randomized study. *Human Reprod.* 16: 1900-1903.
- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neuborg D, Dumoulin JCM, Gerris J, Kremer JAM, Martikainen H, Mol BW, Norman RJ, Thurin-Kjellberg A, Tiitinen A, Van Montfort APA, Van Peperstraten AM, Van Royen E, Bhattacharya S. 2010. Clinical effectiveness of elective versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomized trials. *BMJ* 341: c6945
- Moustafa MK, Sheded SA, Moustafa MA. 2008. Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 17:82-87.
- Nagy ZP, Chang C, Shapiro D, Berbal DP, Elsner C, Mithcell-Leef D, Toledo AA, Kort H, 2009. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertility and Sterility*, 92:520-526
- Red Latino Americana de Reproduccion Asistida, 1998. Manual de procedimientos laboratorio de reproducción asistida, Santiago, p
- Stachecki, J.J., Cohen, J., Willadsen, S., 1998. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 37, 346-354.
- Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pingborg A, Strandell A, Bergh C. 2004. Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.* 351: 2392-2402.
- Van Moonfort APA, Fiddelers AAA, Jansen JM, Derhaag JG, Dirksen CD, Dunselman AJ, Land JA, Geraedts JPM, Evers JLH, Dumoulin JCM. 2006. In unselected patients, elective single embryo transfer prevents all multiples, but results in significantly lower pregnancy compared to double embryo transfer: a randomized controlled trial. *Human Reprod.* 21: 338-343.

Reflexión bioética sobre la tecnología reproductiva en parejas homosexuales

Willner R, Rivera S, Arribere R, Coco R

Fecunditas

Instituto de Medicina Reproductiva-afiliado a la UBA
robertococo@fecunditas.com.ar

RESUMEN

El artículo de Andrew Solomon: "Meet my real modern family", publicado en la revista Newsweek del 7/2/2011 amerita una reflexión crítica desde la perspectiva bioética, ya que las nuevas configuraciones familiares emergen como consecuencia de las prácticas médicas aplicadas en el campo de la reproducción asistida y del reconocimiento del matrimonio igualitario en nuestro país. Si bien es cierto que la mutua implicación entre oferta tecnocientífica y demanda social fue corriendo progresivamente los límites de lo posible y de lo imaginable, nos encontramos hoy ante realidades que aún carecen de sustrato ético, legal y psicosocial.

¿Qué sucede cuando una pareja lésbica recurre a un espermodonante gay conocido para realizar inseminaciones artificiales a una de ellas, naciendo luego una niña y un niño? ¿Y cuando ese mismo genitor se une en matrimonio igualitario con un hombre que ya es padre de una niña concebida mediante fertilización in vitro con una mujer amiga, evitando así el contacto heterosexual? ¿Y cuando luego de casarse los dos gays tienen un hijo propio mediante ovodonación y alquiler de útero, siendo la locadora la lesbiana que se había inseminado con el semen de la pareja del gay y la donante de ovocitos una voluntaria anónima?

Si bien el feliz relato del autor coincide con la foto familiar integrada por los cuatro niños y las tres parejas conviviendo felices y en armonía, a los especialistas en reproducción asistida nos caben interrogantes, sobre:

- 1) ¿qué tipo de infertilidad se está paliando en casos como éstos?
- 2) ¿todo aquello que no está prohibido deberíamos considerarlo permitido?
- 3) ¿qué tipo de relaciones legales, afectivas y sociales habilitan estas prácticas entre los padres, entre los padres y el entorno y entre los padres, su entorno y los hijos advenidos?

Las reflexiones sobre estas nuevas familias homoparentales concretadas por la disponibilidad de la tecnología reproductiva, nos lleva a plantear si no sería conveniente limitar su aplicación hasta que se disponga de un marco regulatorio surgido de un debate inclusivo, fundado en una ética que se estructura en base al diálogo y la comunicación.

Palabras Claves: tecnología reproductiva, inseminación, identidad de género

ABSTRACT

Bioethical reflections about homoparental couples and the reproductive technologies

Andrew Solomon's article "Meet my real modern family" published in the Newsweek magazine on February

7th, 2011 deserves a critical reflection from a bioethical perspective, because the new family configurations arise as a consequence of medical practices applied in the field of the assisted reproduction and the legal recognition of gay marriage in our country.

Although it's true that the mutual implication between the techno-scientific offer and the social demands were progressively running the limits of what's possible and imaginable, we face today realities that don't have either legal or psychosocial substrate.

What happens when a lesbian couple draw on a known gay sperm donor with the aim of inseminating artificially one of these women, and as consequence of this practice a baby is born? And if this same man marries through an equal marriage another man, who is the father of a girl born through In Vitro Fertilization -to avoid sexual intercourse - with the egg of a female friend who marries then a heterosexual man? And when after marriage both gay men decide to have their own child with an anonymous egg and an the surrogated womb of the lesbian woman who gave birth to the 2 children conceived with the sperm of one of the men?

Although the author's happy story matches with the family pictures of the 4 children and the 3 couples interacting happy and harmonious, as assisted reproduction specialists we can question ourselves about:

What kind of infertility are we treating/palliating in cases like these?

Should everything what is not forbidden be considered as allowed?

What kind of legal, emotional and social relationships emerge from these practices between parents, parents and their environment and between them and their children?

The reflections about the homoparental families build thanks to the available reproductive technologies lead us to consider whether it would be desirable to restrict their application until a regulatory frame emerges from acceptable moral ethical consensus.

Key words: assisted reproductive technologies; lesbian insemination; surrogacy

RESUMO

O artigo de Andrew Solomon: "Conheça minha verdadeira família moderna", publicado na revista Newsweek 2011/07/02 merece uma reflexão crítica a partir da perspectiva da bioética, como as novas configurações familiares surgem como resultado de práticas médicas aplicadas no campo da reprodução assistida e reconhecimento do casamento igual no nosso país. Embora seja verdade que a dependência mútua tecnocientífica e demanda social esteja ocorrendo progressivamente nos limites das possibilidades e da imagi-

nável, somos agora confrontados con realidades que ainda não têm substrato ético, jurídico e psicossocial. O que acontece quando un casal de lésbicas usa un doador de semen conhecido de ambas, também homoafetivo, para inseminação artificial, resultando una menina e un menino? E quando esse mesmo genitor ingressou em igualdad en el casamento con un hombre que é pai de una criança concebida através de fertilização in vitro con un amigo da mulher, evitando o contato heterossexual? E quando, depois de casar os dois homens têm o seu próprio filho por meio de doação de óvulos e de cessão temporária de utero, a carreadora sendo a lésbica que tinha sido inseminada con o sêmen do casal de homens e una doadora voluntária de oócitos anonimamente? Embora a história feliz do autor mostre o retrato familiar composto por quatro crianças e três casais que vivem juntos, felices e em harmonia, aos especialistas em reprodução assistida resta-nos questões:

- 1) ¿Qué tipo de infertilidade está se atenuando em tais casos?
- 2) Tudo o que não é proibido é permitido?
- 3) ¿Que tipo de relações jurídicas, sociais e emocionais capacitam tais práticas entre os pais, entre pais e seu entorno, entre os pais, seu entorno e as crianças advindas?

Reflexões sobre essas novas famílias homoafetivas tornadas reais pela disponibilidad da tecnologia de reprodução, nos levam a questionar se não seia conveniente limitar a sua aplicação enquanto se aguarda a disponibilidad de una regulamentação, a partir de un debate abrangente, con base em una ética que está se estruturando em torno do diálogo e da comunicação.

Palavras-chave: tecnologia reproductiva, inseminação, identidade de género.

Reflexión Bioética

La aparición de un artículo reciente en una conocida revista de divulgación, escrito por un periodista gay acerca de la conformación de su muy moderna familia, nos ha motivado para hacer algunas reflexiones bioéticas acerca del tema (Solomon, 2011).

Sucintamente, el periodista gay - previo a contraer matrimonio con su pareja del mismo sexo - había tenido una hija a la que reconoció legalmente como suya, mediante una FIV con una amiga. Anteriormente, su pareja había sido el donante no anónimo en la inseminación de una mujer lesbiana casada con otra lesbiana. De esta manera, la pareja de lesbianas tuvo dos hijos, los cuales tienen genitores idénticos.

Si bien ambos miembros de la pareja gay tenían descendientes directos, quisieron tener otro hijo "propio". Recurrieron a una donante voluntaria anónima para la obtención de los óvulos. La mamá lesbiana que había parido a sus dos hijos, a modo de agradecimiento por el gesto que tuvo su amigo, decide alquilarle el útero a éste y a su pareja. El semen utilizado fue el del varón que tenía una hija. A su vez, la mamá de esta niña posteriormente formó una pareja heterosexual. Por lo tanto, se podría afirmar que estas tres parejas independientes, dos igualitarias y una heterosexual, están emparentadas por sus hijos gracias a la tecnología reproductiva. De los cuatro hijos de los dos gays, dos son hermanos genéticos, dos son medios hermanos y uno de ellos hermano biológico de los dos hermanos genéticos debido a que fue gestado en el mismo vientre que ellos (Fig 1).

El artículo de Andrew Solomon: "Meet my real modern family", publicado en la revista Newsweek del 7/2/2011 amerita una reflexión crítica desde la perspectiva bioética, ya que la tecnología reproductiva coadyuvó al surgimiento de las nuevas configuraciones familiares.

La bioética es un saber interdisciplinario, emergente en

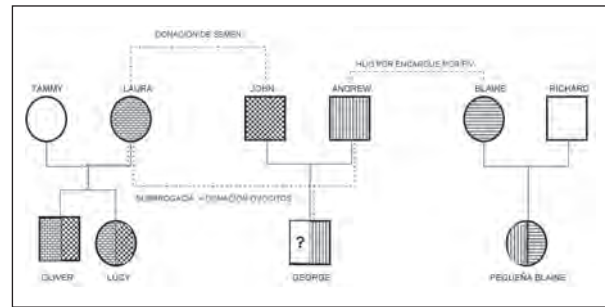


Fig 1. Árbol familiar

Tammy y Laura tuvieron a Oliver y Lucy con el semen donado por John. Andrew previo a formar pareja con John tuvo a la pequeña Blaine recurriendo al fecundación in Vitro. Posteriormente Blaine forma una pareja heterosexual con Richard.

Luego la pareja John - Andrew tiene a su propio hijo George producto del semen de Andrew con ovocitos donados anónimamente y la gestación por Laura. De los cuatro hijos, dos son hermanos (Tammy y Lucy), dos son medios hermanos (George y la pequeña Blaine) y además George hermano biológico de Oliver y Lucy ya que fue gestado por la misma madre.

la segunda mitad del siglo XX, que pone en diálogo a la ciencia y la ética. Entre otras cosas, la bioética impulsa un nuevo modelo de relación médico - paciente, cuestionando y modificando el modelo vigente de paternalismo médico. Pero a partir de su surgimiento y ante los crecientes adelantos diagnósticos y terapéuticos de las ciencias de la salud, la bioética fue ampliando su ámbito de aplicación.

Si bien es cierto que la mutua implicación entre oferta tecnocientífica y demanda social fue corriendo progresivamente los límites de lo posible y de lo imaginable, nos encontramos hoy ante realidades que aún carecen de sustrato legal y psicossocial.

Es bien reconocido que los pilares básicos de la bioética son los principios de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Este último se torna especialmente relevante ante los casos dilemáticos emergentes de la medicina reproductiva, ya que ésta terceriza una función biológica natural que tiene como destinatario a un niño por nacer.

Veamos entonces las múltiples implicaciones de la singularidad de la familia de Andrew Solomon a través de la perspectiva bioética:

I. Las técnicas de fecundación asistida, no reguladas aún en nuestro país, han desarrollado y demostrado una notable eficacia como medio terapéutico para obviar la esterilidad de una pareja heterosexual. Sin embargo cuando aparecieron estas técnicas, ni el contexto, ni las circunstancias socio-políticas, ni tampoco la moral entonces vigente, admitían su aplicación a parejas que no fueran heterossexuales. Con el transcurso del tiempo se fueron alejando cada vez más de su finalidad originaria, y en la actualidad el espectro de "beneficiarios/ usuarios" de estos procedimientos se fue ampliando como respuesta a las más variadas y sofisticadas demandas sociales. También en este ámbito rigen las leyes de la oferta y de la demanda.

En la República Argentina, la sanción de la ley 26.618 que autorizó el matrimonio igualitario, confirió a los contrayentes los mismos derechos y obligaciones que al matrimonio heterosexual.

II. Al acatar la voluntad de los contrayentes homosexuales, esta norma jurídica consagra indudablemente el principio de autonomía y pone a la Argentina en un dudoso primer lugar dentro de Latino América, por haber abierto la posibilidad de que parejas homosexuales de varones tanto como de mujeres, reclamen la igualdad en materia de reproducción.

Sin duda las parejas de mujeres homosexuales, podrán

procrear mediante la inseminación con semen de banco o bien con espermatozoides recibidos mediante un coito con un varón que se preste a ello. En cambio, las parejas de varones homosexuales, nunca podrían embarzarse por razones biológicas, debiendo entonces recurrir a técnicas de altísima complejidad, utilizando la ovodonación y el alquiler de un vientre.

Si se considerara estrictamente lo biológico no solo los homosexuales sino también las mujeres solas, mujeres jóvenes, mujeres sin útero y los varones con azoospermia quedarían excluidos de la posibilidad de usar la tecnología reproductiva para tener a sus hijos.

La alternativa del alquiler de útero presenta inconvenientes de toda índole, ya que un sujeto humano no puede ser el objeto de un contrato de servicio. Desde Kant en adelante, los seres humanos no pueden considerarse como objetos de nada ni de nadie ya que solo se los puede reconocer como *sujetos morales* y *sujetos de derecho*. Sin duda este es un reconocimiento relevante para la bioética, entre otras cosas, porque amplía y profundiza el principio de justicia.

Dada la especial significación que el derecho en general atribuye a la vida humana y atendiendo al imperativo kantiano mencionado, resulta ilícito convertir en un comercio a la vida humana, sea la de la gestante como la del embrión, feto o recién nacido (Platón "Las Leyes" Instituto de Estudios Políticos, Madrid 1960). Al primar la libertad de las acciones o de la conciencia por encima de los términos de un contrato, la locadora del útero podría retractarse en la entrega del nacido, o bien negarse a continuar su gestación. Asimismo la pareja gay locataria podría arrepentirse del trato o no querer recibir al nacido por motivos diversos. Cualquiera de estas decisiones afectan los derechos de un tercero que es la persona por nacer o ya nacida.

