

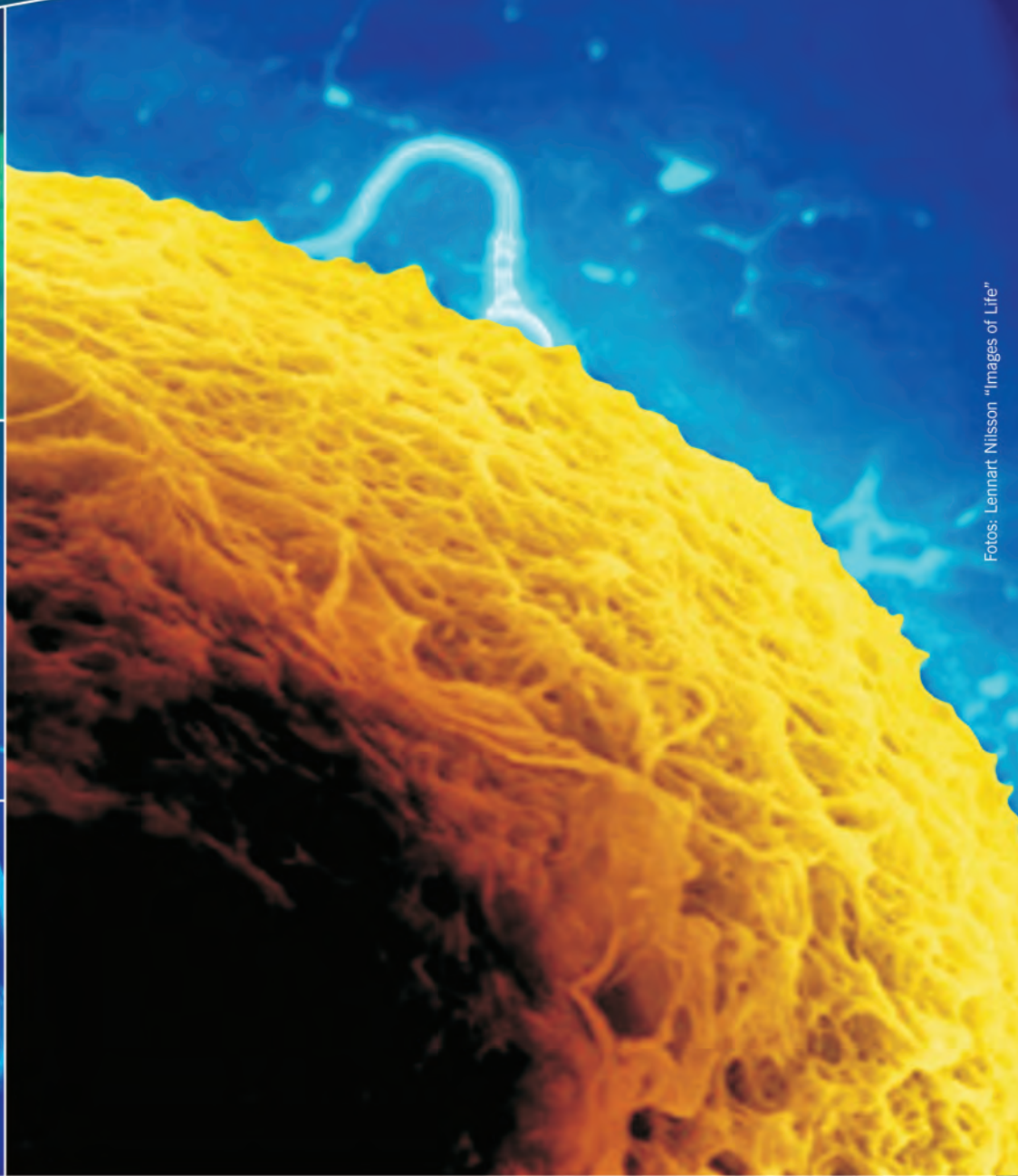
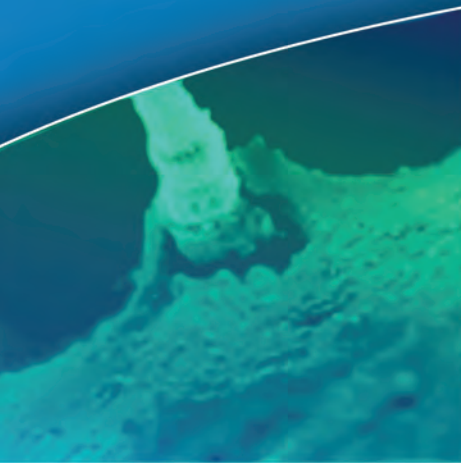
Volume 15
Number 4
Jul-Aug 2011
ISSN 1517-5693

JBRA

Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

*Veja a
obra de arte
que fizemos
juntos.*



Fertilidade.

Você. Nós. Somos os pais da fertilidade

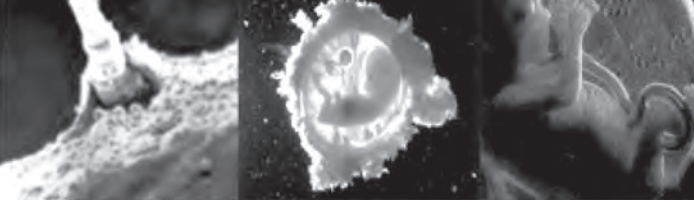
Merck Serono

SAC Merck Serono: **0800.113320**

Anúncio veiculado em Maio de 2011.

Merck Serono é uma divisão da Merck.





JBRA

Assisted Reproduction

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

ISSN: 1517-5693 - V. 15 | nº4 | Jul-Aug / 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 (ARQ / PUCMG Brasil)

Consultor Editorial - Editorial Consultant

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

Editores Associados – Associate Editors

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

João Batista A Oliveira (CRH SP Brasil)

Selmo Geber (Origen / UFMG Brasil)

Weydson Barros Leal (UFPE Brasil)

CONSULTORES CIENTÍFICOS –

Scientific Reviewers

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

Agnaldo Lopes da Silva Filho (UFMG Brasil)

Alessandro Schuffner (Conceber PR Brasil)

Álvaro Petracco (Fertilitat/ PUC RS Brasil)

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

Anne R Greenlee (OHSU EUA)

Antonio Requena (IVI Madrid Espanha)

Aroldo Camargos (UFMG Brasil)

Bela Zausner (Gênese BA Brasil)

Bruno Scheffer (IBRRA MG Brasil)

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

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

Cesar Cafatti (Clin Los Dominicos Chile)

Claudia Borrero (Conceptum Colombia)

Claudia G Petersen (CRH SP Brasil)

Cláudio Chillik (CEGYR Argentina)

Condesmar Marcondes Filho (Nucl Santista
RH SP Brasil)

David Vantman (CER Chile)

Dirceu H Mendes Pereira (Profert SP Brasil)

Eduardo Pandolfi Passos (SEGIR / UFRGS RS Brasil)

Ernesto Gallardo Lozano (IMER México)

Fabio Firmbach Pasqualotto (Conception /
UCS RS Brasil)

Fernando Zegers-Hochschild (Clin Las Condes Chile)

Francisco Riquez (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 (Cenaferf 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 (IBBRA/Universidade
FUMEC BH Brasil)

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

Paulo Serafini (Huntington/ USP SP Brasil)

Ricardo Melo Marinho (FCMMG MG Brasil)

Roberta Wonchockier (Projeto Alfa SP Brasil)

Roberto Coco (Fecunditas Argentina)

Rose Marie M Melamed (Fertility SP Brasil)

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

Silvana Chedid Chedid-Grieco (SP Brasil)

Sergio Reis Soares (IVI Lisboa Portugal)

Renato Fanchin (Hôpital A. 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: journalsbra@cmb.com.br**Diretoria da REDLARA - 2009/2010****DIRETOR EXECUTIVO**

Ernesto Gallardo Lozano

México

E-mail: direjecutiva@redlara.comwww.redlara.com**VICE DIRETORA EXECUTIVA**

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

Carlos Félix Arce

México

carfelar@infosel.net.mx

REGIÃO: Bolívia, Chile & Peru

Fabrizio Vizcarra Alosilla

Peru

favizcarraredlara@gmail.com**REGIÃO:** Colômbia, Equador & Venezuela

María Teresa Urbina

Venezuela

E-mail: mturbina@hotmail.com**REGIÃO:** Argentina, Paraguai & Uruguai

Gabriel Fiszbajn

Argentina

E-mail: fiszbajn@cegyr.com**REGIÃO:** Brasil

Selmo Geber

Brasil.

E-mail: selmogeber@origen.com.br**SECRETÁRIA EXECUTIVA**

Marina Diaz

México

E-mail: info@redlara.com

INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

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

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

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

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

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

RESUMO E ABSTRACT

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

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

1. Artigo de periódico

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

2. Livro

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

3. Capítulo de livro

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

4. Artigo de revista eletrônica

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

5. Artigo publicado na Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

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

ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

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

GENERAL INFORMATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TYPES OF PUBLISHED ARTICLES

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

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

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

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

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

PREPARATION OF ORIGINAL PAPERS

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

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

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

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

TITLE PAGE

The title page should carry the following information:

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

RESUMO AND ABSTRACT

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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

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

1. Journal Article

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

2. Book

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

3. Book Chapter

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

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

4. Electronic Journal Article

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

5. Article published in the Internet:

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

6. Site

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

7. Software

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

TABLES AND FIGURES

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

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

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

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

Graphs should be two-dimensional only.

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

MAILING/SUBMISSION OF ARTICLES

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

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

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

INFORMACIONES GENERALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TIPOS DE ARTÍCULOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

PREPARO DE LOS ORIGINALES

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

de siglas debe ser evitado.

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

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

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

HOJA FRONTAL

La hoja frontal debe contener:

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

RESUMEN Y ABSTRACT

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

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

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

1. Artículo de periódico

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

2. Libro

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

3. Capítulo de libro

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

4. Artículo de revista electrónica

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

5. Artículo publicado en Internet:

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

6. Sitio web

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

7. Software

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

Tablas y figuras

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

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

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

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

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

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

ENVÍO DE ARTÍCULOS

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

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

Editorial**Prezados**

Adelino Amaral 14

Artigo Original**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 15

Criopreservação en Estadío de Blastocisto: Resultados por Congelamiento Lento y Vitricificación

I. Carretero, M. F. Urquiza, M. J. Donaldson, A. G. Alonso, R. A. Pasqualini C. J. Quintans 21

Impacto da Infecção Viral por HIV-1 na Qualidade Oocitária, Embrionária e Taxa de Gravidez

Lilian Okada, Virginia Lazzari, Ricardo Azambuja, João Michelon, Mariangela Badalotti, Alvaro Petracco 24

Avaliação dos Resultados de Vitricificação de Blastocistos

Ana Márcia de Miranda Cota, Elisa Lopes e Lages, Hérica Cristina Mendonça, Ana Luísa Menezes Silva, Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral e João Pedro Junqueira Caetano 27

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 31

Polymorphism A1298C in 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene: A New Marker for ovarian Reserve?

Raphaella P dos Santos; Joji Ueno; Mariana Angelozzi de Oliveira; Luciana Francisco Semião; Ricardo M de Oliveira; Ciro Dresch Martinhago. 35

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, Maria do Carmo Borges de Souza 38

Artigo de Opinião**Standard References for Natural Fertility and ART1**

Ian D. Cooke 41

Artigo de Revisão**Revisiting Ovarian Reserve Evaluation with Focus on Infertility**

Bruno Ramalho de Carvalho, Pryia Maseelall, Stephen J. Bacak, David Barreira Gomes Sobrinho, Adelino Amaral Silva, Hitomi Miura Nakagava 44

Eventos

..... 49

ERRATA

1. Em relação ao texto intitulado "A atenção reprodutiva na rede pública do Rio de Janeiro- um relato do Serviço Social na UFRJ", JBRA Assist Reprod . 2010;14:34.