Si bien los centros de reproducción asistida deben respetar el principio de autonomía de las parejas homosexuales masculinas, se impone anteponer un tiempo y un espacio de reflexión entre los especialistas y los interesados acerca del lugar del futuro hijo en el seno de una familia de estas características y su relación con el entorno social. Si extrapoláramos esta situación a la conocida doctrina del "*wrongful birth*" cabría interrogarse si el advenimiento de un niño a un hogar homoparental a través del alquiler de útero no terminaría causándole serios daños al ser discriminado, resistido y aun estigmatizado socialmente. Esto podría dar lugar a la acción resarcitoria aun contra sus padres, la gestante y los profesionales intervinientes, tal como se dio en Francia, en el caso Perruche, bajo otro supuesto fáctico (Perruche, Tribunal de Casación de Francia, 2000).

En la República Argentina la aprobación de la ley del matrimonio igualitario - sin haber contemplado las múltiples implicancias y consecuencias que podrían conllevar - parecería legitimar la práctica del alquiler del útero, en tanto que para las parejas heterosexuales aún persiste la prohibición de acceder a un útero subrogado por indicación médica.

III. La sanción de la ley 26.618 sobre el matrimonio igualitario modifica radicalmente el concepto de filiación de origen románico fundado en el *ius sanguinis*, vigente desde hace siglos en la mayoría de las legislaciones existentes. De quien será el hijo nacido de una pareja lesbiana inseminada con semen de banco o dado altruísticamente por un varón, en ambos casos anónimamente?: lo razonable sería decir que es hijo de la lesbiana que lo dio a luz, ya que el parto determina la filiación, mientras que la otra mujer de la pareja lesbiana podría adoptar el hijo de su cónyuge. Sin embargo el reconocimiento del

matrimonio igualitario hizo que se abandonara el vínculo filiatorio basado en el *ius sanguinis*, convirtiéndose al nacido en hijo del *matrimonio*. De quién será el hijo nacido de una pareja gay obtenido mediante la inseminación de ovocitos donados con el semen de uno de ellos y la posterior transferencia a un útero alquilado?: lo razonable sería decir que es hijo del varón que aportó su semen y de la mujer que lo gestó, pero al abandonarse el vínculo filiatorio basado en el *ius sanguinis*, el niño es hijo de dos padres, sin importar el origen de las gametas ni tampoco quién lo ha gestado y parido. Por todo lo dicho, el matrimonio igualitario facilita todas estas prácticas en la medida que todos los actores involucrados cumplan con lo pactado. Pero si éstos no cumplieran lo acordado, se originarían ríspidos y bochornosos juicios ante los Tribunales en los que predomina la formación romanística de los Magistrados, muchos de los cuales tienen además, profundos vínculos de interés o educativos de raigambre católica, poco propensos a este tipo de "progresismos".

En definitiva si la finalidad de la tecnología reproductiva es paliar la infertilidad, las parejas homosexuales por naturaleza son infértiles, por lo tanto serían mercedoras de ser atendidas como cualquier pareja heterosexual. Esta demanda que emerge de determinado grupo social nos lleva a redefinir y ampliar el concepto de infertilidad. Sin embargo, también deberíamos interrogarnos si será suficiente contar solo con el respaldo legal para dar cabida a una serie de situaciones para las cuales la sociedad carece de representación psíquica y social, no habiendo siquiera denominaciones para estos nuevos formatos parentales. (Rudinesco, 2002)

Como las prácticas involucradas son técnicamente factibles, deberíamos cuestionarnos más profundamente acerca de las implicaciones afectivas, sociales y legales, ya que como agentes de salud física y mental no solo nuestro accionar es terapéutico sino que fundamentalmente debe estar al servicio de la prevención.

Las reflexiones sobre estas nuevas familias homoparentales nos llevan a concluir que la ciencia y los científicos, actualizados y amparados por la interdisciplina propia de la bioética, deberían ajustar el desarrollo de sus investigaciones y la aplicación de las mismas, a marcos regulatorios adoptados luego de consensos morales y éticos aceptables y aceptados por toda sociedad pluralista (Engelhard, 1995). Por su parte ese colectivo social deberá establecer los mínimos morales referidos. Ellos se obtendrán a través de compromisos previos, que faciliten una estructura moral común, no única, lograda a partir de una ética de la comunicación. De esa forma con sustento en la argumentación y en la crítica fundamentada, según lo sostenido por Ricardo Maliandi (Maliandi, 2004) se puede lograr una ética convergente dotada de contenido (Gracia, 1989), única forma de rescatar a las personas como unidades bio-psico-sociales.

Referencias

- Engelhard HT. Eds. Paidós. Los Fundamentos de la Bioética. Barcelona, 1995
- Gracia D. Eds. Eudema. Fundamentos de Bioética. Madrid, 1989
- Maliandi R. Eds. Biblos. Ética, conceptos y problemas. Buenos Aires, 2004
- Perruche N. Tribunal de Casación de Francia Sentencia del 17 de noviembre de 2000.
- Platón "Las Leyes". Instituto de Estudios Políticos, Madrid 1960.
- Rudinesco E. Eds. Fayard. La famille en désordre. París, 2002.
- Solomon A. Meet my real modern family. Newsweek Latin America Edition, February 7, 2011

Pôsteres selecionados para concorrer ao Prêmio Rio de Janeiro

TRA CLÍNICO

P1 - Ovarian reserve in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination is associated to clinical pregnancy rate but not to the number of ovulated follicles

Juan Enrique Schwarze, MSc^{1,2}, Jose Balmaceda¹, Ricardo Pommer¹

¹ Reproductive Medicine Unit Clinica Monteblanco

² Department Obstetrics and Gynaecology, Universidad de Santiago de Chile

Abstract

Almost 10% of couples are faced with infertility. Probably, the most frequent treatment for it is controlled ovarian hyperstimulation with intrauterine insemination. Among its recognised prognostic factors for achieving pregnancy are: age, number of ovulated follicles and ovulation-induction protocol. Previously, we found that women with diminished ovarian reserve (DOR), as determined by the clomiphene citrate challenge test, had lower pregnancy rate than women with adequate ovarian reserve (AOR).

Material and methods: In this retrospective cohort study we explore whether the effect of ovarian reserve on the clinical pregnancy rate was mediated by the number of ovulated follicles. We analysed 173 patients that were stimulated only with clomiphene citrate, and compared the number of ovulated follicles and clinical pregnancy rate.

Results: We found that the mean number of ovulated follicles did not differ significantly (AOR 2.0; DOR 1.9); the clinical pregnancy rate was higher in the AOR group (13%) than in the DOR group (9%). We performed a logistic regression analysis, adjusting for the number of ovulated follicles, and found that DOR group had almost half the odd of achieving pregnancy than that of AOR (OR=0.6).

Conclusion: Our findings grant that more research is needed in order to determine whether our findings represent the reality of women with DOR, since we were not able to find statistical significance probably due to our study's power.

Keywords: Ovarian reserve, intrauterine insemination, prognosis

Correspondence to: jeschwarze@mac.com

P2 - Análisis de los parámetros de buen pronóstico en FIV/ICSI con ovocitos propios y donados.

Coco R, Gallo A, Garrido D, Gismondi F, Neuspiller N

Fecunditas, Argentina

Instituto de Medicina Reproductiva - afiliado a la UBA

RESUMEN

Objetivo: La FIV ha dejado de ser un procedimiento experimental para convertirse en un tratamiento casi

rutinario por su eficacia y seguridad. En la medida en que se expandió su uso, el manejo de la calidad global adquirió valor. Hoy no existen dudas que el buen servicio depende del cuidado y control de los estándares técnicos y médicos de la práctica. Los resultados de los programas de ovodonación (OD) suelen usarse como control, pero no todos los ciclos de OD cumplen ese objetivo, a pesar que las donantes son jóvenes, fértiles y con buena reserva ovárica.

Métodos: Estudiamos retrospectivamente las variables que inciden en el resultado de 2092 ciclos consecutivos de FIV/ICSI, tanto en pacientes con ovocitos propios y donados. Del total 1478 fueron con ovocitos propios (OP) y 614 con ovocitos donados (OD). Los ciclos se dividieron en dos grupos: los de buen pronóstico (BP) aquellos que cumplían con todas las variables de BP, y los de mal pronóstico (MP) aquellos que no las cumplían.

Resultados: De los ciclos con OP, 674 fueron de BP y 804 de MP. La tasa de nacidos vivos por aspiración fue del 35 y 25%, respectivamente. De los ciclos con OD, 312 fueron de BP y 302 de MP. La tasa de nacidos por aspiración fue 40 y 30%, respectivamente. Las tasas de nacidos vivos con OD en el grupo de MP es 5% más alta que la tasa nacidos vivos con OP en el grupo de MP.

Conclusión: Estos datos habría que tenerlos en cuenta no solo cuando se quiere usar a la OD como control de la calidad del laboratorio de embriología, sino también cuando se quiere entusiasmar a las parejas con mal pronóstico a la ovodonación.

Palabras claves: fecundación in Vitro, variables de buen pronóstico en FIV, ovodonación

Contacto: robertococo@fecunditas.com.ar

P3 - Impacto da infecção viral por HIV-1 na qualidade oocitária, embrionária e taxa de gravidez.

Lilian Okada¹, Virginia Lazzari¹, Ricardo Azambuja¹, João Michelon², Mariangela Badalotti², Alvaro Petracco²

¹Embriologista

²Médico

Local do estudo: Fertilitat - Centro de Medicina Reprodutiva, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

Introdução- objetivo: O número total de pessoas infectadas com HIV é de 33.3 milhões, segundo dados de 2009 da Organização Mundial da Saúde. Destes, 15.9 milhões são mulheres que vivem com o vírus. Com a melhora na expectativa e qualidade de vida dos pacientes soropositivos e a diminuição no risco de contaminação vertical, casais HIV sorodiscordantes estão considerando a possibilidade de gravidez com o auxílio das técnicas de reprodução assistida. O objetivo do estudo foi analisar o impacto da infecção viral por HIV-1 na qualidade oocitária e embrionária, e na taxa de gravidez.

Material e métodos: 8 casais sorodiscordantes nas quais as parceiras eram soropositivas para HIV-1, com idade média de 38,83 anos e que realizaram 18 ciclos de Reprodução Assistida, no período de 2002 a 2010. O grupo controle foi composto de 36 casais soronegativos pareados no que se refere à fator de infertilidade, idade, amostra seminal e estimulação ovariana, de forma a ter dois controles para cada casal sorodiscordante,

Resultados: a aspiração folicular, da fertilização, bem

como da taxa de gestação não tiveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos sorodiscordante e controle. **Conclusão:** O estudo revelou que a infecção viral por HIV-1 na mulher não impacta negativamente na qualidade oocitária ou embrionária, e na taxa de gravidez, concordando com estudos prévios.

Palavras chave: HIV, casal sorodiscordante, qualidade oocitária, qualidade embrionária, gravidez clínica

Correspondência: lillian@fertilitat.com.br

P4 - Envelhecendo na fila da inseminação artificial: a realidade dos casais inférteis de baixa renda do Rio de Janeiro.

Tatiana Henriques Leite¹, Whitaker Jean Jaques e Silva², Sirlene Lucena de Moura, Tonia Costa², Marilena Cordeiro Dias Villela Corrêa³ e Maria do Carmo Borges de Souza⁴

¹Biomédica

²Bióloga

³Médica- IMS- UERJ

⁴Médica

Instituição: Instituto de Ginecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

Introdução-objetivo: Em setembro de 2010 foi inaugurado laboratório de sêmen em hospital universitário, referência em Reprodução Humana, primeiro no estado do Rio de Janeiro oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O objetivo é relatar resultados/desdobramentos das inseminações artificiais homólogas (IAH) realizadas desde a re-estruturação de fila de espera para o procedimento e do funcionamento do laboratório de sêmen.

Material e método: Estudo descritivo, transversal, de abordagem quantitativa. Casais (74) com indicação clínica para IAH entre 2003 e 2010 integraram fila, priorizando tempo de espera pelo procedimento e idade da paciente. Resultados de 24 ciclos (17 mulheres) com capacitação espermática e IAH integraram banco de dados no programa Excel/Office 2003 e no *Special Program for Social Sciences* (SPSS) versão 17,0. As variáveis incluem idade da mulher e do homem, causa da infertilidade, número e tamanho dos folículos pós-indução da ovulação, dose de gonadotrofina, data e hora do HCG, resultado da capacitação espermática. Todos assinaram termo de consentimento. **Resultados:** A idade média do casal é 35,5 anos ($sd=5,71$) para as mulheres e 38,1 anos ($sd=8,95$) para os homens. Das 17 mulheres que se submeteram à IAH, 9 (54,9%) tinham idades superiores a 35 anos. Dos 24 ciclos realizados, 12 (50%) foram em pacientes acima de 35 anos. Algumas pacientes, por falta de condições financeiras para custear o tratamento no setor privado ou transporte e hospedagem em outros estados, simplesmente envelheceram na fila.

Conclusões: Em função da idade das pacientes, pode haver comprometimento da taxa de sucesso de gravidez esperada para IAH. Também existe a preocupação de que a demanda do setor de reprodução aumente em demasia já que facilmente irá canalizar todos os pacientes com indicação de IAH no SUS do Rio de Janeiro. Como desdobramento, vem sendo estabelecida fila paralela para pacientes com esta indicação clínica, dentro do limite de

idade, que iniciaram atendimento.

Palavras-chave: infertilidade, inseminação intrauterina, idade, acesso, gertilização in vitro.

Correspondência: toniacos@gmail.com

P5 - Correlação entre grupos etários x grau de maturação oocitária

Autores: Iara Viana^{1,3}, Danielle Araújo³, Marjorie Mota^{2,3}, Marcelo Rocha^{4,3}, Marcelo Cavalcante³ e Oswaldo Dias³

¹Universidade Estadual do Ceará

²Universidade Federal do Ceará

³Centro de Reprodução Assistida do Ceará, Brasil
Instituição onde foi realizado o trabalho: Centro de Reprodução Assistida do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

RESUMO

Objetivo: Quando a mulher atinge os quarenta anos sua fertilidade declinou significativamente. Não somente o número total de óvulos diminui como também a qualidade dos óvulos restantes é pior. Neste trabalho avaliamos a correlação entre a idade e a grau de maturação oocitária de pacientes que se submeteram ao tratamento de reprodução assistida.

Material e métodos: A amostra foi composta de 960 óvulos coletados de pacientes submetidas ao procedimento de Fertilização in vitro. As pacientes foram divididas em grupos etários: Grupo 1 (E 34 anos), Grupo 2 (35 a 39 anos) e Grupo 3 (3 40 anos). Dentro de cada grupo, foram avaliados os oócitos com relação à maturação: Maduros (Metáfase II), Imaturos (Vesícula Germinal e Metáfase I) e Anormais.

Resultados: estão de acordo com a literatura. Foram coletados 960 oócitos, destes 573 (59,7%) pertenciam ao Grupo 1, 287 (29,9%) ao Grupo 2 e 100 (10,4%) ao Grupo 3. No Grupo 1, dos 573 óvulos coletados: 448 (78,2%) estavam maduros (Metáfase II), 91 (15,9%) estavam imaturos (Vesícula germinal ou Metáfase I) e 34 (5,9%) eram anormais. No Grupo 2, dos 287 óvulos coletados: 215 (74,9%) estavam maduros (Metáfase II), 59 (20,6%) estavam imaturos (Vesícula germinal ou Metáfase I) e 13 (4,5%) eram anormais. No Grupo 3, dos 100 óvulos coletados: 74 (74%) estavam maduros (Metáfase II), 20 (20%) estavam imaturos (Vesícula germinal ou Metáfase I) e 6 (6%) eram anormais.

Conclusão: Estes achados comprovam que a idade é um fator determinante para a taxa de sucesso em reprodução assistida e indica, em última instância, a qualidade oocitária. Espera-se que a melhora da compreensão da genética oocitária e da maneira como contribui para a viabilidade embrionária possa fornecer novos indicadores que sejam capazes de avaliar diretamente a qualidade oocitária.

Palavras-chave: Idade, Oócito, Maturação.

Correspondência: : conceptus@clinicaconceptus.com.br

P6 - Banco de ovocitos vitrificados: resultados de un programa de ovodonación.

Portella J, Benavides V, Noriega-P L, Escudero E, Noriega-H L & Sepúlveda S.
Grupo PRANOR de Reproducción Asistida, Lima - Perú.

Resumen

Introducción-objetivo: Un programa de vitrificación de ovocitos permite almacenar estos gametos para un próximo ciclo, sin tener que someter a la paciente a un nuevo ciclo de estimulación. Representa además, una buena alternativa para pacientes que tienen riesgo de perder su función ovárica y a mujeres jóvenes, que quieran postergar la maternidad. Así mismo, es una solución para los programas de donación puesto que permite la sincronización de los ciclos y los periodos de ventana.

Material y método: analizamos los resultados obtenidos con un banco de ovocitos vitrificados. Para esto, se calculó la sobrevida luego de la desvitrificación, la tasa de fecundación por ICSI y las tasas de embarazo e implantación, luego de la transferencia de embriones. Se reportan los datos de desvitrificación de ovocitos de donantes utilizados en ciclos de ovodonación, realizados durante 2009 y 2010, por el grupo PRANOR. Los ovocitos denudados y cultivados por 1 hora, fueron vitrificados de acuerdo al protocolo descrito por Kuwayama (1), utilizando medios comerciales. Cuando se requería su uso, estos fueron desvitrificados de acuerdo al protocolo de Kuwayama (1) y cultivados durante 2 horas antes de ser inyectados por ICSI.

Resultados: de 917 ovocitos desvitrificados, 780 mostraban parámetros morfológicos normales. Esto da una tasa de sobrevida de 85.1 %. De 777 ovocitos inyectados, el 69.4 % fecundó. Esto se reflejó en 96 ciclos con transferencia, de los cuales hubo 42 embarazos, dando una tasa de embarazo clínico de 43.8 % y una tasa de implantación de 30.4%.

Conclusión: es posible tener un banco de ovocitos, puesto que los resultados sugieren que, la calidad de éstos, estaría intacta.

Palabras-clave: banco de ovocitos, vitrificación, ovodonación.

Contacto: jportella@fertilidadperu.com

P7 - Transferencia electiva de un blastocisto.

Isaac Benjamín, . Randolpho Medina, Maria T. Urbina, Jorge Lerner-Biber, Indira Centeno, Luisa Ibarra.

Unidad de Fertilidad UNIFERTES, Clínica El Avila Caracas, Venezuela.

Institución donde se realizó el trabajo: UNIFERTES, Clínica El Avila, Caracas, Venezuela

RESUMEN

Introducción-objetivo: La mayoría de las críticas a las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) se basan en el aumento de los embarazos múltiples: gemelares o triples y más Multi Gestación Extrema (MGE), para minimizarlos se ha utilizado con éxito la transferencia electiva de 2 embriones (eDET) la cual ha sido efectiva para reducir la MGE pero ha traído un aumento en la tasa de embarazos gemelares. Se hace necesario implementar un programa de transferencia electiva de 1 embrión (eSET) que mantenga las tasas de embarazo e implantación de los programas con eDET. La transferencia de blastocistos ha demostrado ser una herramienta eficaz al realizar eSET y mantener tasas de embarazo e implantación similares a las alcanzadas con eDET y con el beneficio del embarazo único. En el presente trabajo se describe el primer grupo de pacientes sometidos a eSET en una unidad privada Latinoamericana,.

Material y método: 10 transferencias de blastocistos

de las cuales 9 tuvieron pruebas positivas, 1 embarazo bioquímico, 8 clínicos de los cuales 1 fue huevo muerto retenido y 7 resultaron en nacimientos de niños sanos.

Resultados: Aunque el número de eSET en esta unidad (y en la gran mayoría de los centros latinoamericanos) todavía es pequeño, los resultados obtenidos son muy promisorios y podrían colaborar con promover un mayor número de eSET.

Conclusión: En nuestra experiencia la transferencia de 1 blastocisto parece ser una alternativa segura para mantener altas tasas de embarazo e implantación con el beneficio del embarazo único. Se debe informar a las pacientes por varios medios de los problemas asociados al embarazo gemelar para tratar de aumentar la aceptación de las eSET sobre todo en pacientes del programa de ovodonación

Palabras clave: eSET, blastocisto, multigestación, embarazo gemelar, tasas de embarazo, tasas de implantación.

Contacto: ugoasc@gmail.com

P8 - Influencia de la respuesta ovárica sobre el resultado de ciclos de fertilización in-vitro al transferir embriones originados con ovocitos propios u ovocitos donados.

M.F.Urquiza¹, M.J. Donaldson¹, I. Carretero, R.N. Rolando¹, R.S.Pasqualini¹, C.J. Quintans².

Institución donde se realizó el trabajo:

¹Halitus Instituto Médico,

²Fundación REPRO,

República Argentina

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto de la respuesta ovárica sobre los resultados logrados al transferir embriones en ciclos de fertilización *in-vitro*, realizados con ovocitos propios ó donados.

Pacientes y métodos: Se incluyeron en el estudio a parejas que realizaron ciclos de fertilización *in vitro* con ovocitos propios, u obtenidos de donantes exclusivas. Se analizaron nuestros registros para determinar el resultado de los ciclos con las características mencionadas, teniendo en cuenta los resultados según el número de ovocitos maduros obtenidos en cada caso.

Resultados: Se analizaron los datos correspondientes a 3753 ciclos con ovocitos propios, y 986 ciclos de ovodonación realizados con ovocitos captados en 573 ciclos de donantes. En los ciclos con ovocitos propios se observó que el resultado variaba según la respuesta, mejorando a medida que aumentaba el número de ovocitos, con un máximo cuando se lograban entre 13 y 16 ovocitos maduros, para luego ir disminuyendo a medida que el número aumentaba. En los ciclos de ovodonación en cambio, la respuesta de la donante no mostró influencias sobre los resultados, que en este caso dependían del número de ovocitos otorgados a cada receptora.

Conclusiones: Se especula que el decaimiento en los resultados observado con respuestas ováricas elevadas se debería a un detrimento de la calidad tanto ovocitaria como embrionaria, y de la receptividad endometrial causados por la estimulación ovárica. Nuestros resultados parecen indicar que la principal responsabilidad en la disminución de los resultados se debería a un efecto negativo sobre el endometrio; ya que en los ciclos de ovodonación, donde el efecto sobre el endometrio debe descartarse, debido a que la receptora no recibe estimulación ovárica, los mismos no

dependen de la respuesta de la donante, sino del número de ovocitos adjudicados a la receptora.

Palabras claves: estimulación ovárica; ICSI, ovocitos propios; ovodonación; tasa de embarazo

Contacto:fernanda.urquiza@halitus.com

P9 - Correlación de los niveles de la hormona anti-mülleriana (HAM) con la respuesta a la estimulación ovárica controlada (H.O.C.) en pacientes bajo tratamiento de reproducción asistida.

Mojica Martínez Karlo ; Castillo-Baso Jorge; Díaz-Spindola Pablo ; Hernández Ayup Samuel ; Santos-Halliscak Roberto ;Galache-Vega Pedro.

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana. Monterrey, México.

RESUMEN

Introducción- objetivo: La Hormona Anti-Mülleriana (HAM) ha sido postulada como un marcador para predecir la respuesta ovárica en un ciclo de estimulación ovárica; al ser únicamente producida por el ovario y exhibir muy pocas variaciones interciclo o intraciclo la misma se está posicionando como potencial marcador de reserva ovárica por excelencia. El objetivo fue establecer la correlación entre los valores de HAM y la respuesta a la estimulación ovárica controlada: número de ovocitos totales y ovocitos maduros; en pacientes bajo tratamiento de reproducción asistida.

Materiales y métodos: Se realizó un análisis correlacional, longitudinal y prospectivo de las pacientes admitidas al programa de reproducción asistida de alta complejidad del XXXXXXX ciudad XXX. Posteriormente se establecieron correlaciones con respecto los niveles de hormona antimülleriana y el número de ovocitos totales y con las variables de pronóstico reproductivo.

Resultados: Se reclutaron un total de 48 ciclos consecutivos, al establecer la correlación con el número de ovocitos totales obtenidos encontramos en el grupo de 0-5 ovocitos valores de HAM de 0.59ng/dl; en el de 6-16 ovocitos valores de HAM de 2.27ng/dl y en grupo >17 ovocitos valores de HAM de : 4.74 ng/dl. El coeficiente de correlación de para ovocitos totales fue de 0.84 ($p < 0.001$) en comparación con FSH d3: -0.47 ($p < 0.001$)

Conclusión: La Hormona antimülleriana es mejor marcador que el perfil hormonal en día 3 para predecir respuesta a la estimulación ovárica controlada.

Contacto: castillobaso@hotmail.com

P10 - Predicting pregnancy in IVF patients using an ultrasonographic score prognostic system.

^{1,2} Sepúlveda J., ¹Lara E., ¹Díaz P., ¹Santos R., ¹Hernández S., ^{1, 2}Patrizio P.

¹ Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (I.E.C.H.); Monterrey, Nuevo León; México. ² Yale Fertility Center, Yale University; New Haven, Connecticut; United States.

ABSTRACT

Objectives: To assess the prognostic value of ultrasonographic score (USS), obtained on the day of hCG administration, in predicting the probability of achieving pregnancy in IVF patients.

Materials/Methods: Prospective, observational study. A total of 53 IVF cycles (58 patients) performed at our clinic and Yale Fertility Center (CT, USA) between June 2003 and January 2010 were evaluated. Only embryo transfer (ET) with morphologically grade I embryos were included in the analysis. The ultrasonographic evaluation was performed by the same investigator on the day of hCG administration using color/Doppler systems (Philips ATL HDI 4000 with 4-8 MHz probe and GE Logiq 3 with 4-10 MHz probe). Endometrial thickness, morphology, vascularity, myometrial echogenicity and uterine arterial blood flow, including pulsatility index (PI), resistance index (RI), protodiastolic notch and telediastolic blood flow, were scored. A numerical qualification for each parameter was granted according to endometrial thickness (≥ 9 mm = 1, < 9 mm = 0); endometrial morphology (trilaminar = 1, no-layering/non differentiated = 0); endometrial blood flow (shown at least 3 color pixels into zone 3 [Applebaum] = 1, less than 3 color pixels or blood flow any other external zones = 0); myometrial echogenicity (homogeneous = 1, heterogeneous = 0). Uterine arterial blood flow (Doppler spectrum): pulsatility index (≥ 3 = 0, < 3 = 1), resistance index (≤ 0.9 = 1, ≥ 0.9 = 0), telediastolic blood flow (present = 1, absent = 0), protodiastolic notch (present = 1, absent = 0). A final USS was calculated adding the values for each variable. A β -HCG test was scheduled 2 weeks after ET, and if positive, a transvaginal ultrasound was performed to visualize gestational sac(s). Statistical analysis to evaluate the association between score values, individual variables and pregnancy was performed as required.

Results: The overall clinical pregnancy rate was 39.65% (23/58) and the implantation rate was 26% (37/142). The association between USS ≥ 6 and pregnancy was statistically significant ($p = 0.0001$, 95% CI). When evaluating the association between the individual variables and pregnancy, only the endometrial morphology-trilaminar endometrium as opposed to no-layering/non differentiated endometrium- had an association with pregnancy ($p = 0.0003$). While, endometrial thickness and endometrial blood flow, showed a no significant association with pregnancy. Another variables were analyzed: HCG day $p = 0.422$, Serum peak of Estradiol $p = 0.422$, Total oocytes $p = 0.691$, and none was statistically significant.

Conclusions: The result of this preliminary study suggest that: 1) USS is an important tool to assess the uterine environment for patients undergoing IVF; 2) Endometrial morphology alone is very close informative about chances of implantation, and 3) High USS are associated with a higher probability of achieving pregnancy.

Key words: IVF, endometrial morphology, ultrasonographic score

Contacto: dr_sepulveda@yahoo.com

P11 - Seminal parameters as prognostic factors for embryonic development in IVF and ICSI patients.

Stein AC, Koff WJ, Silva DS, Santos KSD, Genro VK, Cunha Filho JS
Setting: Insemine Center for Human Reproduction.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the relationship among seminal parameters as prognostic factors for embryonic development in couples undergoing conventional IVF or ICSI during their first cycle of assisted reproduction.

Patients and methods: Prospective cohort study. 290 couples with an indication for assisted reproduction.

Results: By analyzing the seminal parameters after semen preparation and assessing their association with early cleavage, correlations occurred with motility ($P = 0.006$) and concentration ($P = 0.002$). However, there was no correlation with the percentage of sperm classified as A + B ($P = 0.075$). In assessing the semen parameters and early cleavage in the conventional IVF group, there were correlations with motility ($P = 0.028$) and concentration ($P = 0.001$); however, there were no correlations found in the ICSI group. With regard to seminal parameters and average embryonic scoring, there were correlations with sperm motility ($P = 0.0001$) and motility A + B ($P = 0.0001$) in the conventional IVF group, and there was a correlation with concentration ($P = 0.022$) in the ICSI group.