Paragrafo 5 - Onde se lê "realizaram seminário no Instituto de Ginecologia da UFRJ, leia-se apenas Universidade Federal do Rio de Janeiro".

Palavras-chave: Direito social, ao invés de Direito civil.

2. Em relação ao texto intitulado "Emprego de oócitos de descarte como fonte de blastocistos partenotes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas com grau clínico", publicado no JBRA Assist Reprod. 2011;15-38, corrigimos o sobrenome da autora Patricia Pranke, assim como a sua afiliação, que a autora acrescenta:

Adriana Bos-Mikich¹, Rafael Ruggeri², José Luis Rodrigues², Norma P. Oliveira³, Melisa Croco⁴, Patricia Pranke^{4,5}

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

⁵Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, Brasil

Prezados

Estamos na reta final de organização do nosso XV CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, que será realizado no Costão do Santinho na bela Florianópolis. Agradeço o empenho e a dedicação da Dra. Kazue Harada, que não está medindo esforços para fazer um evento memorável.

No último ano trabalhamos junto ao CFM e ANVISA. Temos uma nova resolução ética no CFM com avanços importantes, com destaque para limitação no número de embriões a serem transferidos, uso da técnica em casais homoafetivos e post-mortem. Na ANVISA durante a consulta pública para elaboração da nova RDC mandamos várias sugestões que foram enviadas pelos associados.

Em uma proposta inédita instituímos o título de capacitação em Reprodução Assistida, que vem atender o anseio de vários especialistas na área. Esse certificado além de valor curricular terá também valor legal uma vez que a ANVISA em sua nova RDC exige que o RT tenha um título de capacitação.

Destaco a parceria da SBRA com a REDLARA que tem funcionado muito bem. Nosso JBRA passou a ser o órgão oficial de divulgação da REDLARA e aumentou muito a visibilidade da Revista.

O Dr. Condesmar de Oliveira presidirá o evento de 2012 no Guarujá e trabalha forte com sua equipe para fazer um grande evento. Já convidou vários palestrantes internacionais e promete uma programação social inesquecível.

Um grande abraço,

ADELINO AMARAL

Predictive Factors of Metabolic Syndrome in Adults and Adolescents with Polycystic Ovary Syndrome

Fatores Preditivos de Síndrome Metabólica em Adultas e Adolescentes com Síndrome dos Ovários Policísticos

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.

Financial support from the National Council of Research and Technology Development (CNPq), process no. 136404/2009-0.

RESUMO

Objetivo: Comparar os parâmetros clínicos e metabólicos, assim como os preditores de Síndrome Metabólica (SM), em mulheres adolescentes e adultas com Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP).

Métodos: Um estudo transversal foi conduzido na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Um total de 147 mulheres com SOP foram divididas em dois grupos: 42 adolescentes e 105 adultas. As medidas antropométricas, amostras de sangue e exames de ultra-sonografia pélvica foram feitas para avaliação da prevalência de SM e seus componentes. Além disso, os preditores de SM em mulheres com SOP foram avaliados por análise multivariada.

Resultados: A prevalência do aumento da pressão arterial diastólica e alterações no perfil lipídico foi maior em mulheres adultas do que em adolescentes ($p < 0,02$). A prevalência da SM foi maior em mulheres adultas do que em adolescentes (49,5% versus 23,8%, $p = 0,01$). Em mulheres adultas, os níveis de insulina e o índice de massa corporal (IMC) foram preditores independentes da incidência de SM ($p < 0,01$), mas em adolescentes, apenas o IMC foi considerado um preditor independente de SM ($p < 0,03$).

Conclusões: Os níveis de insulina e o IMC foram preditores independentes de SM nas mulheres adultas com SOP, no entanto, para as adolescentes, apenas o IMC foi preditor independente de SM, enfatizando a necessidade de monitorar essas pacientes desde a adolescência para prevenir complicações metabólicas.

Palavras-chave: síndrome dos ovários policísticos, adolescentes, insulina, obesidade, síndrome metabólica

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética através do processo HCRP 3505/2009.

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.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, adolescent, insulin, obesity, metabolic syndrome

The study was approved by the ethics committee through the process HCRP 3505/2009.

INTRODUCTION

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a reproductive endocrine disorder that has an onset of symptoms during adolescence and affects approximately 5 to 10% of the female population of reproductive age (Rosenfield, 2007; Aribi, 2008). These women may present with clinical signs such as infertility, irregular menses or hyperandrogenism (based on clinical and/or laboratory evidence), generally accompanied by weight gain; overweight or obesity occurs in approximately half of PCOS cases (Gambineri et al., 2002).

Other metabolic disorders may be associated with PCOS, such as hyperinsulinemia, insulin resistance (IR), metabolic syndrome (MS), early-onset type 2 diabetes mellitus

tus (DM2), dyslipidemia and increased risk of cardiovascular disease (Ehrmann et al., 1999).

The discovery of a high prevalence of IR in women affected by PCOS, regardless of weight, has resulted in a greater appreciation of IR in the pathophysiology of this condition (Goodarzi et al., 2005). IR is detected in 50 to 90% of women with PCOS, and the prevalence is higher in obese patients (Carmina & Lobo, 2004). Studies have shown early changes in the sensitivity and secretion of insulin over a lifetime course of PCOS, indicating that similarly to adult women, adolescents with PCOS, whether thin or obese, have a higher risk of glucose intolerance and DM2 (Silfen et al., 2003).

PCOS may be hereditary, and the interaction of genetic and environmental factors appears to play a fundamental role in its onset. Prepubertal daughters of patients with PCOS have been reported to have an increased incidence of polycystic ovaries, diagnosed by ultrasonography, without changes in circulating androgen or luteinizing hormone (LH) levels (Driscoll, 2003). There is evidence that intrauterine growth restriction occurs in small for gestational age (SGA) newborns, which may be related to the development of PCOS. In a specific cohort of the Brazilian population, the prevalence of PCOS in women who were SGA at birth is twice that in women who had appropriate weight for gestational age (AGA) at birth (Melo et al., 2010). Early onset of puberty and a family history of PCOS are risk factors that must be considered when making this diagnosis in adolescents because the clinical signs are not always evident at this age (Battaglia et al., 2002).

Establishing a diagnosis of PCOS in adolescents is difficult because some symptoms of PCOS in this age group can be confused with normal physiological characteristics of girls this age. During the first years after menarche, 60% of menstrual cycles in girls without PCOS are anovulatory, which is a physiological part of the maturation process (Driscoll, 2003). According to Ehrmann et al. (Ehrmann et al., 1999) menstrual irregularity may be considered to be physiological during the first years after menarche only if there are no associated signs of hyperandrogenism. The PCOS has been discussed in many publications, with difficulty in defining its characteristics. The 2003 Rotterdam consensus workshop (Consensus Rotterdam ESHRE/ASRM, 2004) concluded that PCOS is a syndrome of ovarian dysfunction, and that for its diagnosis two of three criteria might be present. The three criteria established at this consensus are: (1) chronic anovulation characterized by persistent menstrual irregularity for over six months; (2) clinical and/or laboratory hyperandrogenism.

Monitoring adolescents with PCOS is necessary to minimize the clinical and metabolic effects that can interfere with reproductive capacity and progress to chronic degenerative diseases that may increase the risk of morbidity and mortality. The objective of this study was to evaluate predictive factors for MS in adolescent and adult women affected by PCOS.

MATERIAL AND METHODS

A total of 147 consecutive patients from January of 2009 to October of 2010, were recruited at the time of PCOS diagnosis at the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP).

The inclusion criteria used were age (adolescents from 11 to 19 years of age and adult women from 20 to 40 years of age) and a diagnosis of PCOS according to the Rotterdam criteria (Consensus Rotterdam ESHRE/ASRM, 2004), although all patients studied had menstrual irregularities and hyperandrogenism clinical and/or labora-

tory. The adolescents were at least a period of two years after menarche.

All patients signed an informed consent. The study was approved by the ethics committee through the process HCRP 3505/2009.

Patients were included in the study regardless of race or social status and were divided into two groups: adolescent PCOS (n=42) and adult PCOS (n=105). The exclusion criteria were the presence of any endocrine disease that involves anovulation and/or hyperandrogenism, the use of medications that change the lipid profile, the use of hypertensive and/or hypoglycemic agents, the use of any sex steroids during the three months of the study and pregnancy.

The following data were analyzed for each patient: blood pressure (BP), waist circumference (WC), body mass index (BMI), Ferriman Gallwey index, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), 17-hydroxyprogesterone (17-OHP), total testosterone, prolactin, fasting serum insulin, fasting blood glucose, lipid profile (total cholesterol [TC], triglycerides [TG], high density lipoprotein [HDL] and low density lipoprotein [LDL]). All patients received transabdominal pelvic ultrasound (no previous sexual activity) or to transvaginal ultrasound during the follicular phase for the evaluation of the morphological aspect of the ovaries.

After patients fasted for 12 hours, 20 mL of blood was collected. Fasting blood glucose was determined by the oxidase method using the Konelab 60i analyzer by Wiener Lab®, Rosario, Argentina; fasting serum insulin and prolactin were determined by the chemiluminescence method using the DPC 2000 Immulite® analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA); total testosterone, DHEAS and 17-OHP were determined by radioimmunoassay using a Tri-Carb 2100TR liquid scintillation counter (Packard® Instrument Company, IL, USA); TC, HDL and TG were determined by the enzyme method, using the BT 3000 plus apparatus (Wiener lab®) and LDL was calculated using the Friedewald (Friedewald et al., 1972) formula: $LDL = TC - (HDL + TG/5)$. The ultrasound machine used to calculate MOV and for the classification of ovarian micropolycystosis was a Volulus 730 (GE Medical Care, Kretz, Austria), and MOV was calculated using the following formula: $MOV = width \times depth \times length \times 0.5$ (Griffin et al., 1995).

MS was evaluated according to the criteria of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) (National Cholesterol Education Program, 2002) modified by Association/National Heart (Grundy et al., 2005), considering for women waist circumference ≥ 88 cm, triglycerides ≥ 150 mg/dl, HDL cholesterol < 50 mg/dl, fasting glucose ≥ 100 mg/dl and blood pressure ≥ 130 mmHg or ≥ 85 mmHg, where presence of three criteria define the syndrome diagnosis.

Insulin resistance (IR) was evaluated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) using the following formula: $HOMA = (insulin \times 0.055 \times blood\ glucose) / 22.5$. Insulin resistance was considered when the value was > 2.7 (Geloneze et al, 2009).

Statistical analysis

To verify the normal distribution of quantitative variables, the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests were used. An unpaired t test was used for the comparison of normally distributed data; in the absence of a normal distribution, the Mann-Whitney test was used. The quantitative variables were expressed as mean \pm SD. For qualitative variables, the chi-square test or Fisher's test was used. The significance level was set at 5%.

Table 1. The means and standard deviations of characteristics of adolescent and adult women affected by polycystic ovary syndrome (PCOS)

	PCOS adolescent (n=42)	PCOS adult (n=105)	p
Age (years)	16.9 (1.5)	29 (4.4)	<0.0001
BMI (kg/m ²)	29.7 (5.6)	31.9 (8.2)	0.07
WC (cm)	92.9 (13.9)	99 (16.6)	0.04
Ferriman Gallwey score	8.5 (6.3)	8.1 (5.3)	0.7
MOV (cm ³)	12.1 (4.3)	12.2 (4.6)	0.9
Androgen profile			
17-OHP (ng/dL)	100.5 (87.3)	80 (59)	0.1
DHEAS (ng/dL)	147.8 (77.1)	128 (72.5)	0.15
Testosterone (ng/dL)	79.4 (32.5)	82.6 (35.6)	0.62
Insulin sensitivity			
Basal insulin (μUI/mL)	14.1 (11.2)	14.5 (16.3)	0.9
Basal glucose (mg/dL)	85.1 (11.3)	90.8 (19.4)	0.08
HOMA-IR	0.64 (0.67)	2.9 (5.3)	<0.0001
Lipid Panel			
Total cholesterol (mg/dL)	163.6 (29.4)	187.8 (39.1)	0.001
HDL (mg/dL)	50.8 (22.7)	47.1 (12.2)	0.33
LDL (mg/dL)	90.7 (31.6)	113.6 (33.7)	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	110.1 (61.1)	130.6 (74.1)	0.12
SBP (mmHg)	118.4 (10.4)	122.5 (18.7)	0.11
DBP (mmHg)	75.5 (6.1)	79 (11)	0.02

BMI: Body Mass Index; WC: Waist Circumference; MOV: Mean Ovarian Volume; 17-OHP: 17-Hydroxyprogesterone; DHEAS: Dehydroepiandrosterone Sulfate; HOMA-IR: The Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance; SBP: Systolic Blood Pressure; DBP: Diastolic Blood Pressure; PCOS: Polycystic Ovary Syndrome. Quantitative variables are expressed as mean ± SD.

A multiple logistic regression was performed: the dependent variable was the presence of MS and the independent variables were testosterone level, BMI and insulin level. The analysis was performed using SAS software, version 9.0 (SAS Institute, Inc., North Carolina State University, NC, USA).

RESULTS

The mean age of adolescent patients was 16.9 ± 1.5 years, and that of adult patients was 29 ± 4.4 years ($p < 0.0001$). The Ferriman Gallwey scores, testosterone levels, DHEAS, 17-OHP, MOV and BMI were not significantly different between adolescent and adult women. However, WC was greater in adult women than in adolescents (99 ± 16.6 cm vs. 92.9 ± 13.9 cm, $p = 0.04$). Although the systolic blood pressure (SBP) did not differ between the groups, the diastolic blood pressure (DBP) was higher in adult women (79 ± 11 mmHg) than in adolescent women (75.5 ± 6.1 mmHg) ($p = 0.02$). The blood glucose and fasting serum insulin levels were similar for both groups. The HOMA-IR was higher in adult women than in adolescents (2.9 ± 5.3 vs. 0.64 ± 0.67, $p < 0.0001$).

The lipid profile of the adult women was more altered than that of the adolescents. TC and LDL were higher in the adult women (187.8 ± 39.1 mg/dL vs. 163.6 ± 29.4 mg/dL, $p = 0.001$ and 113.6 ± 33.7 mg/dL vs. 90.7 ± 31.6 mg/dL, $p < 0.0001$, respectively). There were no significant differences between the two groups in HDL and TG (Table 1).

The MS criteria are described in Table 2. In the qualitative analyses, there were no differences between the groups in TG ≥ 150 mg/dL, HDL < 50 mg/dL or blood glucose ≥ 100 mg/dL. Both MS (49.5% vs. 23.8%, $p = 0.01$), relation

to obesity (72% vs. 40.5%, $p = 0.005$) and BP ≥ 130/85 mmHg (42% vs. 16.7%, $p = 0.026$) differed between the adult and adolescent patients with PCOS.

In the multivariate analysis for the adult women, insulin level and BMI were independent predictors of MS incidence ($p < 0.01$ for both variables); however, for adolescents, only the BMI independently predicted the incidence of MS ($p < 0.03$; Table 3).

DISCUSSION / CONCLUSION

The persistence of anovulatory cycles for more than 24 months after menarche, especially if associated with other characteristic of hormonal disorders, may suggest ovulatory dysfunction of pathologic origin, with hyperandrogenic anovulation being the condition most frequently detected (Avvad et al., 2001). In a study in adolescents in our midst (Fernandes et al., 2005) 14/22 patients with menstrual irregularity had associated clinical signs of hyperandrogenism (Ferriman-Gallwey score ≥ 8) suggesting a diagnosis of PCOS. Considering the criteria of PCOS based on the Rotterdam consensus (Consensus Rotterdam ESHRE/ASRM, 2004) they found that 21/22 patients fulfilled the diagnostic. These findings agree with other authors who point to menstrual irregularity as the most precocious marker of PCOS. Based on these data, the present study, all adolescent patients diagnosed with PCOS had irregular menstrual periods.

An important aspect of this cross-sectional study is its simultaneous analysis of the changes that the metabolic repercussions of PCOS may cause in two separate stages of reproductive life at different exposure times.

Table 2. The prevalence of metabolic syndrome* and its criteria in adult and adolescent women with polycystic ovary syndrome (PCOS)

	Criteria	n (total n) - % adolescent PCOS	n (total n) - % adult PCOS	P
WC	≥88 cm	17 (42) – 40.5%	76 (105) - 72%	0.005
Triglycerides	≥150 mg/dl	9 (42) – 21.4%	23 (105) - 22%	0.82
HDL	<50 mg/dl	20 (42) – 47.6%	73 (105) - 69.5%	0.07
BP	≥130x85 mmHg	7 (42) – 16.7%	44 (105) - 42%	0.026
Fasting Blood Glucose	≥100 mg/dl	2 (42) – 4.8%	18 (105) - 7%	0.06
MS Prevalence	≥3 criteria	10 (42) - 23.8%	52 (105) - 49.5%	0.01

WC: Waist Circumference; BP: Blood Pressure; MS: Metabolic Syndrome; PCOS: Polycystic Ovary Syndrome.

*According to the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)¹⁴ modified by Association/National Heart¹⁵.

Table 3. Metabolic syndrome predictor variables in adolescent and adult women with polycystic ovary syndrome (PCOS)

Predictor variables	PCOS Adolescent		PCOS Adult	
	crude OR (95% CI)	adjusted OR (95% CI)	crude OR (95% CI)	adjusted OR (95% CI)
Testosterone (ng/dL)	1.00 (0.98-1.02)	0.99 (0.96-1.02)	0.99 (0.98-1.00)	0.99 (0.98-1.01)
BMI (kg/m ²)	1.25 (1.06-1.48)	1.23 (1.03-1.47)	1.25 (1.15-1.36)	1.20 (1.10-1.31)
Insulin (μU/mL)	1.05 (0.99-1.12)	1.03 (0.96-1.11)	1.17 (1.09-1.26)	1.12 (1.03-1.22)

BMI: Body Mass Index; PCOS: Polycystic Ovary Syndrome; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval

In the population studied, the presence of obesity and a WC ≥ 88 cm was observed in approximately 40.5% of adolescents with PCOS. The increase in childhood obesity is correlated with an increase in WC, and this parameter is reported to be a good marker of abdominal visceral fat (Coviello et al., 2006). Visceral adiposity, in turn, is associated with IR, a primary pathophysiological mechanism that is responsible for the metabolic disorders of MS. It is important to note that the association of obesity with this syndrome is independent of age, as noted in the literature (Gambineri et al., 2002); this was also observed in this study, with a similar prevalence of obesity in adult and adolescent women with PCOS. This study demonstrated that the typical clinical and laboratory signs of PCOS are present, regardless of age, due to the lack of difference between the groups in androgen levels, Ferriman Gallwey index and MOV.

The prevalence of IR in adults with PCOS, as measured by HOMA-IR, was greater than that observed in adolescents, and insulin was an independent predictive variable for the incidence of MS, reflecting its direct effect on metabolic repercussions.

The prevalence of IR may have been underestimated in this study. The best method for IR identification is the euglycemic hyperinsulinemic clamp described by DeFronzo et al. (DeFronzo et al., 1979). This method can be used to accurately assess the rate of whole-body glucose disposal during steady-state hyperinsulinemia. The oral glucose tolerance test (OGTT) has also been used, in addition to several insulin sensitivity indices, to evaluate IR; these methods are less invasive and more cost-effective than the euglycemic hyperinsulinemic clamp. A previous study performed by our group to evaluate IR in women with PCOS showed that the rate of IR detected by insulin sensitivity indices was 44.8 to 51.4%, which is lower than expected when compared to the rate detected by the OGTT (Martins et al., 2007).

As the duration of exposure to PCOS increased over time, there was an emergence of health complications for these women. There was a higher prevalence of risk factors for the development of cardiovascular diseases (BP ≥ 130/85 mmHg and elevated levels of TC and LDL) in adult women than in adolescents. This broader view of PCOS has established a reconfiguration of the syndrome from an endocrine disorder with only reproductive effects to a metabolic syndrome with reproductive implications, a change that has also altered the therapeutic approaches for these women (Norman et al., 2007).

Soares et al. (Soares et al., 2010) found changes in the vascular elasticity of the carotid artery in young women with PCOS, even in the absence of classic risk factors for cardiovascular disease such as arterial hypertension and obesity.

These authors attributed an increase in the arterial stiffness index and reduction in arterial distensibility to the possible role that hyperandrogenism plays in PCOS and not the comorbidities associated with the syndrome. The mechanism responsible for reduced arterial elasticity in PCOS patients has not yet been determined. To evaluate the effects of sex steroids on arterial stiffness, Natoli et al. (Natoli et al., 2005) studied human aortic smooth muscle cells incubated *in vitro* with different sex steroids. The proportion of elastin/collagen ratio in cells incubated with estradiol and progesterone was 11-fold greater than in cells incubated with testosterone. This reduction of elastin in the presence of testosterone may result in greater arterial stiffness *in vivo*. Reduced arterial stiffness was also detected in patients with DM2, probably due to deficient non-enzymatic glycation of elastin and collagen in the arterial tunica (Schram et al., 2004). Therefore, according to Soares et al. (Soares et al., 2010), it is reasonable to suggest that this mechanism relates to PCOS due to the greater prevalence of IR and DM2 in these women.

The prevalence of MS in adult women was 49.5%, which is double the value found in adolescent women (23.8%) and is consistent with previous reports. The prevalence of MS in patients with PCOS, according to the NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program, 2002) criteria, varies from 33 to 43%, which is approximately 2 to 4 times higher than levels observed in an age- and BMI-matched general population (Ehrmann et al., 2006). In adult patients with PCOS, the prevalence of MS is higher in individuals with a BMI greater than 27 kg/m² and with increased insulin levels but does not correlate with circulating androgen levels (Apridonidze et al., 2005). In Brazil, there is a high rate of MS in adult women affected by PCOS, with a general prevalence of 28.4%, but the rate is 52.3% in the subgroup of obese women (Soares et al., 2008). Through our multivariate analysis, insulin and BMI were found to be independent predictors of MS in adult women with PCOS, whereas in adolescents with PCOS, only BMI independently predicted MS. Hyperandrogenism was not an independent predictor of MS development in either group of women affected with PCOS. However, in another study, PCOS group was compared to a control group without PCOS, and hyperandrogenism was considered a risk factor for MS in adolescents with PCOS, regardless of obesity, level of IR or sex hormone-binding globulin (SHBG) level (Coviello et al., 2006). Chen et al. (Chen et al., 2007) demonstrated a positive correlation between serum levels of androgens and SBP and DBP values in young women with PCOS, regardless of age or status of IR, obesity or dyslipidemia; nevertheless, the mechanisms by which a hyperandrogenic state causes an increase in blood pressure have still not been fully elucidated. These findings indicate that the relationship between MS and PCOS involves complex mechanisms that depend not only on constitutional factors but also on levels of insulin, androgens and BMI.