Conclusions: Our study found correlations between seminal parameters and early cleavage in the conventional IVF group but no correlation in the ICSI group. There were correlations in both conventional IVF and ICSI groups with regards to the average embryonic scoring.

Key Words: seminal parameters, embryo development, early cleavage, ICSI, conventional IVF.

Correspondência: alberto@insemine.com

P12 - Pacientes over 40's: oocytes-reception or intracytoplasmatic sperm injection with their own oocytes? A report of costs.

Lopes V.M.¹, Café T.C.¹, Brasileiro J.P.B.¹, Pereira T.R.¹, Zavattiero N.I.T.¹, Santos J.M.², Lopes J.R.C.²

¹Instituto VERHUM, Brasília, Brazil.

²Cenafert, Salvador, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Despite the assisted reproductive technology development, the pregnancy rate for women over forty's in ICSI treatments still remains low, leading to a high cost to obtain a new born. The objective of this study was to evaluate the costs with gonadotropins per baby born in patients between 40 and 43 years old, submitted to ICSI with their own oocytes or as recipients.

Materials and Methods: All ICSI cycles in women between 40-43 years old from February 2000 to July 2008 were evaluated in two reproductive centers in Brazil. Women were divided into two groups according to the oocytes used: Group 1 with their own (57 subjects) and Group 2 (44 recipients) with donated eggs from the egg sharing donation program. Ovarian stimulation was carried out with FSH until the 7th day, followed by HMG. The starting dose used for women over 40's was 300ui of FSH and 225ui for donors. The amount and costs of FSH and HMG used by the patients from group 1 and donors that donate oocytes to group 2 were analyzed. The main outcome measured was the costs with gonadotropins used per group to have a baby born.

Results: There were 11 born children in group 1 and 13 in group 2. There were no differences in pregnancy

rate ($p=0,5$). The costs with gonadotropins per cycle for group 1 and 2 were 2.731,90 vs 1.581,98 € ($p<0,001$). The costs with gonadotropins per baby born in group 1 and 2 were respectively 14.156,21 vs. 5.354,41 ($p=0,001$).

Conclusions: Egg sharing donation for advanced age women should be considered by medical staff and patient if costs are being considered, since costs per child born in cycles using their own oocytes were demonstrated to be especially high.

Key-words: "egg sharing donation"; "IVF"; "oocyte donation";

Correspondence to: viniciusmlopes2004@yahoo.com.br

P13 - Transferencia en estado de blastocisto: Resultados.

Jimmy Portella Ruiz, Isabel Steurer Navea, Víctor Benavides Soto.

Grupo PRANOR. Lima, Perú.

Objetivo: El gran desafío de las técnicas de Reproducción Asistida (TRA) es evitar las gestaciones múltiples, las cuales son ocasionadas por el alto número de embriones transferidos. El presente estudio revisa la experiencia y los resultados de ciclos de Reproducción Asistida, cuando se cultiva hasta día 5 de desarrollo, comparando diversos parámetros de acuerdo a la edad de la paciente.

Material y método: Se estudiaron de manera retrospectiva 1874 ciclos de Reproducción Asistida con cultivo embrionario hasta el quinto o sexto día de desarrollo. Se compara de acuerdo a la edad de la paciente (<35, 34-39, >39 años; y pacientes que recibieron ovocitos de donantes jóvenes, OD), las siguientes tasas: fecundación, blastulación, embarazo, implantación, aborto y cancelación.

Resultados: El número de embriones que alcanza el estadio de blastocisto, disminuye con la edad sin alcanzar significancia estadística. El porcentaje de ciclos con transferencia cancelada fue superior al 14% en las pacientes mayores de 34 años. El grupo de OD fue mayor estadísticamente significativo en cuanto a tasa de embarazo e implantación en comparación con los otros grupos estudiados ($p<0.005$). Entre los grupos de 35-39 años y mayores de 39 años no existen diferencias significativas en cuanto a la tasa de embarazo o implantación. Las pacientes mayores de 39 años presentan una tasa de aborto de 59.1%, la cual es significativamente más alta en comparación a los demás grupos estudiados.

Conclusión: El cultivo embrionario prolongado hasta el estadio de blastocisto puede ser aplicado a todas las pacientes en un programa de Reproducción puesto que permite una mejor selección embrionaria, lo cual lleva a transferir menos embriones y disminuir la probabilidad de un embarazo múltiple.

Palabras clave: Blastocisto –cultivo prolongado – ovodonación – tasa de embarazo

Contacto: jportella@fertilidadperu.com

TRA LABORATÓRIO

P14 - Potencial da técnica do Assisted Hatching em pacientes com mais de 35 anos submetidas a tratamento de reprodução assistida

Tatyane Bandeira Barros¹, Adriana Fracasso¹, Darlete Lima Matos¹, Fúlvia Estefânia Padre e Fechine² e Elmar Pequeno², André Luis da Costa Engenheir²

¹Bióloga

²Médico

Centro de Reprodução e Genética Humana – Fertilidade, Fortaleza – CE, Brasil

RESUMO

Objetivo: O Assisted Hatching (AH) é uma técnica utilizada em Centros de Reprodução Assistida, que ajuda na fragilização da zona pelúcida, permitindo que os embriões possam se implantar mais facilmente no útero. Este trabalho objetivou analisar a sua eficácia em dois grupos de pacientes submetidas ao tratamento de Reprodução Assistida.

Material e métodos: Os oócitos foram obtidos a partir de pacientes que estavam pelo menos na segunda tentativa de tratamento. Os procedimentos de aspiração, denudação, injeção e cultivo ocorreram conforme Remohí (1996). Foram consideradas apenas transferências que tinham pelo menos um embrião de qualidade A. Essa análise do embrião permitiu ao biólogo decidir pela utilização do AH ou não. Para o Hatching foi utilizado o sistema a Laser da Octax. Para a análise dos dados as pacientes foram divididas em dois grupos: A – < 35 anos; B – ≥ 35 anos. Estes se subdividiram em pacientes que fizeram ou não o AH, C e D, respectivamente. Doze dias após a transferência embrionária foi realizado o β-HCG, para a detecção da gestação. 91 casos foram utilizados para este estudo, sendo 33 pacientes do grupo AC, 13 do grupo AD, 36 do grupo BC e 9 do grupo BD.

Resultados: Ao se comparar a porcentagem de β+ em pacientes com menos de 35 anos (Grupo A), observou-se que os resultados foram semelhantes nos casos onde o HA foi necessário e onde este não foi realizado (33,3% e 38,5%, respectivamente). Já quando comparado os casos de pacientes acima de 35 anos, os resultados de β+ foi maior quando o hatching foi realizado do que no grupo BD (55,6% e 33,3%, respectivamente). Em pacientes com idade inferior a 35 anos, a utilização do hatching manteve a taxa mínima de número de β+. Já para pacientes acima dos 35 anos, ele contribuiu com um aumento de gestações.

Palavras chave: Assisted Hatching, Oócitos, Idade.

Correspondência: tatybiobandeira@yahoo.com.br

P15 - Criopreservação en estadio de blastocisto disminuye la proporción de pacientes con embriones criopreservados.

Juan Enrique Schwarze^{1,2}, José Balmaceda¹, Ricardo Pommer¹, Francisca Jeria¹

¹Unidad de Medicina Reproductiva de Clínica Monteblanco. Santiago, Chile.

²Departamento Clínico de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Santiago de Chile

RESUMEN

Introducción: La multigestación es la principal complicación de las técnicas de reproducción asistida, debido a la transferencia de más de un embrión. La criopreservación embrionaria permite la transferencia secuencial de

los embriones generados, disminuyendo así el riesgo de multigestación. Sin embargo, la criopreservación tiene algunos inconvenientes asociados, siendo la principal de ellas la acumulación de embriones criopreservados.

Los embriones se pueden criopreservar en distintos estadios del desarrollo. Nuestro equipo decidió comenzar a criopreservar embriones en estadio de blastocisto, como una forma de disminuir la acumulación de embriones.

Método: El presente estudio es un análisis de sensibilidad de las repercusiones de este cambio de política. Para esto, analizamos todos los casos de fecundación in vitro entre el 1 de enero del 2007 y el 30 de junio del 2010, e hicimos un análisis de sensibilidad, asumiendo la transferencia de un máximo de dos embriones en mujeres menores de 35 años, y un máximo de tres embriones en mujeres con 35 y más años.

Resultados: Encontramos que al criopreservar en estadio de blastocisto la frecuencia de parejas que criopreservan, y el número de embriones criopreservados disminuye francamente. El análisis de regresión logística con componentes mixtos mostró una disminución del 20% de OR por cada año de edad y una disminución de 95% al comparar el 3er de desarrollo in vitro versus el 1er día; y de 99% al comparar el 5to día con el 1er día.

Conclusion: la criopreservación embrionaria en estadio de blastocisto es una alternativa que evita la acumulación de embriones criopreservados.

Palabras claves: criopreservación, análisis sensibilidad, blastocisto

Contacto: jeschwarze@mac.com

P16 - Análise da influência das diferentes classificações embrionárias sobre a taxa de gravidez.

Arildo Nerys da Silva Junior¹, Maria Cecília de Almeida Cardoso¹, George Queiroz Vaz², Paulo Gallo de Sá², Maria Cecília Erthal de Campos Martins², Luciene Paschoal Braga Dias³.

¹Biólogo

²Médico

³Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL – FIOCRUZ – RJ).

Clínica de Reprodução Humana Assistida Vida Centro de Fertilidade da Rede D'or.

RESUMO

Introdução: Os riscos materno-fetais das gestações múltiplas, e o desejo do casal que é na maioria das vezes de conceber apenas um único filho, são os dois principais fatores que retratam a forte tendência de se transferir apenas um único embrião. Existem muitas classificações morfológicas que visam selecionar o melhor embrião para a transferência, entretanto não se sabe qual é a melhor e mais eficiente delas.

Materiais e Métodos: Foram classificados, de acordo com quatro classificações em experimentação, 442 embriões transferidos em 179 casos. A variável resposta foi à formação ou não de saco gestacional após a transferência. A eficiência das classificações foi avaliada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. As razões de chances (Odds Ratio - OR) dos graus classificatórios de cada uma das classificações estudadas, bem como a área sob a curva ROC (AROC) referentes a cada uma delas, foram determinadas e avaliadas por regressão logística (método Enter).

Resultados: Os testes estatísticos empregados resultaram em $p=0,008$, $OR=15,6\%$, e $AROC=0,691$ para a classificação Belga-dinamarquesa modificada; $p=0,013$, $OR=8,8\%$, e $AROC=0,685$ para a classificação por pontuação cumulativa; $p=0,017$, $OR=7,9\%$, e $AROC=0,675$ para a classificação veeck modificada; $p=0,020$, $OR=11,3\%$, e $AROC=0,674$ para a classificação Veeck original. Na prática todas as classificações estudadas são igualmente eficientes, uma vez que os números de significância, razões de chance e áreas sob a curva ROC foram muito semelhantes. As pequenas variações estatísticas encontradas não são significantes, e ocorrem devido ao próprio teor singular e critérios específicos adotados pelas diferentes classificações.

Conclusões: Todas as classificações embrionárias morfológicas analisadas por esse estudo são eficientes em selecionar os melhores embriões para a transferência. Levando em consideração os resultados que seriam obtidos na prática, a eficiência de todas as classificações é a mesma, não havendo classificação que seja na prática melhor ou pior do que a outra.

Palavras-chave: morfologia embrionária, classificações, gravidez

Correspondência: arildonerysjunior@bol.com.br

P17 - Is there any difference in vitrification and slow freezing protocol for oocyte and embryo cryopreservation?

Virginia Lazzari, Ricardo Azambuja, Lilian Okada, Luiza Dorfman, Mariangela Badalotti, Alvaro Petracco,

Setting: Fertilitat Reproductive Medicine Centre, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

Objective: Since the vitrification technique was developed, a question mark has been raised in order to find out if there is any indication of which protocol has better results in cryopreserving oocytes and embryos. This study had the objective to compare the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification technique for oocytes and embryos.

Material and methods: For the past 2 years we have had the opportunity to thaw embryos and oocytes either vitrified or frozen by slow freezing protocol. A total of 95 cycles (55 by slow freezing and 40 by vitrification) were performed for those patients that decided to thaw their oocytes and 120 cycles (60 to each method) were performed for those that decided to thaw their embryos. Two days before the embryo replacement, the oocytes were thawed and kept in a CO_2 incubator humidified in air, at $37^\circ C$ during 2 hours before inseminating by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). While the embryos were thawed in the replacement day, 2 hours before transferring. All embryo transfers were performed with catheter, under ultrasound control.

Results: Survival rates were statistically different ($p < 0,05$) in oocytes (65.9% to vitrification versus 55.6% for slow freezing) and embryos (89.7% to vitrification against 79.2% by slow freezing) respectively. Fertilization, cleavage, implantation, pregnancies and clinical pregnancies were not statistically different for embryos and oocytes.

Conclusion: Although the survival rate were better for vitrification technique, the pregnancy rate did not show any difference, thus both technique are efficient and can be used in assisted reproduction.

Keywords: survival rate, freezing, human oocytes, human embryos, pregnancy rate

Correspondence to: virginia@fertilitat.com.br

P18 - Post thaw survival rate in an egg-cryobanking donation program: the oocyte morphology impact.

Authors - Rita de Cássia Savio Figueira¹, Amanda Souza Setti², Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga^{1,2}, Matheus de Castro Azevedo¹, Assumpto Iaconelli¹, Edson Borges Jr ^{1 2 3}

Department affiliations

¹Fertility – Assisted Fertilization Centre. São Paulo, SP – Brazil

²Sapientiae Institute – Educational and Research Centre in Assisted Reproduction

³Department of Gynaecology and Obstetrics - Botucatu Medical School/UNESP. Botucatu, SP- Brazil.

ABSTRACT

Objective: The present study aimed at evaluating whether oocyte dysmorphisms can affect oocyte survival rates in an egg-cryobanking donation program.

Material and methods: A total of 415 MII oocytes obtained from 54 donor patients were vitrified using Cryotop method. Oocyte morphology was assessed using an inverted Nikon Diaphot microscope (Eclipse TE 300; Nikon®, Tokyo, Japan) with a Hoffmann modulation contrast system under 400X magnification, just before oocyte vitrification (2-3 hours after retrieval). The influence of dysmorphism's incidence on survival rates post thaw was assessed using linear regression analysis. Results are expressed as R^2 and P values. Results were considered to be significant at the 5% critical level ($p < 0.05$).