Follow-up studies of adolescents with PCOS are needed to assess the impact of the clinical segment of the women on the risk of metabolic complications in adult life. A greater appreciation of initial symptomatology is essential to allow for early therapeutic intervention, including behavioral modification, to minimize acute and chronic consequences of this condition.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study received financial support from the National Council of Research and Technology Development (CNPq), process no. 136404/2009-0.

REPRINT REQUEST

Rosana Maria Reis, M.D., Departamento de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Av. Bandeirantes 3900, Campus Universitário, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP - Brazil. (Tel: +55-16-3602-2926; Fax: +55-16-3633-0946; E-mail: romareis@fmrp.usp.br)

REFERENCES

Apridonidze T, Essah PA, Luomo MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1929-3.

Aribi M. Candidate genes implicated in type 1 diabetes susceptibility. *Curr Diabetes* 2008;4:110-21.

Avvad CK, Holeuwerger R, Silva VCG, Bordallo MA, Breitenbach MM. Menstrual irregularity in the first postmenarcheal years: an early clinical sign of polycystic ovary syndrome in adolescence. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15:170.

Battaglia C, Regnani G, Mancini F, Iughetti L, Flamigni C, Venturoli S. Polycystic ovaries in childhood: a common finding in daughters of PCOS patients. A pilot study. *Hum Reprod* 2002;17:771-6.

Carmina E, Lobo RA. Use of fasting blood to assess the prevalence of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;82:661-5.

Chen MJ, Yang WS, Yang JH, Chen CL, Ho HN, Yang YS. Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome. *Hypertension* 2007;49:1442-7.

Coviello AD, Legro RS, Dunaif AJ. Adolescent Girls with Polycystic Ovary Syndrome Have an Increased Risk of the Metabolic Syndrome Associated with Increasing Androgen Levels Independent of Obesity and Insulin Resistance. *Clin. Endocrinol. Metab* 2006;91:492-7.

DeFronzo R, Tobin J, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;273:214-23.

Driscoll DA. Polycystic ovary syndrome in adolescence. *Semin Reprod Med* 2003;21:301-7.

Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999;22:141-6.

Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghaziz MN, et al. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:48-53.

Fernandes AR, Silva ACJSR, Romão GS, Pata MC, Reis RM. Insulin Resistance in Adolescents with Menstrual Irregularities. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2005; 18:269-74.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972;18:499-502.

Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:883-96.

Geloneze B, Vasques AC, Stabe CF, Pareja JC, Rosado LE, Queiroz EC, et al. Homa1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:281-7.

Goodarzi MO, Erickson S, Port SC, Jennrich RI, Korenman SG. β -cell function: a key pathological determinant in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:310-5.

Griffin IJ, Cole TJ, Duncan KA, Hollman AS, Donaldson MD. Pelvic ultrasound measurements in normal girls. *Acta Paediatr* 1995; 84:536-43.

Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; 112:2735-52.

Martins WP, Santana LF, Nastro CO, Ferriani FA, de Sa MF, Dos Reis RM. Agreement among insulin sensitivity indexes on the diagnosis of insulin resistance in polycystic ovary syndrome and ovulatory women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;133:203-7.

Melo AS, Vieira CS, Barbieri MA, Rosa E Silva AC, Silva AA, Cardoso VC, Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF, Bettiol H. High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Human Reproduction* 2010;25:2124-31.

Natoli AK, Medley TL, Ahimastos AA, Drew BG, Thearle DJ, Dilley RJ, Kingwell BA. Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension* 2005;46:1129-34.

Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE Polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2007;370:685-97.

Rosenfield RI. Identifying children at risk for polycystic ovary

syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:787-96.

Schram MT, Henry RM, van Dijk RA, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Westerhof N, Stehouwer CD. Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Hypertension* 2004;43:176-81.

Soares EM, Azevedo GD, Gadelha RG, Lemos TM, Maranhão TM. Prevalence of the metabolic syndrome and its components in Brazilian women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2008;89:649-55.

Soares GM, Vieira CS, Martins WP, Franceschini SA, dos Reis RM, de Sá MFS, Ferriani RA. Increased arterial stiffness in non-obese women with polycystic ovary syndrome without co-morbidities: one more characteristic inherent to the syndrome? *Clinical Endocrinology* 2010, in press.

Silfen ME, Denburg MR, Manibo M, Lobo A, Jaffe R, Ferin M, Levine LS, Oberfield SE. Early Endocrine, Metabolic, and Sonographic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Comparison between Nonobese and Obese Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4682-8.

The Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* 2004;19: 41-7.

Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 2002;106:3143-421.

Criopreservación en Estadío de Blastocisto: Resultados por Congelamiento Lento y Vitrificación

Blastocyst Stage Cryopreservation
Results for Slow Freezing and Vitrification

Criopreservação em Estágio de Blastocisto
Resultados por Congelamento Lento e Vitrificação

I. Carretero¹, M. F. Urquiza¹, M. J. Donaldson¹, A. G. Alonso¹, R. A. Pasqualini¹, C. J. Quintans²

Institución donde se realizó el trabajo:

¹Halitus Instituto Médico, Marcelo T. de Alvear 2084 (C1122AAF) Buenos Aires

²Fundación REPRO, Marcelo T. de Alvear 2086, 6^{to} D (C1122AAF) Buenos Aires
República Argentina

¹Inés Carretero, Licenciada en Ciencias Biológicas, Embrióloga Junior.

¹María Fernanda Urquiza, Licenciada en Genética, Embrióloga Junior.

¹Mónica J. Donaldson, Médica Veterinaria, Embrióloga Senior.

¹Andrea G. Alonso, Técnico de Laboratorio.

¹R. Agustín Pasqualini, Médico, Director de Halitus Instituto Médico.

²Carlos J. Quintans, Doctor en Farmacia y Bioquímica.

Contacto: ines.carretero@halitus.com

Presentado como Poster – X Congreso General da Red Latinoamericana de Reproducción Asistida- Rio de Janeiro

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: Se consideraron aquellos pacientes que durante los años 2009 y 2010 tuvieron ciclos de transferencia de embriones criopreservados en estadio de blastocisto.

Métodos: 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 resulta-

dos 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

RESUMO

Objetivo: comparar os resultados de um programa de fertilização *in vitro* com embriões criopreservado em estágio de blastocisto, por congelamento lento ou vitrificação..

Pacientes: foram considerados ciclos de transferência de embriões criopreservados como blastocistos durante os anos de 2009 e 2010.

Métodos: A partir do nosso banco de dados, foram selecionados os ciclos correspondentes às características acima. Os resultados foram analisados usando Graph Pad InStat, utilizando o teste exato de Fisher. Resultados: 133 ciclos corresponderam à transferência de blastocistos criopreservados. Desse total, 107 ciclos pela técnica de lenta (grL) e os restantes 26 blastocistos foram vitrificados (grV). No grL foram $3,28 \pm 1,18$ blastocistos descongelados por ciclo e do GRV $2,96 \pm 1,77$ com uma média de blastocistos transferidos de $2,35 \pm 0,90$ (grL) e $2,30 \pm 0,97$ (grV), respectivamente. A diferença na recuperação de blastocistos viáveis entre os dois grupos não foi significativa ($P=0,4315$). No grL houve 11 impossibilidade de trans-

ferências (10,3%), enquanto no grV 3 (11,5%) devido à falta de viabilidade de embriões recuperados. No grL foram obtidos 39 (40,6%) de gravidez clínica versus 13 (56,5%) no grV, diferença não significativa ($P = 0,2416$). **Conclusões:** O congelamento lento de blastocistos é utilizado em nossa instituição com resultados satisfatórios. Nos últimos dois anos começamos a explorar possíveis vantagens da vitrificação para determinar se justificaria uma alteração de protocolos. Os resultados mostram uma tendência melhor da vitrificação, mas o número de casos estudados ainda não permite conclusões estatisticamente válidas.

Palavras-chave: blastocistos, criopreservação, congelamento lento, vitrificação

ABSTRACT

Objective: To compare the results of a program of in vitro fertilization with embryos cryopreserved at blastocyst stage, either by vitrification or slow cooling.

Patients: transfer cycles at blastocyst stage. were considered during the years 2009 and 2010.

Methods: From our database we selected the cycles corresponding to the above characteristics. The results were analyzed using GraphPad InStat, using the Fisher exact test.

Results: There were 133 cycles corresponding to the transfer of cryopreserved embryos in blastocyst stage, 107 cycles corresponding to the slow technique (grL) and the remaining 26 blastocysts were vitrified (grV). In the grL group there were 3.28 ± 1.18 thawed blastocysts per cycle and the grV group had 2.96 ± 1.77 with an average of 2.35 ± 0.90 (grL) and 2.30 ± 0.97 (grV), respectively. The difference in the recovery of viable blastocysts between the two groups was not significant ($P = 0.4315$). In grL 11 were due to suspend transfers (10.3%) while the grV 3 (11.5%) due to lack of viability of embryos recovered. In grL there were 39 (40.6%) clinical pregnancies versus 13 in the GRV 13 (56.5%). The observed difference was not significant ($P = 0.2416$).

Conclusions: Slow Cryopreservation at blastocyst stage is used at our institution with satisfactory results. In the last two years we started to explore the possible advantages of vitrification to determine whether it would justify changing the slow protocol in use. While the results show a tendency to be better with vitrification, the number of cases studied does not yet allow statistically valid conclusions.

Keywords: blastocyst cryopreservation, vitrification, slow cooling

INTRODUCCIÓN

Las ventajas de prolongar el cultivo embrionario con el propósito de realizar la transferencia en estadio de blastocisto fueron inicialmente contrarrestadas por las dificultades que muchos grupos tuvieron para obtener resultados aceptables en la criopreservación de los blastocistos restantes. Sin embargo, estas dificultades parecen haberse superado ya que la mayoría de las publicaciones más recientes muestran tasas de embarazo que superan el 40% (Yousry et al, 2008).

En nuestro centro también se registraron algunos inconvenientes cuando se comenzó a descongelar blastocistos criopreservados siguiendo el protocolo lento (Menezo et al, 1996), pero han sido superados al introducir algunos cambios en la técnica que fueron oportunamente comunicados (Quintans et al, 1997). Nuestra experiencia posterior, realizando durante casi 15 años la técnica de criopreservación lenta fue satisfactoria.

La introducción de la vitrificación, técnica ultra rápida,

creó la expectativa de obtener mejores resultados comparados con la criopreservación lenta (Yousry et al, 2008, Stehlik et al, 2005). Debido a ello durante los últimos dos años comenzamos a explorar las posibles ventajas de utilizar la vitrificación, para determinar si la misma justificaría el cambio del protocolo lento en uso.

En el presente trabajo se comunican nuestros primeros resultados con vitrificación en estadio de blastocisto, en forma comparativa con lo registrado utilizando criopreservación lenta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema general de estimulación fue realizado con la administración de anticonceptivos orales, supresión hipofisaria con agonista de GnRH (*acetato de leuprolide*) comenzando en día 20-22 del ciclo previo, y luego estimulación con FSH (hormona foliculo estimulante) recombinante y hMG (gonadotrofina de mujer menopáusica) purificada dependiendo de la respuesta individual. La inyección de 10000 unidades de hCG (gonadotrofina coriónica humana) se indicó cuando ecográficamente se detectaba el desarrollo de más de 3 folículos de 18 mm. La punción folicular para la captación ovocitaria se realizó 34-36 horas después por vía transvaginal con control ecográfico.

La fertilización in vitro de los ovocitos maduros se efectuó en todos los casos por ICSI, el cultivo embrionario se llevó a cabo a 37° C, en atmósfera de aire saturado de humedad y con 5% de CO₂. Como medio de cultivo se empleó SSM (Single Step Medium, Irvine Scientific Santa Ana CA, USA) suplementado con 10% de SSS (Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific Santa Ana CA, USA).

La criopreservación lenta se realizó de día 5° a 6° utilizando la técnica abreviada de Menezo con glicerol y sacarosa (Quintans et al, 1997). Para la descongelación se empleó una modificación de la técnica original introducida por nosotros, que consiste en prolongar el período de cultivo de los blastocistos descongelados previo a la transferencia embrionaria durante 16-18 hs., en lugar de las 4-6 horas indicada por el autor.

La vitrificación y calentamiento se efectuaron mediante la técnica de Kuwayama (Kuwayama, 2007) con etilenglicol, dimetilsulfóxido, y sacarosa empleando como soporte una membrana de poliéster transparente. La única modificación introducida fue prolongar también en este caso el período de cultivo hasta la transferencia llevándolo a 14-16 horas en lugar de las 4 a 6 horas como indica el autor.

Para la transferencia de los embriones ya sea criopreservados o vitrificados, el endometrio de las pacientes se preparó con 6 mg diarios de valerianato de estradiol desde el día 2° al 5° del ciclo, continuando con 8 mg/diarios hasta el día del análisis de β hCG. También se suministró progesterona micronizada a razón de 800 mg por día desde 4 días previos a la transferencia hasta la 12va semana si se producía el embarazo.

La transferencia embrionaria se realizó utilizando un catéter blando (Frydman soft) por vía transcervical y bajo control ecográfico.

RESULTADOS/DISCUSIÓN

En el período considerado (años 2009 y 2010) se programaron 133 ciclos que correspondían a transferencias de embriones criopreservados en estadio de blastocisto. De este total, 107 ciclos de transferencia correspondían a blastocistos criopreservados con la técnica lenta y los 26 ciclos restantes a transferencia con blastocistos vitrificados. La media de edad de las pacientes que recibieron blastocistos criopreservados por la técnica lenta fue de $37,58 \pm 5,34$ años y en el grupo que recibió blastocistos

vitrificados fue de $37,38 \pm 5,51$, no mostrando diferencias significativas ($P= 0.8685$).

Se recuperaron 226 (63,5%) de un total de 356 blastocistos descongelados pertenecientes a 96 ciclos en condiciones adecuadas para ser transferidos, mientras que en 11 ciclos (10,3%) la transferencia debió suspenderse puesto que los blastocistos no resultaron aptos.

Se desvitrificaron un total de 77 blastocistos, resultando aptos para transferirse 53 de ellos (68,8%) correspondientes a 23 ciclos. En los 3 ciclos restantes (11,5%) la transferencia debió suspenderse por no haberse recuperado blastocistos viables.

En las 96 transferencias de congelación lenta realizadas se transfirió un promedio de $2,34 \pm 0,89$ embriones (rango de 1 a 4), mientras que en las 23 de vitrificación los embriones transferidos fueron $2,30 \pm 0,97$ (rango de 1 a 4).

Se lograron 39 embarazos clínicos (40,6%) por transferencia de embriones descongelados mientras que por desvitrificación se observaron 13 embarazos clínicos (56,5% por transferencia).

Los resultados en cuanto a número de embriones descriptos por ciclo, su sobrevida al tratamiento, y número de embriones transferidos no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. La tasa de embarazo clínico por transferencia parecería ser superior en el grupo de blastocistos vitrificados respecto al de criopreservación lenta; sin embargo estas diferencias no resultan estadísticamente significativas ($P= 0.2416$).

Según otras publicaciones en donde se comparan los resultados luego de criopreservar con ambas técnicas, la utilización de la vitrificación resultaría más eficaz que el congelamiento lento (4). Sin embargo aún cuando los resultados mediante la técnica de vitrificación no parecieran diferir de los aquí presentados (50% y 56% de embarazo clínico/transferencia respectivamente), la tasa de embarazo que obtienen luego de transferir blastocistos por congelación lenta es muy inferior a la reportada por nuestro centro (16,7 % vs 40,6 %, $P= 0,004$). Esto sugiere que la diferencia que observan podría deberse más a una baja eficacia en el manejo de la criopreservación lenta que a una real ventaja atribuible a la vitrificación.

En una revisión de trabajos donde se compara la eficacia de ambas técnicas (1), la mayoría de estas publicaciones corresponden al uso de una sola técnica. Esto hace dificultosa la comparación puesto que las poblaciones podrían ser bien diferentes entre sí, observándose una gran variabilidad entre los resultados analizados.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran una tendencia a ser mejores cuando se utiliza la vitrificación, sin embargo el número de casos estudiado no nos permite aseverar que las diferencias observadas sean estadísticamente significativas.

La diferencia encontrada, a favor de los resultados obtenidos con la vitrificación, sugiere la conveniencia de proseguir con el desarrollo del estudio con el objeto de determinar si al aumentar el número de casos dicha diferencia se mantiene hasta alcanzar significación estadística.

Si bien existen publicaciones (1) donde se muestra casuística de criopreservación de blastocistos, ya sea por técnica lenta o bien mediante vitrificación, esos datos no permiten decidir cual de las dos técnicas de criopreservación sería la más exitosa, ya que no en todas las citas de dicha revisión se compara la aplicación de ambas técnicas en poblaciones semejantes de un mismo centro en igual período de tiempo.

Referencias

1. Kuwayama M. (2007) *Theriogenology*. 67(1):73-80.
2. Menezo Y.R., Kaufmann R.A., Nicollet B. Gilchrist F., Liu Z, Servy E.J. (1996) Abstracts American Society Reproductive. Medicine, 52nd Annual Meeting, P-006, Nov. 2-6.
3. Quintans C. J., Donaldson M.J., Blanco L.A., Pasqualini R.S. (1997) Abstracts American Society Reproductive. Medicine, 53rd Annual Meeting, P-267, Oct. 18-22.
4. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O. (2005) *Reprod Biomed Online*. 11(1):53-7
5. Youssry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, Al-Hasani S. (2008) *Reprod Biomed Online*. 16 (2) 311-320.
6. Kuwayama M. (2007) *Theriogenology*. 67(1):73-80.

Impacto da Infecção Viral por HIV-1 na Qualidade Oocitária, Embrionária e Taxa de Gravidez

Impact of Viral Infection by HIV-1 in Oocyte and Embryo Quality and Pregnancy Rate.

Lilian Okada¹, Virginia Lazzari¹, Ricardo Azambuja¹, João Michelin¹, Mariangela Badalotti¹, Alvaro Petracco¹

¹ Clínica Fertilitat, Porto Alegre, RS, Brasil

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

RESUMO

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 de métodos: A população deste estudo foi constituída de 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, que também se submeteram ao programa. Todos os pacientes seguiram o protocolo de inseminação, cultivo e transferência da clínica.

Resultados: Os resultados da aspiração folicular, da fertilização, bem como da taxa de gestação não tiveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos sorodiscordante e controle.

Conclusões: 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

ABSTRACT

Objective: The total number of people infected with HIV is 33.3 million according to 2009 data from the World Health Organization. Of these, 15.9 million women are living with the virus. With the improvement in life expectancy and quality of seropositive patients and lower risk of contamination vertical, HIV serodiscordant couples are considering the possibility of pregnancy with the help of assisted reproduction techniques. The aim of this study

was to analyze the impact of viral infection by HIV-1 in the oocyte and embryo quality and pregnancy rate.

Material and Methods: The study population consisted of 8 serodiscordant couples in which partners were seropositive for HIV-1, with a mean age of 38.83 years, who underwent 18 cycles of assisted reproduction in the period 2002 to 2010. The control group consisted of 36 matched seronegative couples with regard to factor infertility, age, ovarian stimulation and semen sample in order to have two controls for each serodiscordant couple, who also underwent the program. All patients followed the clinic's protocol for insemination, culture and embryo transfer.

Results: The results of oocyte retrieval, fertilization and pregnancy rate were not significantly different ($p < 0.05$) between groups serodiscordant and control.

Conclusions: The study showed that viral infection by HIV-1 in women does not impact negatively on the oocyte or embryo quality and pregnancy rate, in agreement with previous studies.

Keywords: HIV, serodiscordant couple, oocyte quality, embryo quality, clinical pregnancy

Introdução

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 (WHO, 2009).

Atualmente, a expectativa e qualidade de vida dos pacientes soropositivos, têm melhorado devido aos medicamentos retrovirais (Lohse et al., 2007; Schackman et al., 2006). O risco de contaminação vertical de mulheres HIV positivas tem diminuído para menos de 1%, com adequado cuidado durante a gestação e parto, e tratamento do recém-nascido (European Collaborative Study, 2005; Mandelbrot et al., 1998).

As técnicas de reprodução assistida minimizam os riscos de transmissão viral, permitindo que casais HIV sorodiscordantes considerem a possibilidade de ter uma gestação. Contudo os casais devem ser advertidos sobre os possíveis riscos de contaminação, mesmo que pequenos. O objetivo do estudo foi analisar o impacto da infecção viral por HIV-1 na qualidade oocitária, embrionária e taxa de gravidez.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e Amostra

A população deste estudo foi constituída de 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 fertilidade, idade, amostra seminal e estimulação ovariana, de forma a ter dois controles para cada casal sorodiscordante, que também se submeteram ao programa.

Estimulação ovariana e fase laboratorial

O bloqueio hipofisário (down regulation) foi feito pelo uso de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (a-GnRH) e comprovado pela dosagem sérica de estradiol abaixo de 40pg/ml. Os protocolos aplicados para estimular o desenvolvimento folicular utilizaram gonadotrofina menopáusica humana (HMG); hormônio foliculo estimulante recombinante (r-FSH) ou a associação entre ambos. As gonadotrofinas foram mantidas até o momento em que os folículos atingiram o tamanho de 18 a 20 mm, quando se administrou a gonadotrofina coriônica humana (hCG) para determinar o final do processo de maturação do oócito. Após 33 a 36 horas da aplicação do hCG realizou-se a aspiração folicular.

Os oócitos recuperados no momento da aspiração folicular foram transferidos para meio Human Tubal Fluid (HTF; Irvine) com 7,5% de Serum Substitute Supplement (SSS; Irvine) ou meio Life Global (Global, IVF Online) com 7,5% de Human Serum Albumin (HSA; Global, IVF Online), a 37°C e a 5% de CO₂. Pelo menos 2 horas após a punção os oócitos foram colocados em solução de hialuronidase por 30 segundos e foram transferidos ao meio de HTF HEPES com 10% de SSS onde foi realizada a desnudação dos mesmos por manipulação mecânica. Aqueles oócitos em estágio de Metáfase II foram inseminados com espermatozoides, previamente coletados pelo parceiro.

A ocorrência da fertilização foi verificada 18-20 horas após a inseminação, pela observação de dois pronúcleos e dois corpúsculos polares. Os embriões eram então mantidos em estufa durante dois ou três dias a 37°C com 5% de CO₂, de forma que o pH, independente do meio de cultivo, ficasse em torno de 7,3. Os meios de cultivo utilizados foram HTF ou Global + 7,5% de SSS ou HSA no dia 1, HTF ou Global + 15% SSS ou HSA nos dias dois e três.

A transferência embrionária para o útero foi realizada no segundo ou terceiro dia após a aspiração folicular. Os embriões selecionados para transferência eram os que apresentavam o melhor aspecto morfológico dentro dos parâmetros sugeridos pela Red Latino Americana (Red Latino Americana, 1998). A transferência era realizada sob visão ultrassonográfica. A constatação da gestação foi feita por teste sanguíneo de bHCG, no 12º dia após a transferência embrionária. Foi considerada gravidez clínica a presença de saco gestacional intra-uterino com embrião apresentando batimentos cardíacos detectados pelo exame de ultrassonografia. A progesterona era mantida até a comprovação da gestação pelo bHCG, e em caso de gestação clínica foi mantido, até 12 semanas de evolução.