Results: Out of 415 vitrified oocytes, 358 (86.3%) survived. Oocyte survival rate was not affected by the presence of the analysed oocyte abnormalities: increased cytoplasmic granularity ($R^2: 1.6\%$, $P= 0.114$), vacuoles in the ooplasm ($R^2: 2.3\%$, $P= 0.276$), aggregates of smooth endoplasmic reticulum in the ooplasm ($R^2: 0.5\%$, $P=0.597$), large perivitelline space size ($R^2: 0.1\%$, $P= 0.119$), perivitelline space granularity ($R^2: 0.5\%$, $P=0.104$), fragmented first polar body ($R^2: 1.3\%$, $P= 0.403$) and zona pellucida abnormalities ($R^2: 3.5\%$, $P= 0.177$).

Conclusions: Oocyte cytoarchitecture seems to be preserved after warming procedure, irrespective of the morphology. Nowadays, there is no way to forecast oocyte donors, or stimulation cycles characteristics indicating in low oocyte survival after vitrifying and thawing. The non-invasive identification of predictive markers for oocyte survival potential remains a difficult task.

Key words: oocyte vitrification, egg-cryobanking, oocyte quality, oocyte morphology, oocyte dysmorphism.

Correspondence to: science@sapientiae.org.br

P19 - Evaluating results from blastocyst vitrification.

Ana Márcia de Miranda Cota, Elisa Lopes e Lages-Hérica Cristina Mendonça, Ana Luísa Menezes Silva, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral, João Pedro Junqueira Caetano

Clínica Pró-Criar / Mater Dei, BH – MG, Brasil

ABSTRACT

Introduction-Objective: The vitrification of blastocyst is an efficient and insurance technique that allows the storage of exceeding embryos. So the objective was to evaluate the results of the vitrification of human blastocyst in the Clinic Pró Criar / Mater Dei.

Materials and Methods: It is an observational, retrospective and descriptive study. 292 patients who had submitted a frozen-thawed blastocyst cycle during the period of January of 2007 the May of 2010 had been evaluated.

Results: The mean age of the women was 34,35 years. The mean number of vitrified and defrosted blastocyst for patient was $2,08 \pm 0.87$ (varying of 1 a 7 blastocyst), totalizing a total of 604 defrosted blastocyst. 482 blastocyst had survived, with a survival rate of 80%. The average number of blastocyst transferred was $1,63 \pm 0.77$. 57,53% patients had had the blastocysts frozen in Day 5 and 42,47% in Day 6. The global pregnancy rate for thawed cycle was 44,5%. The clinical pregnancy rate for transfer was 48%. There was no statistical difference in pregnancy rate when Day 5 and Day 6 were compared.

Conclusion: the vitrification of blastocyst is an efficient technique, with high survival rate, that allows the storage of the exceeding embryos with a high pregnancy rate in thawed cycles.

Key words: vitrification, blastocyst, cryopreservation

Correspondence to: anamarcia.cota@procriar.com.br

P20 - Outcomes of assisted hatching in women older than 35 years undergoing in vitro fertilization.

Ana Márcia de Miranda Cota, Alexon Melgaço Racilan, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral, Rívia Mara Lamaita, Ana Luísa Menezes Silva, João Pedro Junqueira Caetano

Clínica Pró-Criar / Mater Dei, BH – MG, Brasil

Abstract

Objective: To assess the impact of assisted hatching on the results of in vitro fertilization in women older than 35 years.

Methods: 232 cycles of in vitro fertilization in patients older than 35 years old were retrospectively evaluated. The patients were divided in 2 groups: assisted hatching group and control group.

Results: The mean age was similar in both groups ($38 \pm 2,12$ and $37,86 \pm 2,17$, assisted hatching group and the control group, respectively, $P = 0,58$). When compared to the control group, the patients who had done assisted hatching showed significantly less oocytes retrieved and metaphase II oocytes, and worse fertilization rate ($74\% \times 82\%$, $P=0,016$) and embryo freezing rate ($19\% \times 35\%$, $P = 0,007$). Besides this, the patients treated with assisted hatching had already done significantly more previous IVF cycles, and used more ampoules of gonadotropins. There were no statistical differences in implantation ($18\% \times 20\%$) and pregnancy rates ($37\% \times 41\%$) between both groups.

Conclusions: the patients who had the “assisted hatching” showed characteristics relating to the cycle of IVF indicating a worse prognosis for pregnancy, but even so, they obtained an implantation and pregnancy rate similar to the control group patients.

Key words: assisted hatching, in vitro fertilization, pregnancy

Correspondence to: anamarcia.cota@procriar.com.br

P21 - Efectividad de fertilización in vitro mediante inyección intracitoplasmática para pacientes con azoospermias obstructivas.

Ortega S., Martínez AR.
Instituto de Medicina Reproductiva. Mendoza, Argentina.

Introducción- objetivo: La ausencia total de espermatozoides en el semen (azoospermia) tiene una incidencia del 5% entre hombres infértiles. A su vez, las obstrucciones en el tracto eferente se calculan entre el 30-40% de los casos de azoospermias. Actualmente este tipo de infertilidad puede ser tratada por medio de la técnica de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) con espermias de origen testicular o del epidídimo. El objetivo de este estudio fue comparar la efectividad del ICSI con espermatozoides epididimarios en pacientes con azoospermias obstructivas respecto a un grupo control de pacientes normospermicos con esterilidad de causa tubaria.

Materiales y métodos: se compararon 2 grupos de pacientes infértiles: grupo A: 28 parejas con azoospermias obstructivas realizaron un total de 41 ciclos ($\bar{x} 1,4 \pm 0,7$) de ICSI con espermatozoides epididimarios; grupo B: 42 pacientes con factor tubario recibieron 51 ciclos ($\bar{x} 1,2 \pm 0,5$) de ICSI utilizando espermatozoides eyaculados. Los principales parámetros medidos fueron: porcentajes de fertilización, implantación, embarazo clínico y tasa de aborto.

Resultados: El porcentaje de fertilización fue del 71,9% y 77,9% para el grupo A y B respectivamente, con una tasa de implantación del 19% y 12,3%. La tasa de embarazo clínico fue del 36,6% y 29,4% por ciclo y de 35,7% y 30,9% por paciente, en los grupos A y B, respectivamente, presentando una tasa de abortos de 13,3 % en cada grupo. Ninguno de los parámetros evaluados presentó diferencias significativas.

Conclusión: Los resultados de la fertilización in vitro con inyección intracitoplasmática de espermatozoides epididimarios en el tratamiento de pacientes con azoospermias obstructivas son comparables a los obtenidos en ICSI con espermatozoides eyaculados en pacientes con factor tubario.

Palabras-clave: inyección intracitoplasmática de espermatozoides, espermatozoides epididimarios, azoospermias

Contacto: amartinez@imreproductiva.com

P22 - Viabilidad de embriones de ratón re-vitrificados sucesivamente.

María A. Masciangioli^{1, 2}, María Teresa Urbina¹,
Randolfo Medina¹

¹Unidad de Fertilidad, UNIFERTES, Clínica El Avila, Caracas, Venezuela

²Universidad Simon Bolívar, Caracas, Venezuela

Institución donde se realizó el trabajo: UNIFERTES, Clínica El Avila, Caracas,

RESUMEN

Objetivo: Los excelentes resultados obtenidos con vitrificación han permitido el desarrollo de nuevas estrategias en la FIV. El objetivo del presente trabajo es evaluar las tasas de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de embriones de ratón re-vitrificados sucesivamente.

Materiales y método: Para evaluar los efectos de la re-vitrificación de embriones, se estudió la viabilidad, el desarrollo y la formación de blastocistos en embriones de ratón luego de 3 vitrificaciones sucesivas, en estadios de 2, 4 y 8 células, respectivamente. Se utilizaron los kits RapidVit™ y RapidWarm™ Cleave de Vitrolife®, con la técnica del CryoLoop™. Las tasas de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de ratón que habían sido re-vitrificados tres veces se compararon con las tasas de embriones de ratón que sólo habían sido congelados una vez y con lo reportado en la literatura.

Resultados: Se obtuvieron tasas finales de supervivencia, de clivaje y de formación de blastocistos de 97,5%, 100% y 88,89 % respectivamente, en los embriones re-vitrificados.

Conclusión: Los resultados sugieren que la re-vitrificación de embriones es una técnica segura que se puede realizar sin afectar la supervivencia, el clivaje ni su desarrollo hasta blastocistos.

Palabras clave: Embrión, criopreservación, vitrificación, re-vitrificación, fecundación in vitro, FIV.

Contacto: maria.le.mn@gmail.com

P23 - Criopreservación en estadio de blastocisto: resultados por congelamiento lento y vitrificación

Inés Carretero¹, María Fernanda Urquiza¹, Mónica J Donaldson¹, Andréa G Alonso¹, R Agustín Pasqualini¹ y Carlos J Quintans²

¹Halitus Instituto Médico, Buenos Aires

²Fundación REPRO Buenos Aires
República Argentina

RESUMEN

Objetivo: Comparar los resultados obtenidos en un programa de fertilización *in vitro* con embriones que fueron criopreservados en estadio de blastocisto, ya sea mediante criopreservación lenta o bien por vitrificación.

Pacientes e Métodos: Se consideraron aquellos pacientes que durante los años 2009 y 2010 tuvieron ciclos de transferencia de embriones criopreservados en estadio de blastocisto. De nuestra base de datos se seleccionaron los ciclos que correspondían a las características mencionadas. Los resultados se analizaron con el programa Graph Pad InStat, mediante el test exacto de Fisher.

Resultados: Se registraron 133 ciclos que correspondían a transferencias de embriones criopreservados en estadio de blastocisto realizadas los años 2009 y 2010. De este total, 107 ciclos correspondían a blastocistos criopreservados por la técnica lenta (grL) y los restantes 26 fueron blastocistos vitrificados (grV). En el grL se descripseraron $3,28 \pm 1,18$ blastocistos por ciclo y en el grV $2,96 \pm 1,77$ siendo la media de blastocistos transferidos

de $2,35 \pm 0,90$ (grL) y $2,30 \pm 0,97$ (grV) respectivamente. La diferencia en la recuperación de blastocistos viables entre ambos grupos no resultó significativa ($P=0.4315$). En el grL se debieron suspender 11 transferencias (10,3%) mientras que en el grV 3 (11,5%) por falta de viabilidad de los embriones recuperados. En el grL se obtuvieron 39 (40,6%) embarazos clínicos y en el grV se lograron 13 (56,5%); la diferencia observada no resultó significativa ($P=0.2416$).

Conclusiones: La criopreservación lenta en estadio de blastocisto se emplea en nuestro centro con resultados satisfactorios. En los últimos dos años se comenzó a explorar las posibles ventajas de utilizar la vitrificación, para determinar si ésta justificaría el cambio del protocolo lento en uso. Si bien los resultados muestran una tendencia a ser mejores con la vitrificación, el número de casos estudiado no permite aún obtener conclusiones con validez estadística.

Palabras clave: blastocisto, vitrificación, criopreservación, enfriamiento lento

Contacto: ines.carretero@halitus.com

P24 - Pronósticos reproductivos al seleccionar espermatozoides utilizando la técnica "Physiologic ICSI" en pacientes con factor masculino severo.

Castillo Baso Jorge¹, Santos Haliscak Roberto¹, Galache Vega Pedro¹, Díaz Spindola Pablo¹, Sepúlveda González Jose¹, García Villafaña Genaro²

¹Médicos Ginecólogos Especialistas en Biología de la Reproducción

²Biologo especialista en Embriología humana

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana . IECH Monterrey, México

RESUMEN

Objetivo: Estos espermatozoides maduros tiene gran cantidad de receptores de ácido hialurónico y potencialmente pueden ofertar un mejor pronóstico reproductivo. El objetivo de nuestro estudio es el determinar si existen diferencias significativa al seleccionar los espermatozoides con la técnica PICSÍ vs ICSI en cuanto al pronóstico de los tratamientos de reproducción asistida; en pacientes con factor masculino severo.

Materiales y Métodos: Se realizó un ensayo clínico prospectivo de 256 ciclos consecutivos frescos aplicándose la técnica de PICSÍ de selección espermática a 40 pacientes y 216 se les realizó ICSI; posteriormente se realizó un análisis del pronóstico reproductivo al subdividir en brazos: pacientes con Kruger <4% y pacientes con Kruger >4%.

Resultados: Encontramos en el grupo de pacientes de >4% de Kruger; mayor cantidad de embriones en GI transferidos (47 %vs36%) y mayor cantidad de embriones en estadio de blastocisto transferidos (6 vs 1). Consecuentemente encontramos mejores porcentajes de embarazo (53% vs 40%) en este grupo aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. No encontramos beneficios claros de con la implementación de la técnica en pacientes con Kruger > 4%.

Conclusión: La técnica PICSÍ, parece ser una alternativa factible en casos con factor masculino severo a fin de

seleccionar el mejor espermatozoide.

Palabras-clave: espermatozoides, selección. ICSI

Contacto: castillobaso@hotmail.com

P25 - Utilização de corantes do tipo Diff-Quik para avaliação da integridade da cromatina espermática humana e sua relação com processamento seminal, taxas de fertilização, clivagem embrionária e gravidez.

Franco GRR ; Franco ACC
Embryolife - Instituto de Medicina Reprodutiva, São José dos Campos, SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: No presente estudo, os autores procuraram testar uma técnica simples e factível, a qual mensura a incidência de espermatozoides com cromatina íntegra numa amostra.

Material e método: Emprega kit de corante do tipo Diff-Quik, rotineiramente utilizado na análise da morfologia espermática, baseando-se na intensidade da pigmentação originada pelo corante na cabeça dos espermatozoides. Foram analisadas as possíveis relações entre a incidência de espermatozoides com cromatina fragmentada e a fertilização, clivagem e gravidez.

Resultados: Corroborando com trabalhos anteriores, relações significativas foram observadas nas taxas de fertilização e clivagem, obtendo-se o patamar de 30% como limite de espermatozoides com cromatina fragmentada na amostra.

Conclusão: Esta metodologia mostrou-se viável para ser empregada na rotina de laboratório, tornando rápida e barata a analogia de um parâmetro seminal de importância preditiva e sua plausível influência nos resultados de RHA.

Palavras-chave: Cromatina, Espermatozoide, Fertilização, Clivagem, Diff-Quik.

Correspondência: franco@embryolife.com

P26 - Effect of sperm cryopreservation on fertilization rate and embryo quality depending of fertilization procedure (IVF or ICSI).

Jose Juan Luna^{2,3}, Nicolás Garrido^{1,2}, Antonio Pellicer^{1,2}, Pedro Cuapio¹ y Marcos Meseguer^{1,2}

Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia, Spain

¹ Instituto Valenciano de Infertilidad, Mexico DF, México

² Instituto Valenciano de Infertilidad Valencia, Universidad de Valencia (IUIVI) Valencia, Spain

³ HISPAREP, México DF, México

ABSTRACT

Objective: To analyze the damage caused by the sperm cryopreservation technique on reproductive outcome by comparing freeze-thawed fertile sperm samples vs. fresh samples in an ovum donation program performing IVF and ICSI procedures in the same cohort of oocytes.

Design: Prospective cohort study.

Setting: University-affiliated private IVF setting.

Patients and methods: Prospective cohort study. University-affiliated private IVF setting. Couples undergoing oocyte donation sharing IVF and ICSI fertilization procedures in the same cycle, with frozen-thawed (n =51), or fresh sperm (n=61) from proven fertile men. Interventions: None. Main outcome measures: We compared the results obtained by using fresh or frozen-thawed sperm with fertilization rates and embryo quality parameters depending on IVF or ICSI, implantation and pregnancy outcome.

Results: Sperm freezing affected fertilization rate per cycle in a completely different ways, since in fresh samples fertilization rates are comparable or even better in IVF treatments (-0.68 % (SEM=2.63 NS), in comparison with frozen/thawed sperm where ICSI clearly exhibited a notable increase (14.77 % (SEM=4.47) p=0.001) . Meanwhile embryo parameters were quite similar between IVF and ICSI procedures when fresh sperm were used, embryo fragmentation experimented an increase associated with IVF, 48h embryos (8.7% vs 9.9% p=0.043), 72h embryos (10.86% vs 13.89% p=0.001) in frozen-thawed samples.

Conclusions: Sperm cryopreservation is negatively affecting its ability to fertilize during conventional IVF. The sperm selection performed by ICSI is overcoming this defect improving fertilization and embryo quality, obtaining comparable results in frozen or fresh sperm.

Key words: IVF/ICSI/ sperm cryopreservation / oocyte donation/ embryo quality/ male fertility.

Correspondence to: josejuanluna@hotmail.com

P27 - Effects of washed and autoclaved mineral oil overlay used during IVF bovine oocytes on steroid concentration and preimplantational embryo development.

Vireque AA¹, Watanabe YF², Resende LOT¹, Bernuci MP¹, Martins WP¹, Ferriani RA¹

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo

² Vitrogen Biotecnologia da Reprodução, Cravinhos - SP, Brazil

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

Introduction-objective: The toxic contamination produced by deterioration of mineral oil quality and extraction of steroids from the culture medium into the oil overlay has been associated with impaired in vitro development and freezability of oocytes and embryos. Alternatively, the use of washed and autoclaved oil with 0.9% saline may provide a useful tool to prevent toxic contaminants in commercial mineral oil, however its effect upon steroids extraction from the culture medium remains to be determined.

Material and methods: to compare the concentration of steroids in IVM droplets of cumulus-oocyte complexes (COCs) cultured under two types of oil overlay: washed and autoclaved mineral oil (WMO) or mineral oil in its commercial formulation (CMO) and to evaluate its influ-

ence on subsequent embryo development. Bovine COCs were cultured at a density of 1/10 μ L in TCM-199 supplemented with estradiol-17 β at 38.5 °C, 5% CO₂ and 100% humidity during 24 h. After fertilization, presumptive zygotes were co-cultured with cumulus cells until 224 h post-insemination (hpi). Media were collected before and after IVM, and stored at -20 °C. Estradiol (E2) and progesterone (P4) were determined by chemiluminescence method and embryo development was evaluated by cleavage, blastocyst and hatching rates at 168-224 hpi.

Results: E2 and P4 were dramatically reduced ($P < 0.01$) in both oil overlay. Remaining levels of E2 in IVM microdrops were significantly higher in WMO (313.03 ± 72.6 ng/mL) than CMO (123.5 ± 46.1 ng/mL) showing lower steroid absorption by WMO overlay ($P < 0.01$). Progesterone secreted by COCs was almost totally absorbed by mineral oil, irrespectively to the oil preparation. There were significantly lower hatching rates in WMO than CMO (71.4 % vs 94.4%, respectively; $p < 0.05$).

Conclusion: These results suggest that the use of hydrated mineral oil during IVM influences estradiol bioavailability and may be detrimental to in vitro embryo development.

Keywords: Reproductive techniques; Steroids; IVM; Mineral oil; preimplantational embryo development

Correspondence to: alessandra_vireque@yahoo.com.br

P28 - Evaluación de un sistema acumulativo de clasificación embrionaria para seleccionar los mejores embriones para transferir.

María Teresa Olivieri, Estrella Rosemberg, Sammy Bronfenmajer

EMBRIOS, Centro de Fertilidad y Reproducción Humana. Hospital de Clínicas Caracas, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Introducción: Con el objeto de disminuir el número de embriones a transferir, se han diseñado sistemas de clasificación embrionaria para seleccionar los embriones con mayor probabilidad de implantación. El objetivo de este trabajo fue evaluar un sistema acumulativo de clasificación embrionaria y su eficiencia para predecir el éxito de la Fecundación *in vitro* (FIV).

Materiales y Métodos: El grupo de estudio consistió en 257 ciclos consecutivos de FIV-ICSI, transferidos en D3. Se transfirieron 655 embriones evaluados usando un sistema acumulativo de clasificación embrionaria (SACE). Se analizó retrospectivamente la relación entre el criterio SACE y el criterio clásico de calidad embrionaria (SCC) con las tasas de embarazo e implantación.

Resultados: Cuando todos los embriones transferidos tienen puntaje SACE ≤ 18 las tasas de embarazo y de implantación son 0%. Cuando se transfiere por lo menos un embrión con puntaje SACE > 18 la tasa de embarazo es 47,2% y la de implantación es 24,9%. Al contrario, utilizando el criterio SCC, se observó una alta probabilidad de embarazo (35,7%) aún si no se transfirió ningún embrión Grado I o II. En pacientes ≤ 34 años no se observó un aumento en la tasa de embarazo al incrementar el número de embriones transferidos con SACE > 18 , mientras que en pacientes ≥ 35 años la tasa de embarazo aumentó significativamente al transferir más de 1 embrión con SACE > 18 y al transferir 3 embriones aumentaron tamb-

én las tasas de implantación y de embarazos múltiples.

Conclusiones: El criterio de puntajes acumulativos SACE permite seleccionar embriones con alta probabilidad de implantación, siendo más eficiente que el criterio clásico SCC. El criterio propuesto permite la transferencia electiva de 2 embriones con puntaje SACE > 18 en pacientes ≥ 35 años y de 1 embrión en pacientes ≤ 34 años, disminuyendo la tasa de embarazos múltiples sin afectar la tasa de éxito de los tratamientos.

Palabras-clave: clasificación embrionaria, FIV-ICSI, calidad embrionaria

Contacto: tereolivieri@gmail.com

P29 - Comparación de resultados de la transferencia de blastocistos desvitrificados en ciclo espontáneo y ciclo artificial.

Alicia Elías Escudero¹, Andrea Delgado Elias¹, Luis Noriega Portella¹. Jimmy Portella Ruiz².

¹Médico

²Biólogo

Grupo PRANOR de Reproducción Asistida. Lima, Perú

RESUMEN

Objetivos: Comparar retrospectivamente las tasas de embarazo, implantación y aborto en los ciclos con transferencia de blastocistos desvitrificados, usando dos métodos de preparación endometrial: ciclo espontáneo y ciclo artificial.

Material y métodos: Se evaluó retrospectivamente 55 ciclos de Transferencia de Blastocistos Desvitrificados (TBD) entre enero del 2010 y febrero del 2011. Las pacientes fueron preparadas para la TBD utilizando el ciclo espontáneo ($n = 16$ /Grupo A), con inducción de la ovulación utilizando Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) al encontrar un folículo dominante ≥ 18 mm, confirmando la ovulación con una ecografía posterior; y ciclo artificial ($n = 39$ /Grupo B) administrando Acetato de Leuprolide el día 21 del ciclo previo y tratamiento hormonal con Valerato de estradiol en un protocolo de dosis creciente.

Resultados: Las pacientes en ambos grupos tuvieron características clínicas similares. La tasa de implantación fue 23% en el grupo A y 21% en el grupo B (riesgo relativo [RR], 0.88; 95% intervalo de confianza [IC], 0.40-1.96; $p = 0.970$); la tasa de embarazo clínico fue de 44% en el grupo A y 36% en el grupo B (RR, 0.82; 95% IC 0.41-1.65; $p = 0.811$); y una tasa de aborto de 14% en el grupo A y 21% en el grupo B (RR, 1.50; 95% IC, 0.19-11.9; $p = 0.844$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de implantación, embarazo clínico y tasa de aborto, así como en las tasas de embarazo en curso y embarazo múltiple.

Conclusión: El presente estudio sugiere que tanto el ciclo espontáneo como el artificial en TBD tienen similares tasas de implantación, tasas de embarazo, y tasas de aborto. Debido a que el número de ciclos TED se está incrementando, es necesario realizar estudios prospectivos, al azar y controlados que evalúen la relación entre los protocolos de preparación endometrial y los resultados de embarazo, así como evaluar los costos y satisfacción de las pacientes.

Palabras-clave: blastocisto, desvitrificación, resultados.

Contacto: aliciaelias@fertilidadperu.com

P30 - Criopreservación de ovocitos supernumerarios.

Isabel Carrasco¹, Marina Ríos², René Salinas³, Rodrigo Enríquez³, Patricio Donoso³, Patricio González³

¹Bioquímico

²Biólogo

³Médico

Institución : Unidad de Medicina Reproductiva (UMR), Clínica Alemana de Santiago, Chile.

RESUMEN

Objetivo: La criopreservación de ovocitos representa una herramienta útil para preservar ovocitos supernumerarios luego de la estimulación ovárica controlada, evitando riesgos médicos y costos de un nuevo ciclo. Este trabajo da a conocer los primeros resultados de embarazo en nuestro país utilizando la metodología de congelamiento lento en parejas infértiles, en un centro donde no se realiza criopreservación de embriones ni selección de ellos para la transferencia al útero.

Material y método: Se criopreservaron todos los ovocitos maduros supernumerarios y luego de la descongelación se realizó la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) 2-3 horas post-incubación. La transferencia embrionaria tuvo lugar en día 2 ó 3 post-inyección. Un total de 1245 ovocitos fueron criopreservados correspondiente a 130 ciclos, y 408 ovocitos descongelados de 52 ciclos.

Resultados: Las tasas de sobrevivida, fecundación, implantación y embarazo clínico fueron de 44.9%, 73.1%, 10.5% y 19.2% respectivamente, con 5 recién nacidos vivos y 2 embarazos en curso. No se registró embarazo múltiple. La tasa acumulativa de embarazo clínico fue de 49.2%.

Conclusión: En nuestra experiencia, la criopreservación de ovocitos es una opción para evitar la eliminación de ovocitos sobrantes en centros donde la criopreservación de embriones no está permitida.

Palabras clave: criopreservación de ovocitos, congelamiento lento, sobrevivida ovocitaria, tasa de embarazo.

Contacto: icarrasco@alemana.cl

Genética e Biología Molecular

P31 - Polymorphisms A 1298C in 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a new marker for ovarian reserve?

Ciro Dresch Martinhago; Raphaela P Santos; Joji Ueno; Mariana Angelozzi de Oliveira; Luciana Francisco Semião; Ricardo M de Oliveira.
RDO – Medical Diagnosis, São Paulo, SP – Brazil

ABSTRACT

Purpose: To verify if the A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene is or not associated with a decrease of the ovarian reserve.

Methods: Samples of peripheral blood were obtained from 164 female patients and *MTHFR* genotypes were compared to the anti-mullerian hormone as well as FSH, LH and inhibin B.

Results: Samples were divided as follows; 84 samples of non-carriers for the A1298C polymorphism in the

MTHFR gene, e.g. 1298AA; 62 heterozygous 1298AC for the mutation; and 18 presented variation in homozygous form, e.g. 1298CC. The AMH mean value measured for 1298AA genotype was of 1,14 ng/mL; for the 1298AC genotype was of 0,91 ng/mL; and for the 1298CC genotype was of 1,49 ng/mL. A negative correlation between AMH and FSH, LH and the FSH/LH relationship was observed as expected. Inhibin B, on the other, presented a positive association with AMH, also as expected.

Conclusion: This study showed that by itself the A1298C polymorphism does not seem to affect AMH levels.

Key words: anti-mullerian hormone, FSH and LH, ovarian reserve, A1298C polymorphism MTHFR.

Correspondence to: ciro@rdo.med.br

P32 - Relación entre la morfología embrionaria y las aneuploidias cromosómicas detectadas por FISH.

Autores : Gazzo E, Vizcarra F, Noriega L & Escudero E

Grupo PRANOR de Reproducción Asistida, Lima, Perú.

RESUMEN

Introducción- objetivo: La morfología embrionaria es una de las pocas herramientas disponibles en los Laboratorios de Reproducción Asistida que permite la selección de los embriones a transferir. Sin embargo, actualmente, existe además la posibilidad de realizar diagnóstico genético preimplantacional (PGD), que nos informa de las aneuploidias del embrión. Este estudio compara la morfología embrionaria en día 5 con el resultado del PGD.

Material y método: Analizamos retrospectivamente, 247 ciclos en donde se realizó PGD por FISH a 1520 embriones en día 3. Se evaluó la morfología del embrión en día 5 y su resultado en el PGD.

Resultados: Dentro de la población de embriones que llegaron a blastocisto, en el día 5 (519) sólo un 39.1 % de ellos (203) tuvieron un diagnóstico genético normal. Cuando se analizó la población de embriones en estado de blastocisto que llegaron hasta la categoría de expandidos o eclosionando (184), sólo un 38.0% de ellos (70) tuvieron un diagnóstico genético normal. Del total de embriones biopsiados (1520) el 65.8% de ellos no llegó a blastular y dentro de este grupo, sólo un 13.6% fueron genéticamente sanos.

Conclusión: Los resultados muestran que la morfología del embrión en el día 5 de cultivo no sería una herramienta útil para predecir que el embrión tenga una carga genética normal, puesto que sólo el 38% de los blastocistos, era sano. Sin embargo, es de mejor pronóstico llegar a blastocisto, puesto que presenta mejores resultados que cuando el embrión se queda en etapas previas de clivaje. La posibilidad de utilizar el diagnóstico genético preimplantacional de manera rutinaria en los Laboratorios de Reproducción Asistida, podría mejorar los resultados de un programa de reproducción Asistida.