Tabela 1. Resultados da aspiração folicular nos casais sorodiscordantes e controle.

	n, HIV+	Média/paciente, HIV+	n, controle	Média/paciente, controle
Folículos asp.	146	8,11	293	8,14
Oócitos recup.	120	6,67	253	7,03
MII	85	4,72	207	5,75
MI	10	0,56	19	0,53
PI	11	0,61	10	0,28
Degenerados	14	0,78	17	0,47

NS

Tabela 2. Resultados da inseminação e evolução dos embriões nos casais sorodiscordantes e controle.

	n, HIV+ (%)	Média/ciclo, HIV+	n, controle (%)	Média/ciclo, controle
Inseminados	77	4,28	204	5,67
Fertilização	62 (80,5)	3,44	177 (86,8)	4,92
Clivagem	62 (100,0)	3,44	173 (97,7)	4,81
Grau I + II	41 (66,1)		114 (65,9)	
Grau III + IV	21 (33,9)		59 (34,1)	
Transferidos	36 (58,1)	2,57 (14 ciclos)	99 (57,2)	2,91 (34 ciclos)

NS

Tabela 3. Resultados de gestação nos casais sorodiscordantes e controle, quando houve a transferência de embriões.

	n, HIV+ (%)	n, controle (%)
Gestação	6/14 (42,9)	15/34 (44,1)
Gestação. Clínica	5/14 (35,7)	11/34 (32,4)
Implantação	8/36 (22,2)	17/99 (17,2)
Abortos	2/5 (40,0)	2/11 (18,2)
Nascimentos	3/5 (60,0)	9/11 (81,8)

NS

Análise estatística

Os dados de folículos e oócitos aspirados, e qualidade oocitária foram comparados pelo teste de Mann-Whitney, pois não apresentaram distribuição normal. A taxa de fertilização e clivagem, qualidade embrionária, implantação, gravidez clínica e abortamento foram comparados e analisados através do teste exato de Fischer. Em ambos os testes o nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 18 ciclos de fertilização realizados entre os casais sorodiscordantes, em quatro não houve transferência devido os seguintes motivos: em um ciclo, o embrião formado foi congelado para uso posterior; em outro, não houve oócito maduro para inseminação; e em dois outros, não houve fertilização.

Dos 36 ciclos de fertilização realizados como grupo controle, em dois não houve transferência: em um ciclo não houve oócito maduro para inseminação e, no outro, os embriões foram congelados, pois o endométrio não estava adequado para transferência.

Os resultados encontrados no estudo apresentam-se nas tabelas abaixo.

Estudos com casais sorodiscordantes são mais frequentes quando o homem é o portador do vírus. Mais de 4000 procedimentos de reprodução assistida em homens HIV positivos foram relatados e com uma eficiente proteção

de transmissão horizontal (Bujan et al.; 2007; van Leeuwen et al., 2007; Sauer et al.; 2009; Savasi et al., 2007). Por sua vez, quando a mulher é a portadora do vírus, são poucos os casos relatados até então, com menos de 200 casais no total (Ohl et al., 2003; Terriou et al., 2005; Manigart et al., 2006; Martinet et al., 2006; Prisant et al., 2010). Estudos anteriores de reprodução assistida em pacientes HIV positivos mostravam baixas taxas de gestação, de 9,1% e 8,6% em homens e mulheres soropositivos respectivamente (Ohl et al., 2003). No entanto, mais recentemente, foi observado taxas de gestações em casais com mulheres-HIV positivas em torno de 23,9% (Ohl et al., 2005). Estudos pareados com grupos controles negativos, não demonstraram diferença significativa nas taxas de gestação quando comparados com mulheres HIV positivas (Terriou et al., 2005; Martinet et al., 2006; Prisant et al., 2010; Santulli et al., 2011). Contudo, quando ambos os parceiros são HIV positivos, encontraram uma taxa de cancelamento do ciclo maior e uma menor taxa de gestação, em relação ao grupo controle (HIV negativo) (Santulli et al., 2011). Quanto aos resultados dos ciclos de reprodução assistida, o número de oócitos maduros aspirados não é diferente entre os grupos sorodiscordantes e controle (Terriou et al., 2005; Martinet et al., 2006; Prisant et al., 2010); assim como a porcentagem de bons embriões (Terriou et al., 2005; Martinet et al., 2006). Neste estudo, os resultados da aspiração folicular, da fertilização, bem como da taxa de gestação não tiveram diferenças estatísticas entre o grupo sorodiscordante e controle. As taxas de gestações clínicas apresentaram-se relativamente altas, em relação a estudos anteriores, com 35,7% de gestação clínica nos casais sorodiscordantes, mostrando que a reprodução assistida foi eficiente. Entre os 8 casais sorodiscordantes que buscaram as técnicas de reprodução assistida, 3 obtiveram sucesso, com nascimento de bebês saudáveis.

CONCLUSÕES

O presente 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.

Com o constante progresso no tratamento para pacientes HIV positivos e mudanças sociais em relação ao problema, a reprodução assistida pode ser um efetivo e seguro método em busca da maternidade sem que haja transmissão viral ao parceiro.

Endereço para Correspondência:

Lilian Okada
Clínica Fertilitat, Av. Ipiranga 6690/801
Porto Alegre, RS, 90610-000
E-mail: lilian@fertilitat.com.br
Tel.: 55-51-33391142

Referências

- Bujan L, Hollander L, Coudert M, Gilling-Smith C, Vucetich A, Guibert J, et al. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThE network. *AIDS*. 2007;21:1909-1914
- European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *CID* 2005,40,458-465
- http://who.int/hiv/data/2009_global_summary.png (accessed April 12, 2011)
- Lohse N, Hansen AB, Pedersen G, Kronborg G, Gerstoft J, Sorensen HT, et al. Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Ann Intern Med*. 2007;146:87-95
- Mandelbrot L, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Benifla JL, Delfraissy JF, Blanche S and Mayaux MJ. Perinatal HIV-1 transmission: interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *J Am Med Assoc* 1998; 280,55-60
- Manigart Y, Rozenberg S, Barlow P, Gerard M, Bertrand E, Delvigne A. ART outcome in HIV-infected patients. *Hum Reprod*. 2006;21:2935-2940
- Martinet V, Manigart Y, Rozenberg S, Becker B, Gerard M, Delvigne A. Ovarian response to stimulation of HIV-positive patients during IVF treatment: a matched, controlled study. *Hum Reprod*. 2006;21:1212-1217
- Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F, et al. Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum Reprod*. 2003;18:1244-1249
- Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Lang JM, Viville S, Favre R. Encouraging results despite complexity of multidisciplinary care of HIV-infected women using assisted reproduction techniques. *Hum Reprod*. 2005 Nov; 20(11): 3136-40. Epub 2005 Jul 8
- Prisant N, Tubiana R, Lefebvre G, Lebray P, Marcelin AG, Tribault V, Rosenblum O, Bonmarchand M, Vauthier-Brouzers D, Golmard JL, Katlama C, Poirot C. HIV-1 or hepatitis C chronic infection in serodiscordant infertile couples has no impact on infertility treatment outcome. *Fertil Steril* 2010; 93(3):1020-1023
- Red Latino Americana de Reproducción Asistida. Manual de procedimientos laboratorio de reproducción asistida. 1998 Santiago, Chile. 67
- Santulli P, Gayet V, Fauque P, Chopin N, Dulioust E, Wolf JP, Chapron C, de Ziegler D. HIV-positive patients undertaking ART have longer infertility histories than age-matched control subjects. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):507-12
- Sauer MV, Wang JG, Douglas NC, Nakhuda GS, Vardhana P, Jovanovic V, et al. Providing fertility care to men seropositive for human immunodeficiency virus: reviewing 10 years of experience and 420 consecutive cycles of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2009;91:2455-2460
- Savasi V, Ferrazzi E, Lanzani C, Oneta M, Parrilla B, Persico T. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Hum Reprod*. 2007;22:772-777
- Schackman BR, Gebo KA, Walensky RP, Losina E, Muccio T, Sax PE, et al. The lifetime cost of current human immunodeficiency virus care in the United States. *Med Care*. 2006;44:990-997
- Terriou P, Auquier P, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Cravello L, Giorgetti C, et al. Outcome of ICSI in HIV-1-infected women. *Hum Reprod*. 2005;20:2838-2843
- van Leeuwen E, Prins JM, Jurriaans S, Boer K, Reiss P, Repping S, et al. Reproduction and fertility in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Hum Reprod Update*. 2007;13:197-206

Avaliação dos Resultados de Vitriificação de Blastocistos

Outcome of Blastocysts Vitrification

Ana Márcia de Miranda Cota¹, Elisa Lopes e Lages², Hérica Cristina Mendonça¹, Ana Luísa Menezes Silva², Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral¹ e João Pedro Junqueira Caetano³

¹Membro do corpo clínico da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

²Bióloga da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

³Diretor da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

Clínica Pró-Criar / Mater Dei

Apresentado como Poster no X Congresso Geral da Rede Latinoamericana de Reprodução Assistida, RJ.

RESUMO

Objetivo: avaliar os resultados da técnica de vitriificação para o congelamento de blastocistos humanos, na Clínica Pró Criar.

Métodos: Foi realizado um estudo observacional, retrospectivo e descritivo, onde foram avaliados os prontuários das pacientes que se submeteram a um ciclo de congelamento e descongelamento de blastocistos vitriificados durante o período de janeiro/2007 a maio/2010.

Resultados: Foram avaliados 292 ciclos de congelamento e descongelamento de blastocisto, sendo que a idade média das mulheres foi de 34,35 anos. O número médio de blastocistos vitriificados/desvitriificados por paciente foi de $2,08 \pm 0,87$, totalizando 604 blastocistos descongelados. Desses embriões descongelados, 482 blastocistos sobreviveram, sendo a taxa de sobrevivência do blastocisto de 80%. Nos 269 ciclos em que houve transferência, uma média de $1,63 \pm 0,77$ blastocistos foram transferidos por paciente. Das 292 pacientes, 57,53% tiveram os blastocistos congelados no dia 5 e 42,47% tiveram o congelamento no dia 6. A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% e a taxa de gravidez clínica por transferência foi 48%. Quando realizada a comparação dos resultados segundo o dia de congelamento (dia 5 x dia 6) não foi encontrado diferença significativa em relação à taxa de gravidez.

Conclusão: Pode-se concluir que o método de vitriificação de blastocistos é uma técnica eficiente, com altas taxas de sobrevivência, possibilitando o armazenamento dos embriões excedentes com boas taxas de gravidez em ciclos de descongelamento.

Palavras-Chaves: vitriificação, blastocisto, congelamento

ABSTRACT

Objective: 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 $2,08 \pm 0,87$, totalizing 604 defrosted blastocyst. 482 blastocyst had survived, with a survival rate of 80%. The average number of blastocyst trans-

ferred 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.