Palabras-clave: Reproducción Asistida, blastocisto, diagnóstico genético preimplantacional

Contacto: egazzo@fertilidadperu.com

P33 - Diagnostico genetico preimplantacional, por hibridación

genômica comparada (aCGH), en un programa de reproducción asistida: primeros 6 casos.

Gazzo E, Catanzaro G, Noriega L & Sepúlveda S.

Grupo Pranor de Reproducción Asistida, Lima, Perú.

RESUMEN

Introducción-objetivo: El diagnóstico genético preimplantacional por hibridación genómica comparada (aCGH) se ve como una importante herramienta para la detección de aneuploidías en embriones humanos, pudiendo examinar los 24 tipos de cromosoma antes de ser transferido, lo cual podría aumentar la posibilidad de obtener un embarazo. El CGH, permite hacer un análisis citogenético completo de todo el cariotipo. Se basa en establecer una hibridación competitiva entre un DNA control con cariotipo 46, XY y un DNA problema, en proporción 1:1 y marcados con fluorocromos, sobre metafases de linfocitos euploides. En este trabajo se muestra la experiencia preliminar realizando aCGH a pacientes del programa de diagnóstico genético preimplantacional.

Material y método: Se reportan 6 casos realizados, entre Octubre de 2010 y Febrero de 2011. En todos ellos la biopsia del trofoectodermo se realizó en blastocistos expandidos en día 5 o 6 y posteriormente fueron vitrificados hasta recibir el resultado del aCGH.

Resultados: La transferencia se realizó en un ciclo diferente en 4 de los 6 ciclos iniciados, logrando 3 embarazos.

Conclusión: Creemos importante poder contar con esta técnica de diagnóstico genético más extensa, la cual podría permitir un aumento de la tasa de embarazo y una disminución de la tasa de aborto.

Palabras clave: diagnóstico genético preimplantacional, hibridación genómica comparada, experiencia preliminar.

Contacto: egazzo@fertilidadperu.com

PSICOLOGIA E ACONSELHAMENTO

P34 - Atendimento a casais inférteis: integração entre medicina e psicologia

Helena Prado Lopes

Instituição: Instituto de Ginecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

Objetivo: Este estudo examina o processo de enfrentamento de homens e mulheres inférteis durante investigação diagnóstica e tratamento da infertilidade conjugal, realizado no ambulatório de reprodução assistida num hospital público.

Material e método: A presente análise discute os resultados de uma pesquisa qualitativa cujo objetivo é enfatizar a importância da integração dos aspectos médicos e psicológicos no atendimento aos casais inférteis. Para a coleta de dados, utiliza-se a entrevista psicológica semi-dirigida. Esse recurso promove uma escuta diferenciada dos aspectos emocionais vivenciados pelos pacientes, permitindo maior reflexão aos casais sobre suas dificuldades diante do processo de investigação e tratamento de infertilidade. **Resultados:** A partir dos dados, verifica-se que, além do tratamento médico, os pacientes necessi-

tam de uma intervenção psicológica centrada nas repercussões emocionais vivenciadas por eles durante todo o processo. Dada à complexidade do processo de reprodução assistida, é essencial considerar tanto os fatores médicos, imprescindíveis para se atingir a concepção do filho biológico, quanto os fatores psicológicos, nos níveis individual, conjugal e social.

Conclusão: a dimensão médica integrada à psicológica auxilia esses pacientes a potencializar seus recursos e a buscar meios mais adaptativos para minimizar os possíveis dilemas e a ansiedade vividos durante o processo.

Correspondência: helenaprado@globo.com

FERTILIDADE MASCULINA E PESQUISA BÁSICA

P35 - Anticuerpos antiespermatozoides en mujeres cuya pareja masculina presenta un factor inmunológico.

Molina Rosa, Estofán Gustavo, Kuperman Natalio, Beltramone Fernando, Palena Celina, Estofán Daniel

Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR), Córdoba, Argentina

RESUMEN

Introducción: Altos títulos de anticuerpos antiespermatozoides (ASAs) en la mujer afectaría la migración espermática por el tracto reproductor femenino y la fertilización del ovocito. Hay varias teorías relacionadas a la etiopatogenia de la inmunoinfertilidad femenina, una más reciente propuesta por Clarke (2009), sería que, el sistema inmune de la mujer responde frente a repetidas exposiciones contra esos ASAs produciendo anticuerpos antiidiotipos potenciando así la respuesta inmune a los espermatozoides.

Objetivo: Determinar la presencia de ASAs en mujeres que consultaban por fertilidad y cuyos maridos presentaban anticuerpos unidos a sus espermatozoides.

Materiales y Métodos: Estudio Prospectivo de Cohorte. Se investigó ASAs en suero a 28 mujeres voluntarias con esposos ASAs positivos y en 6 mujeres cuyas parejas presentaban un Mar Test negativo. Para la determinación se utilizó como antígeno (Ag) un pool de espermatozoides sin ASAs seleccionados por Swim Up y estos espermatozoides fueron incubados con el suero de las mujeres en estudio. La valoración de ASAs se realizó con un kit comercial "Sperm Mar Test IgG Anti-Sperm Antibody Test" (FertiPro)

Resultados: El 21% de las mujeres (6/28) presentaron una fuerte respuesta inmunológica (> 40%) y el 36% (10/24) una respuesta leve (10 – 40%). Si sumamos ambas respuestas obtenemos que el 57% de las mujeres presentan ASAs positivos.

Conclusión: Estos resultados podrían avalar la teoría de Clarke en la cual espermatozoides con ASAs producirían una respuesta inmune en la mujer. Debido a la alta incidencia de ASAs encontrada en este grupo de pacientes, podemos concluir que se debería investigar de rutina la presencia ASAs en mujeres cuyas parejas masculinas presenten un factor inmunológico. Estos ASAs podrían ser una causa más que impactaría negativamente en la fertilidad de la pareja.

Palabras Claves: Anticuerpos antiespermatozoides, Factor inmunológico, Infertilidad.

Contacto: info@lablar.com

P36 - Comparação da motilidade e morfologia espermática em grupos com diferentes concentrações totais de espermatozoides.

Autores: Iara Viana ^{1,3}, Danielle Araújo ³, Marjorie Mota ^{2,3}, Marcelo Rocha ^{4,3}, Marcelo Cavalcante ³ e Marcelo Gondim Rocha ^{3,4}

¹Universidade Estadual do Ceará

²Universidade Federal do Ceará

³Centro de Reprodução Assistida do Ceará, Brasil

⁴Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Instituição onde foi realizado o trabalho: Centro de Reprodução Assistida do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

RESUMO

Introdução: O fator masculino está envolvido em 50% dos casos de infertilidade conjugal, por isso, uma avaliação inicial minuciosa deve ser realizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a motilidade e morfologia espermática entre grupos com diferentes concentrações totais de espermatozoides submetidos à análise seminal.

Material e método: As amostras foram avaliadas segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), para analisar concentração total, motilidade espermática e o critério de Krüger para morfologia espermática. Os grupos foram divididos com relação às diferentes concentrações totais de espermatozoides: Grupo 1 (0,1 a 4 x 10⁶ milhões), Grupo 2 (5 a 9 x 10⁶ milhões), Grupo 3 (10 a 19 x 10⁶ milhões), Grupo 4 (20 a 99 x 10⁶ milhões) e Grupo 5 (>100 x 10⁶ milhões).

Resultados: Na motilidade inicial não há diferenças significativas entre os grupos 1, 2 e 3; os grupos 3 e 4 também não diferem entre si e o grupo 5 apresentou valores significativamente maiores que os demais grupos. Avaliando-se a motilidade pós-capacitação, o grupo 1 apresentou valores significativamente menores que os demais; não há diferenças significativas entre os grupos 2 e 3, assim como entre os grupos 3 e 4 e o grupo 5 apresentou valores significativamente maiores que os demais. A análise da média da morfologia normal entre os grupos permite afirmar que os grupos 1 e 2 não diferem significativamente; assim como os grupos 3 e 4 que não diferem entre si, mas são significativamente maiores que os grupos 1 e 2; e o grupo 5 tem valores significativamente maiores que os demais.

Conclusão: pacientes com concentrações totais de espermatozoides maiores que 20 x 10⁶ milhões possuem valores significativamente melhores de motilidade inicial, pós-capacitação e morfologia. Estes fatores são relevantes para uma melhor taxa de fertilização e de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Sêmen, Concentração, Motilidade e Morfologia.

Correspondência: conceptus@clinicaconceptus.com.br

P37 - Estudio de los parámetros seminales y la fragmentación del ADN espermático en hombres con sobrepeso y obesidad.

Shalom Valerie¹, Olivieri María Teresa¹, Rosemberg Estrella¹, Bronfenmayer Sammy².

¹ Bióloga,

² Médico

EMBRIOS Centro de Fertilidad y Reproducción Humana. Hospital de Clínicas Caracas, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Introducción: Se ha sugerido que la obesidad podría tener un efecto perjudicial sobre la calidad seminal y la integridad del ADN espermático. Este estudio tiene como objetivo analizar si la obesidad altera la función reproductiva del hombre.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio prospectivo en 86 hombres divididos en donantes de semen fértiles y hombres de parejas infértiles (PI). Cada grupo fue dividido según su índice de masa corporal (IMC), peso normal $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$, sobrepeso $IMC 25-30 \text{ kg/m}^2$, obesidad $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Grupo I, donantes de semen con peso normal (n=16), Grupo II donantes de semen con sobrepeso (n=14), Grupo III hombres de PI con sobrepeso (n=18) y Grupo IV hombres de PI con obesidad (n=38). Los hombres fueron pesados y medidos. Se realizó el análisis seminal y se evaluó la fragmentación del ADN espermático con el kit Halosperm®. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianzas (ANOVA) y comparación de medias con t de Student.

Resultados: Se encontró que los hombres con sobrepeso y obesidad presentaban menor concentración espermática que los donantes de peso normal y con sobrepeso (III: $23.7 \times 10^6 \pm 27.3$; IV: $27.9 \times 10^6 \pm 24.6$; I: $57.1 \times 10^6 \pm 28.7$; II: $63.7 \times 10^6 \pm 35.7$ /mL) y lo mismo se observó con la movilidad (III: 52.8%; IV: 55.6%; I: 74.4%; II: 65.4%). Los donantes de peso normal presentaron una movilidad mayor, que los donantes con sobrepeso. La morfología no presentó diferencias entre los grupos. El porcentaje de fragmentación del ADN espermático fue mayor en hombres con sobrepeso y obesidad en comparación con los donantes de peso normal y con sobrepeso (III: 29.24%; IV: 36.09%; I: 10.40%; II: 15.71%). Los donantes de peso normal presentaron menor porcentaje de fragmentación que los donantes con sobrepeso.

Conclusiones: En conclusión, altos niveles de índice de masa corporal están asociados a una disminución en la movilidad espermática y a un aumento de la fragmentación del ADN espermático.

Palabras claves: Obesidad, Infertilidad, Fragmentación de ADN espermático, Espermatograma.

Contacto: valeries86@gmail.com

P38 - Efectos del sildenafil sobre la motilidad espermática en pacientes con astenozoospermia.

Felipe Arturo Morales Martínez^{1,5}, Martha Merino Ruiz¹, Eddy Efrén Angulo Velarde², Hilda Magdalena Luna Aranda³, Geraldina Guerrero González¹ y Luis H. Sordia Hernández¹

¹Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario, U.A.N.L. Monterrey NL, México.

² Biología de la Reproducción Humana del Hospital Universitario, U.A.N.L.

³Químico de laboratorio de Biología de la Reproducción

Centro Universitario de Medicina Reproductiva del Departamento de Ginecología y Obstetricia

del Hospital Universitario, U.A.N.L. Monterrey NL, México.

RESUMEN

Introducción-objetivo: Existe un reducido número de publicaciones con respecto a los efectos del sildenafil sobre la motilidad espermática, la mayoría en varones sanos cuyos resultados son controversiales. Este estudio busca determinar los efectos del sildenafil sobre la motilidad espermática en pacientes con astenozoospermia.

Métodos: Participaron 32 varones de Julio de 2008 a Agosto 2009. Se analizaron 4 muestras de semen: la primera (M1) y la segunda (M2) denominadas basales, fueron colectadas en diferentes fechas y sirvieron para evidenciar el diagnóstico. La tercera muestra (M3) fue obtenida 1 hora después de la segunda con la finalidad de observar un probable efecto benéfico tanto en cuenta como en motilidad y la cuarta (M4) fue colectada en una fecha diferente, una hora después de la administración de 100 mg de sildenafil con el objetivo de determinar un efecto de mejora en la motilidad de los espermatozoides. **Resultados:** El promedio de % de espermatozoides móviles en las muestras fue de 28.7% (M2), 31.0% (M3) y 30.1% (M4) post-sildenafil no mostrando diferencia significativa. La motilidad total (% de móviles a+b x cuenta total x volumen) fue de 43.6% (M2), 44.0% (M3) y 56.6% (M4), que muestran una tendencia a la mejora aún cuando no es significativa. Al revisar las muestras apareadas M2 y M4 (post-sildenafil) encontramos que la motilidad total mejoró en 15 casos (46.8%).

Conclusiones: Encontramos una tendencia a mejorar la motilidad de varones con astenozoospermia que recibieron Sildenafil por vía oral una hora previa a la eyaculación pero no así en muestras colectadas con una hora de diferencia.

Palabras clave: sildenafil, motilidad espermática, astenozoospermia.

Contacto: drfammm@yahoo.com

ENDOMETRIOSE E PESQUISA BÁSICA

P39 - Marcadores de estresse oxidativo no fluido folicular de mulheres inférteis com e sem endometriose: estudo piloto.

Michele Gomes Da Broi¹, Aline Zyman de Andrade¹, Jhenifer Kliemchen Rodrigues¹, Rui Alberto Ferriani¹, Alceu Afonso Jordão Junior², Paula Andrea Navarro¹

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto (SP), Brasil

²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto - SP, Brasil

Setor de Reprodução Humana, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Fonte de Auxílio: FAPESP (Processo 2008/58197-6), CNPq (Processo 474858/2009-0) e Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia - INCT/CNPq - Hormônios e Saúde da Mulher

RESUMO

Introdução: o estresse oxidativo (EO) no microambiente folicular pode promover anormalidades meióticas oocitárias e estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à endometriose. O objetivo deste estudo foi comparar os níveis de cinco marcadores de EO (total de hidroperóxidos, malondialdeído (MDA), produtos avançados de oxidação protéica (AOPPs), glutatona (GSH) e vitamina E) no fluido folicular (FF) de pacientes inférteis com endometriose e fator tubário e/ou masculino de infertilidade. **Materiais e métodos:** incluiu-se consecutivamente 127 pacientes submetidas à estimulação ovariana para realização de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (54 com endometriose e 73 controles). No dia da coleta dos oócitos, amostras de FF do primeiro folículo aspirado (diâmetro \geq 15 mm) de cada paciente, livres de contaminação sanguínea, foram obtidas de 78 mulheres (2 com endometriose sem estadiamento, 19 com endometriose graus I/II, 9 com endometriose graus III/IV e 48 controles). Os marcadores de EO foram mensurados por espectrofotometria (total de hidroperóxidos, MDA, AOPPs e GSH) e por cromatografia líquida de alta eficiência (vitamina E).]

Resultados: encontrou-se maiores níveis de glutatona e menores níveis de hidroperóxidos no FF de pacientes com endometriose e endometriose I/II quando comparadas às controles. Não houve diferença entre os grupos endometriose e controle com relação aos demais marcadores.

Conclusões: as alterações encontradas no FF de pacientes inférteis com endometriose sugerem presença de EO neste microambiente reprodutivo, o que pode estar envolvido na etiopatogênese da infertilidade relacionada à doença. Estudos com maiores casuísticas são necessários para avaliar melhor o papel do EO na progressão da endometriose.

Palavras-chave: endometriose; estresse oxidativo; fluido folicular; infertilidade feminina; reprodução assistida.

Correspondência: michi.dabroi@gmail.com

TRA STEM CELLS

P40 - O papel das células-tronco mesenquimais de trompa de Falópio na regeneração óssea in vivo em modelo animal.

Jazedje, Tatiana¹; Bueno, Daniela F¹; Czeresnia, Carlos E²; Perin, Paulo M³; Maluf, Mariangela³; Zatz, Mayana, ¹Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo, SP, Brasil

²Célula Mater, São Paulo, Brasil

³Centro Especializado em Reprodução Humana, São Paulo, Brazil

RESUMO

Introdução-Objetivo. Recentemente demonstramos que as trompas de falópio humanas são uma fonte rica de células-tronco mesenquimais que apresentam uma capacidade acentuada para a diferenciação osteogênica in vitro. Como o osso é um tecido de remodelação constante, é possível que as células-tronco desempenhem um papel importante neste processo e sejam a chave para o desenvolvimento de novos tratamentos contra a osteoporose ou outras doenças ósseas. Considerando que as Células Tronco Mesenquimais de Trompas de Falópio (CTMTF) possuem excelente potencial osteogênico in vitro, nosso objetivo foi avaliar a capacidade das CTMTF na regeneração óssea in

vivo, quando xenotransplantadas em ratos não-imunossuprimidos (RNI) com defeitos cranianos.

Materiais e Métodos. As CTMTF foram caracterizadas por citometria de fluxo e avaliadas para a capacidade de multi-diferenciação in vitro (diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica). Dois defeitos simétricos em cada região parietal de sete ratos foram realizados. O lado esquerdo (LE) de seis animais foi coberto com biomaterial CellCeram (Scaffdex) apenas, e do lado direito (LD) com o CellCeram e CTMTF (10⁶ células / biomaterial). Os animais foram sacrificados aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório e amostras de tecidos cranianos foram analisadas histologicamente.

Resultados. Após 90 dias, observou-se formação de osso em ambos os lados. No entanto, nos animais sacrificados 30 e 60 dias após o procedimento, observou-se osso maduro apenas do lado direito, local no qual as células-tronco foram colocadas. A presença de DNA humano foi comprovada por reação em cadeia da polimerase e imunofluorescência. As células humanas não foram rejeitadas, confirmando a propriedade imunomodulatória das células-tronco utilizadas.

Conclusão. As CTMTF melhoraram ou aceleraram a regeneração óssea in vivo, podendo ser uma nova opção para futuros tratamentos da osteoporose ou outras doenças ósseas.

Palavras-chave: trompa de Falópio, célula-tronco mesenquimal, regeneração óssea, osteoporose, medicina regenerativa

Correspondência: tatiana@ib.usp.br

TRA PESQUISA BÁSICA

P41 - Effects of androgen substrate on bovine cumulus-oocyte complexes steroidogenesis during IVM.

Autores: Bulgarelli DL, Vireque AA, Bernuci MP, Pitangui CP, Sá MFS, Rosa e Silva ACJS

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

Objective: Ovarian steroids are known as important factors on the route of oocytes development. Since serum-supplemented *in vitro* maturation (IVM) media decreases estradiol secretion by bovine cumulus-oocyte complexes (COCs), the aim of this study was to assess whether this effect is caused by deficiency of substrate or by low cumulus cells aromatase activity.

Material and methods: Bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) aspirated from 2 to 8 mm follicles of slaughterhouse ovaries, were matured in (1) TCM199 in the presence of 10% FBS, 20 µg/mL FSH, 0.5 µg/mL LH (40 COCs in each treatment/replicate), or (2) as 1 but with the addition of 100 nmol/L androstenedione (A4) for 22 h at 39 degrees C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After maturation, with or without COCs medium were collected and analyzed for its content of estradiol-17β and (E2) and progesterone (P4) by chemiluminescence method.

Results: The E2 content of culture medium increased markedly (P<0.0001) after incubation of COCs with TCM+A4 compared to TCM (17.52 ± 1.86 ng/mL; 0.32

± 0.05 ng/mL, respectively). No significant difference in the P4 content (P = 0,4088) was detected into the IVM medium despite the presence of A4 (21.73 ± 1.67 ng/mL to TCM; 21,83 ± 1.61 ng/mL to TCM+A4).

Conclusion: Our results suggest that decreased estradiol production by COCs in serum-supplemented IVM media is caused by deficiency of substrate rather than low cumulus cells aromatase activity.

Key words: Cumulus-oocyte complex; Steroidogenesis; Serum; Androgen.

Correspondence to: daialbulga@gmail.com

ÉTICA E LEI

P42 - Análisis jurídico de los derechos del embrión en México.

Fernando Manuel Talamantes Ferreira.¹, Alma Belén Aguilar Hernández². Marino Miguel González Cervantes³.

¹Abogado

²Embriologista

³Médico

Institución: GyRA. . E. Unidos Mexicanos, en la Heroica Puebla de Zaragoza.

RESUMEN

Objetivo: Con soporte en la existencia de las lagunas legales existentes hasta el momento, en el presente libelo se analizan y valoran cuáles son los derechos no legitimados del producto no nacido concebido a través de la Reproducción Asistida; de vital importancia, debido a que la Persona *per se* es la columna vertebral del Derecho Civil Así mismo se llega a la definición del momento de la concepción y con ello ahondar en los derechos del embrión

Método: Es obligatorio analizar los derechos jurídicos inherentes no tutelados por la legislación mexicana en beneficio de los embriones concebidos en los laboratorios de Reproducción In Vitro utilizados en los procedimientos de Reproducción Asistida en nuestra Nación, toda vez que la falta de una legislación da pauta a prácticas en ocasiones indebidas tanto de los futuros padres como de los Centros de Reproducción Asistida.

Conclusión: Concluyendo el embrión está protegido por la legislación civil mexicana, aunque por el momento no exista una legislación en la materia en el país, es fundamental el generar en las parejas contratantes de este servicio - Cónyuges o Concubinos-, la conciencia de que no pueden abandonar el o los embriones y así evitar en los Centros de Reproducción Asistida la sobrepoblación de los mismos.

Palabras-clave: Reproducción Asistida, legislación, Derecho Civil, México.

Contacto: talamantesabogado@gmail.com

ENDOCRINOLOGIA

P43 - Predictive factors of metabolic syndrome in adults and adolescents with polycystic ovary syndrome

Daiana Cristina Chielli Pedroso, Carolina Sales Vieira, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva ,

Adriana Lúcia Carolo, Anderson Sanches Melo e Rosana Maria dos Reis

Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Objectives: Compare clinical and metabolic parameters, as well as predictors of metabolic syndrome (MS), in adolescent and adult women with polycystic ovary syndrome (PCOS).

Methods: A Cross-sectional study was conducted in Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. A total of 147 women with PCOS were divided into 2 groups: 42 adolescents and 105 adults. Anthropometric measurements, blood samples and pelvic ultrasound exams were made to assessment of the prevalence of MS and its components. Furthermore, the predictors of MS in women with PCOS were evaluated by multivariate analysis.

Results: The prevalence of increased diastolic blood pressure and changes in the lipid panel was greater in adult women than in adolescents ($p < 0.02$). The prevalence of MS was greater in adult women than in adolescents (49.5% vs. 23.8%, $p = 0.01$). In adult women, insulin levels and body mass index (BMI) were independent predictors of MS incidence ($p < 0.01$), but in adolescents, only BMI was found to be an independent predictor of MS ($p < 0.03$).

Conclusions: The insulin levels and BMI were independent predictors of MS in the adult women with PCOS, however, for adolescents, only the BMI was independent predictor of MS, emphasizing the need to monitor these patients from adolescence to prevent metabolic complications.

Key words: Polycystic ovary syndrome, adolescent, insulin, obesity, metabolic syndrome

Correspondência: daia.pedroso@hotmail.com

CIRURGIA REPRODUTIVA

P44 - Diseño y uso del Batts (DIU) como profilaxis de las adherencias intrauterina en una clínica de Santa Cruz de la Sierra - Bolivia desde 1995-2010.

Juan Carlos Montalvo Doria Medina y Henry Fulguera Villanueva

Institución: Clínica Bioginecologica Montalvo, Santa Cruz - Bolivia

RESUMEN

Introducción: Objetivo: Las sinequias intrauterinas desde su primera descripción clínica en 1927 por Fritsch permanecen aun siendo en nuestros días motivo de investigación. El tratamiento es una de las áreas que actualmente es de interés colectivo, principalmente el relacionado al tratamiento de la prevención de las recidivas de las adherencias intrauterinas.

Material y metodo: El presente trabajo comparte sobre la experiencia de 15 años en el uso de una nueva alternativa terapéutica en la protección de la cavidad intrauterina con un dispositivo de silicona laminado denominado como BATTs. La ventaja principal de este dispositivo es que su diseño anatómico protege la totalidad de la cavidad intrauterina incluido áreas vitales como el OCI, fundus y ostium, con lo que el riesgo de recidiva de sinequia es nula.

Conclusión: Los años de experiencia en el uso de este dispositivo y el numero de usuarias permite concluir que el BATTs es completamente inocuo para la paciente; tiene efectos secundarios muy leves y de fácil manejo; la técnica de colocado y extracción es sencilla; la protección de la cavidad endometrial en los casos observados es del 100%. Por lo tanto consideramos que el BATTs en relación con otros métodos de barrera como la T de cobre, la sonda Foley o el acido hialurónico podría tener mejores resultados: anatómico, fisiológico y obstétrico. Los mismos requieren ser replicados en estudios posteriores. **Palabras-clave:** sinequias intrauterinas, prevención, dispositivo de silicona

Contacto: jcndm@cotas.com.bo

P45 - Essure® como tratamiento del hidrosálpinx antes de técnicas de reproducción asistida.

Jorge Lerner¹, José Florencio Jiménez¹, María Eugenia Zeppenfeldt¹, Javier Rodríguez Kovacs¹ y Carlos Ramírez²

Médico

Anestesiólogo

UNIFERTES Unidad de Reproducción Asistida.

Clínica El Ávila. Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Objetivo: Describir el ESSURE® como tratamiento para hidrosálpinx y los resultados de un tratamiento posterior con TRA en cuanto a tasa de embarazo en curso, recién nacido vivo en casa y abortos. Los pacientes con hidrosálpinx tienen tasas de embarazo significativamente más bajas de FIV-TE en comparación con pacientes sin hidrosálpinx, con una probabilidad reducida de implantación de hasta un 50% y un mayor riesgo, de hasta el doble, de aborto espontáneo.

Materiales y Métodos: Se incluyeron las histeroscopias realizadas desde junio 2009 a diciembre 2010 para tratamiento del hidrosálpinx, realizadas por vaginohisteroscopia.

Resultados: Se colocó ESSURE® a 25 pacientes con Hidrosálpinx, la mayoría unilaterales (15 pacientes). Edad promedio: 35 años. Durante la histeroscopia se encontró: ningún hallazgo 72%, pólipos 16%, miomas 4%, sinequias 4% y útero tabicado 4%. El promedio de N° de anillos visibles en el lado derecho fue de 2 con un mínimo de 0 y un máximo de 9 y en el lado izquierdo un promedio de 2 con un mínimo de 0 y un máximo de 7. La duración promedio: 7 minutos con un mínimo de 4 y un máximo de 15 minutos. De los 8 pacientes sin anestesia, 7 con buena tolerancia y 1 toleró regular. Ningún caso ameritó dilatación cervical. El 80% no presentó complicaciones. En 2 pacientes el Essure® se encontró fuera de cavidad, en 1 paciente intracavitaria, 1 paciente absceso tubo-ovárico unilateral y en 1 paciente falsa vía. 13 pacientes se sometieron a procedimientos de Reproducción Asistida, 7 (53.84%) con prueba positiva de embarazo; de las cuales 4 (30.76%) con embarazo en curso; 2 (15.38%) embarazo bioquímico y 1 (7.69%) aborto.

Conclusiones: Nuestra casuística, aunque pequeña, es la más grande publicada en Latinoamérica y el mundo, con resultados equivalentes a trabajos publicados. Este tipo de procedimiento debería realizarse en toda paciente con hidrosálpinx, con contraindicación de cirugía o sin ella, debido a que es seguro, fácil, tolerable y rápido, sin afectación de la circulación ovárica.

Palabras clave: ESSURE®, hidrosálpinx, histeroscopia.

Contacto: orgelerner69@hotmail.com



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



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
TURISMO

Praxis
FEIRAS E CONGRESSOS

48 3028.5154 - 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.sgionline.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**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>**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**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

Florianópolis – SC

<http://www.sbu2011.com.br/>

14th World Congress on Human Reproduction

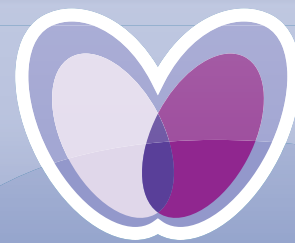
Dates: November 30-December 3, 2011

Location: Melbourne, AUSTRALIA

For More Information: <http://www.humanreproduction2011.com>

NOVIDADE!

Seu novo ambiente de Atualização,
Consulta e Debate Científico



Portal da
Fertilidade



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

Elaborados por renomados especialistas
em Reprodução Assistida.

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

Apoio



Participe!

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



Fertilidade.



A vida é uma obra de arte.

Merck Serono

SAC Merck Serono: 0800.113320

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.