Keywords: vitrification, blastocyst, cryopreservation

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas houve um grande avanço na área de criobiologia, principalmente no que se refere ao congelamento de embriões (Fuller and Paynter, 2004). Isso ocorreu devido a uma grande demanda na área de reprodução assistida sobre o destino dos embriões excedentes. Como não é possível transferir todos os embriões gerados devido ao risco de gestação múltipla e, eticamente não se descarta embriões viáveis, o armazenamento desses embriões excedentes se faz necessária. A criopreservação possibilita uma solução para esse problema, e também permite outras tentativas de gravidez com somente um ciclo de indução e punção folicular. Outra vantagem do programa de congelamento de embriões é reduzir os riscos da síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO), através da não transferência dos embriões à fresco nesse ciclo, congelando-os para uma transferência futura (Michelmann and Nayudu, 2006). Assim, o congelamento de embriões permite um aprimoramento e um aumento na segurança das técnicas de reprodução assistida, se tornando uma estratégia terapêutica de extrema importância nas clínicas de reprodução assistida

O primeiro relato de congelamento de embriões de mamífero bem sucedido foi em 1972 (Whittingham et AL., 1972, Wilmut, 1972). Os primeiros nascimentos de crianças originadas de embriões congelados ocorreram em 1983 e 1984 (Trounson and Mohr, 1983, Zeilmaker et AL., 1984) já tendo nascido inúmeros bebês, em todo o mundo, decorrentes desse procedimento (Choi et al., 2000, Yokota et AL., 2001, Mukaida et AL., 2001, Vanderzwalmen et AL., 2002, Son et al., 2003).

Outro grande desafio na reprodução assistida é a tentativa de se minimizar a incidência de gestação múltipla secun-

dária aos tratamentos. Assim, nas técnicas de fertilização *in vitro*, têm-se tentado cada vez mais a transferência de um embrião único (Dare et al., 2004). E a forma para se conseguir isso é a transferência de embriões no estágio de blastocisto, pois assim, há uma melhor seleção embrionária. Normalmente, a transferência dos embriões ocorre no estágio de clivagem. No entanto, o genoma do embrião só é ativado após o terceiro dia do seu desenvolvimento. Assim, quando se adia a transferência dos embriões para o quinto dia (estágio de blastocisto) há uma melhor seleção dos embriões, pois há a transição do genoma materno para o embrionário, o que permite uma melhor avaliação e a transferência de um menor número de embriões (Rijinders and Jansen, 1998).

Há basicamente duas técnicas de criopreservação de blastocistos: congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento é a técnica mais utilizada para a criopreservação de embriões, principalmente para os embriões no estágio de clivagem. No entanto, esse método não é tão eficiente para a criopreservação de blastocisto. Os blastocistos congelados pela técnica lenta apresentam uma baixa taxa de sobrevivência (Yeoman et al., 2001), o que fez com que a transferência desses embriões não fosse utilizada rotineiramente pelas clínicas de reprodução.

No entanto, hoje com o desenvolvimento da vitrificação essa situação vem sendo modificada. A vitrificação é uma técnica mais eficiente, rápida, segura e barata para armazenar os embriões (em qualquer estágio de desenvolvimento) (Kuwayama et al., 2005, Stehlik et al., 2005). Desta forma, a vitrificação vem substituindo por completo o congelamento lento (Mukaida et al., 2004, Huang et al., 2005, Vatja, 2006, Liebermann and Tucker, 2006, Stachecki et al., 2008).

O objetivo desse estudo é avaliar os resultados da técnica de vitrificação para o congelamento de blastocistos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo e descritivo desenvolvido na Clínica Pró Criar/Mater Dei, onde foram avaliados os prontuários de 292 pacientes que se submeteram a um ciclo de congelamento e descongelamento de blastocistos vitrificados segundo a técnica de S³ Vitrification durante o período de janeiro/2007 a maio/2010. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei.

Para o congelamento, os embriões que alcançassem no 5º ou 6º dia o estágio de blastocisto eram classificados de acordo com a sua morfologia segundo os critérios de Gardner e colaboradores (Gardner et al., 2000):

1. blastocisto inicial: apresenta pequena cavidade que ocupa menos de 50% do volume total do embrião.
2. blastocisto: apresenta blastocele que representa, pelo menos, 50% do volume total do embrião (aqui, o trofocotoderma e a massa celular interna são bem definidos).
3. blastocisto expandido: a blastocele preenche todo o embrião.
4. blastocisto totalmente expandido: apresenta blastocele totalmente expandida, o que resulta no aumento do diâmetro do embrião em relação ao seu tamanho inicial e um afinamento da zona pelúcida.
5. blastocisto em eclosão: observa-se o trofocotoderma eclodindo através da zona pelúcida.
6. blastocisto eclodido: blastocisto completamente fora da zona pelúcida.

Apenas os blastocistos excedentes que apresentassem a blastocele bem formada, trofocotoderma e massa celular interna bem distintos no 5º ou 6º dia eram então vitrificados pela técnica S³ Vitrification (Stachecki et al., 2008). A técnica consiste em 3 etapas onde o embrião passava

por uma série de 3 soluções compostas por meio PBS (Phosphate-buffered saline solution, Gibco) suplementado com albumina sérica humana (HSA, Irvine) e com crioprotetores penetrantes (ou permeáveis), glicerol (Sigma) e etileno glicol (Sigma) em concentrações crescentes. Os embriões eram expostos à primeira solução por 5 minutos, depois transferidos para a segunda solução por mais 5 minutos e, finalizando na terceira solução, onde imediatamente eram colocados em uma palheta (0,25 cc) que era selada termicamente nas duas extremidades. Uma vez carregadas e seladas, as palhetas eram resfriadas sob vapor de nitrogênio à uma temperatura de -100°C por 2 minutos antes de serem submersas em nitrogênio líquido. Na desvitrificação, as palhetas, imediatamente após serem retiradas do nitrogênio líquido, eram expostas à temperatura ambiente por 5 segundos e, em seguida, submersas em água destilada à 20°C por 10 segundos. Após este processo, os embriões passavam por uma série de 5 soluções por 5 minutos em cada. As concentrações de sucrose em cada solução eram cada vez mais reduzidas para remoção dos crioprotetores. Após toda a remoção destes crioprotetores, os blastocistos eram lavados e cultivados em meio de cultivo Global (Global® - LifeGlobal) suplementado com HSA, à 37°C e 5,5% de CO₂, por um intervalo de 1 a 4 horas, antes de serem transferidos. No ciclo de transferência do(s) blastocisto(s) descongelado(s), as pacientes recebiam 6mg de estradiol (Estrofem®, Novo Nordisk) por dia, a partir do primeiro dia da menstruação para o preparo endometrial. Em torno do 10º ao 14º dia de uso de medicamento era realizado uma ultrassonografia endovaginal para avaliação da espessura endometrial. Quando visualizado um endométrio com espessura ≥ 8mm, era iniciado a progesterona micronizada 900mg/dia, via vaginal. A transferência do embrião era programada então para 5 dias após o início da progesterona.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliação de variáveis quantitativas. Para verificar a associação de frequências foi utilizado o teste de Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram avaliados, retrospectivamente, 292 ciclos de congelamento e descongelamento de blastocisto, sendo que a idade média das mulheres foi de 34,35 anos. O número médio de blastocisto vitrificados/desvitrificados por paciente foi de 2,08 ± 0,87 (variando de 1 a 7 blastocis-

Tabela 1. Comparação entre os resultados do descongelamento do dia 5 versus dia 6

	Dia 5	Dia 6	P-valor
Idade (em anos) (média ± DP)	34,08±5,48	34,71±5,12	0,16
Número de blastocistos congelados (média ± DP)	2,14±0,96	1,98±0,73	0,36
Número de blastocistos descongelados (média ± DP)	1,69±0,81	1,67±0,84	0,89
Número de blastocistos transferidos (média ± DP)	1,63±0,75	1,62±0,79	0,96
Taxa de sobrevivência	77%	83%	0,30
Taxa de gravidez	54,11%	49,04%	0,50
Taxa de gestação múltipla	26,32%	12,5%	0,13

tos), totalizando 604 blastocistos descongelados. Desses embriões descongelados, 482 blastocistos sobreviveram (média de $1,68 \pm 0,82$). A taxa de sobrevivência do blastocisto ao congelamento e descongelamento foi de 80%.

Dos 292 ciclos de descongelamento, não houve transferência embrionária em 23 casos, devido ao fato de não haver embriões disponíveis. Nos 269 ciclos em que houve transferência, uma média de $1,63 \pm 0,77$ blastocistos foram transferidos por paciente.

Das 292 pacientes, 57,53% tiveram os blastocistos congelados no dia 5 e 42,47% tiveram o congelamento no dia 6. A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% (130 gestações em 292 ciclos de descongelamento). A taxa de gravidez clínica por transferência foi 48% (130 gestações em 269 ciclos de descongelamento com transferência). A taxa de implantação foi de 30,5%. Das 130 gestações: 79% (103) gestação única, 20,2% (26) gestação gemelar e 0,8% gestação tripla (1).

Quando realizada a comparação dos resultados segundo o dia de congelamento (dia 5 x dia 6), não foi encontrada diferença significativa em relação à taxa de gravidez (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A fertilização *in vitro* é uma das técnicas mais bem sucedidas e tem sido amplamente utilizada no tratamento da infertilidade. Entretanto, com o uso das gonadotrofinas na hiperestimulação ovariana, um maior número de óvulos é obtido e consequentemente, há uma maior disponibilidade de embriões viáveis para a transferência. Com o avanço do cultivo celular, houve uma melhora nas taxas de implantação o que acabou gerando um aumento nas taxas de gravidez múltipla. Assim, a gemelaridade, associada ao aumento do risco tanto para os fetos quanto para a mãe, é uma das complicações das técnicas de reprodução assistida que deve ser evitada. A fim de se reduzir o número de embriões transferidos sem, contudo diminuir a taxa de gravidez tem-se optado por prolongar o tempo de cultivo embrionário até o estágio blastocisto, conseguindo dessa forma, uma melhor seleção embrionária. Assim consegue-se diminuir o número de embriões transferidos, permitindo até a transferência de um embrião único, mantendo-se boas taxas de gravidez, além de permitir uma redução na taxa de gestação múltipla. A partir daí, o congelamento de blastocistos passou então a ser uma necessidade. Além do mais, quando se congela embriões apenas no estágio de blastocisto, o número de embriões excedentes se reduz, permitindo um aumento na capacidade de armazenamento do laboratório e uma melhor seleção dos embriões a serem guardados e transferidos futuramente.

As técnicas de criopreservação de blastocistos têm evoluído e a vitrificação tem mostrado melhores resultados. A vitrificação consiste em expor o embrião em pequenos volumes de soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguido de um rápido congelamento em nitrogênio líquido, o que permite uma desidratação rápida das células, fazendo com que elas entrem em um estado solidificado, evitando assim, a formação de cristais de gelo intracelular. Os estudos clínicos mostram excelentes taxas de sobrevivência dos embriões e de gestação ((Kuwayama et al., 2005, Youssry et al., 2008). A taxa de sobrevivência dos blastocistos vitrificados neste estudo foi de 80% comprovando a alta eficiência da técnica S³ Vitrification. Em um estudo do nosso grupo publicado em 2009 (Moraes et al., 2009) foi demonstrado uma taxa de sobrevivência menor (58%) do que no estudo atual, demonstrando uma melhora da técnica com a curva de aprendizado. No entanto, a taxa de sobrevivência de

80% está um pouco inferior a taxas apresentadas por outros autores (Kuwayama et al., 2005, Bernal et al., 2008, Loutradi et al., 2008).

A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% e a de gravidez clínica por transferência foi 48%, semelhante ao descrito por alguns autores (Liebermann et al., 2006, Mukaida et al., 2008). No entanto, essa taxa de gravidez é superior ao descrito por Liebermann et al., (taxa de gravidez de 42,9%) (Liebermann, 2009), Cho et al., (34%) (Cho et al., 2002) e Mukaida et al., (37%) (Mukaida et al., 2003) e inferior ao descrito por Osada et al., (56%) (Osada et al., 2003), Stehlik et al., (50%) (Stehlik et al., 2005) e Kuwayama et al., (53%) (Kuwayama et al., 2005).

A blastulação dos embriões humanos ocorre usualmente no dia 5 após a fertilização, mas pode atrasar até o dia 6. Vários estudos demonstraram que a transferência a fresco no dia 5 resulta em maiores taxas de gravidez do que a transferência a fresco de blastocisto no dia 6 (Osada et al., 2003, Shapiro et al., 2001, Barrenetxea et al., 2005). Entretanto, em avaliação do nosso grupo publicada em 2009 (Moraes et al., 2009), a transferência de blastocistos vitrificados/desvitrificados no dia 6 resultou em taxas de gravidez semelhantes às do dia 5, estando de acordo com o encontrado no presente estudo. Isto provavelmente se deve à melhor sincronia endométrio-embrião que é obtida com o preparo endometrial nos ciclos de transferência de blastocistos criopreservados (Kader et al., 2009). No estudo de Stehlik et al., 2005 (Stehlik et al., 2005) as taxas de gravidez foram maiores na transferência dos blastocistos vitrificados no dia 5 do que no dia 6, entretanto sem diferença estatística (50% dia 5 x 33% dia 6), assim como no estudo de Liebermann e Tucker, 2006 (48,7% de gravidez dia 5 x 42,8% dia 6). O mesmo ocorreu em nosso estudo, onde a taxa de gravidez foi maior dia 5 que dia 6 (54,1% x 49,04%), mas sem diferença estatística, confirmando os dados da literatura.

Estes resultados mostram que a vitrificação é uma excelente técnica e que os blastocistos têm uma alta taxa de sobrevivência e implantação após o descongelamento e transferência, podendo substituir o congelamento lento como já sugerem outros estudos (Stehlik et al., 2005). Existem várias técnicas de vitrificação. A S³ Vitrification, técnica utilizado neste estudo, é uma técnica rápida, de fácil execução, além de não utilizar o DMSO como crioprotetor. Nossos resultados de gravidez são satisfatórios e promissores. Portanto, pode-se concluir que o método de vitrificação de blastocistos é uma técnica eficiente, com altas taxas de sobrevivência, possibilitando o armazenamento dos embriões excedentes com boas taxas de gravidez em ciclos de descongelamento.

Endereço para Correspondência:

Rua Alvarenga Peixoto, 1329 Santo Agostinho BH - MG
Tel: (31) 3292 - 5299 FAX: (31) 3292 5299
e-mail: anamarcia.cota@procriar.com.br

Referências bibliográficas

- Barrenetxea G, Larruzzea AL, Ganzabal T, Jiménez R, Carbonero K and Mandiola M. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril*. 2005; 83:49-53.
- Bernal DP, Chang CC, Colturato LF, et al. Evaluation of blastocyst recuperation, implantation and pregnancy rates after vitrification/warming or slow freezing/thawing cycles. *Fertil Steril*. 2008; 90:S277-S278.
- Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH: An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 2002, 17:2419-2422.
- Choi DH, Chung HM, Lim JM, et al. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified human blastocysts.

- Fertil and Steril. 2000;74:838-839.
- Dare MR, Crowther CA, Dodd JM, Norman RJ. Single or multiple embryo transfer following in vitro fertilization for improved neonatal outcome: a systematic review of the literature. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004;44(4):283-291.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:680-691.
- Gardner DK, Lane M, Stevens JMT, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil and Steril.* 2000;73(6):1155-1158.
- Huang CC, Lee TH, Chen SU et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod.* 2005;20:122-128.
- Kader AA, Choi A, Orief Y and Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:99.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O: Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005, 11:608-614.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:300-8.
- Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil and Steril.* 2006;86(1):20-26.
- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: An update. *Reprod Biomed Online* 2009, 19(Suppl 2).
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril.* 2008; 90:186-193.
- Michelmann HW, Nayudu P. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank* 2006; 7:135-141.
- Moraes LAM, Aguiar LPT, Lamaita RM, Marinho RM, Caetano JPJ. Comparação de resultados obtidos com uma nova técnica de vitrificação de blastocistos e com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo. *JBRA.* 2009;13:16-10.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil and Steril.* 2001;76:618-620.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2004;18:384-391.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2003, 18:384-391.
- Mukaida T, Takahashi K, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 7 year experience (2670 attempted cycles). *Hum Reprod.* 2008, 23:48.
- Osada H, Aono F, Kuwayama M, Morita H, Teramoto S, Kato O. Clinical efficiency of vitrification on blastocysts transfer cycles. *Fertil Steril.* 2003, 80:S63-S63.
- Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13:2869-2873.
- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC and Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril.* 2001; 75:1126-1130.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ et al. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod.* 2003;18:137-139.
- Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, et al. A new safe, simple, and successful Vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2008;17.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer K, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(1):53-57.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305:707-709.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod.* 2002;17:744-751.
- Vatja G. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6):779-796.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and - 269°. *Science.* 1972;178:411.
- Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 1972;11:1071.
- Yeoman RP, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning A A, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod.* 2001;16:1965-1969.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, et al. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil and Steril.* 2001;75:1027-1029.
- Yousry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, Al-Hasani S. Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16:311-320.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293-296.

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.

Use of Dyes Like Diff-Quik to Assess the Integrity of Sperm Chromatin and its Relation to Human Sperm Processing, Fertilization, Cleavage and Pregnancy.

Franco GRR¹; Franco ACC¹

¹Embryolife - Instituto de Medicina Reprodutiva, São José dos Campos, SP, Brasil.

Trabalho apresentado no X Congresso Geral da RED Latinoamericana de Reprodução Assistida – Rio de Janeiro - Maio /2011

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.

SUMMARY

Objective: In this study, the authors sought to test a simple and feasible technique, which measures the incidence of sperm with intact chromatin in a sample.

Material and method: The technique employs the type of dye kit Diff-Quik, routinely used in the analysis of sperm morphology, based on the intensity of pigmentation caused by the dye on the head of the sperm. We analyzed possible relationships between the incidence of sperm with fragmented chromatin and fertilization, cleavage and pregnancy.

Results: Corroborating previous studies, significant relationships were observed in the rates of fertilization and cleavage, yielding a level of 30% as the limit of sperm with fragmented chromatin in the sample.

Conclusion: This methodology was feasible to be used in routine laboratory, making it faster and cheaper the

analogy of a predictive importance of seminal parameter and its plausible influence on the results of AHR.

Keywords: Chromatin, Sperm, Fertilization, Cleavage, Diff-Quik.

INTRODUÇÃO

O papel do espermatozoide como um gameta funcional depende de vários fatores, entre os quais, a integridade do DNA nuclear, que é necessária para a transmissão da informação genética paterna. Estudos diversos têm indicado que existe uma relação entre a integridade do DNA espermático e os resultados de fertilização (Agarwal & Allamanehi, 2004; Sharma et al., 2004; O'brien & Zini, 2005; Spano et al., 2005; Li et al., 2006; Shamsi et al., 2008).

A fragmentação do DNA, tem sido apontada como um importante marcador de infertilidade masculina (Evenson et al., 2002; Bungun et al., 2004; Erenpreiss et al., 2008) e amostras seminais de homens inférteis, parecem apresentar níveis de danos no DNA significativamente mais altos em relação a doadores férteis (Chohan et al., 2006). Os danos no DNA espermático, têm sido detectados utilizando-se uma variedade de ensaios (Evenson et al., 2002; Sharma et al., 2004; Agarwal & Allamanehi, 2005), tais como *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) (Evenson et al., 1980), teste de Laranja de Acridina (Tejada et al., 1984), *Single Cell Gel Electrophoresis Assay* (COMET) (Aravindan et al., 1997), *in situ Nick Translation Assay* (Gorczyca et al., 1993), e *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUDP Nick-End Labelling Assay* (TUNEL) (Sailer et al., 1995). Através destes testes, têm sido feitas tentativas para estabelecer valores limites para a porcentagem de espermatozoides com danos no DNA, acima dos quais a fertilidade seria afetada. A avaliação do status do DNA, aparenta ser de importância para uma estimativa completa da qualidade espermática. No entanto, a maioria destas técnicas, consomem tempo e/ou envolvem protocolos elaborados, reagentes e equipamentos sofisticados (microscopia de fluorescência e citometria de fluxo) os quais não são comuns nos laboratórios de andrologia padrão.

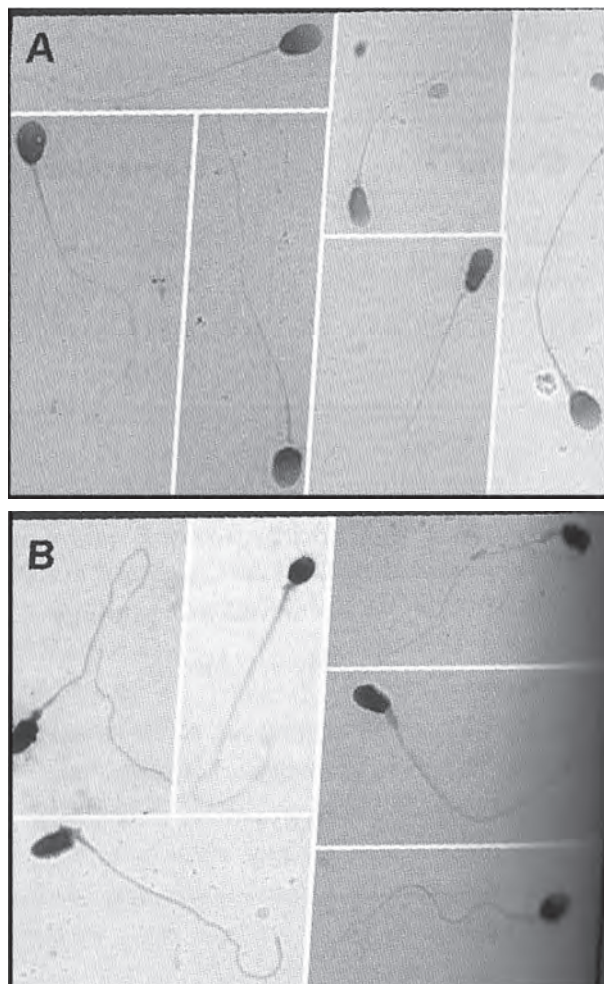


Figura 1. Espermatozoides com pigmentação cabeça/núcleo leve (A), espermatozoides com pigmentação cabeça/núcleo intensa (B).

Embora casos específicos possam justificar uma análise mais detalhada, é improvável que a maioria dos laboratórios introduza a avaliação do status do DNA espermático como um parâmetro de rotina na avaliação seminal (Perreault et al., 2003).

Recentemente foi desenvolvido um método simples e rápido de monitorar o status da cromatina espermática em animais selvagens em condições de campo (Mota et al., 2006). Este ensaio utilizava um corante do tipo Diff-Quik, baseando-se nos níveis de pigmentação nuclear. Espermatozoides com a cabeça/núcleo normal, apresentavam pigmentação na cabeça/núcleo leve, enquanto espermatozói- de com fragmentação do DNA, apresentavam a cabeça/ núcleo com uma pigmentação mais escura. Embora haja diversos kits desse tipo de corantes disponíveis no mercado, o protocolo sempre consiste na fixação pelo metanol, seguido de uma exposição à eosina, e por fim à tiazina.

Por este motivo, o presente estudo foi conduzido com propósito de avaliar a integridade da cromatina espermática, através de uma técnica simples e factível em todo laboratório de andrologia padrão, relacionando seus achados com as taxas de fertilização, clivagem e gravidez.

METODOLOGIA

As amostras de esperma humano, foram obtidas de pacientes durante o tratamento pela técnica de ICSI em nossos laboratórios. Um total de 47 casos foram avaliados. Para a coloração das lâminas, foram utilizados corantes do tipo Diff-Quik®, de acordo com o seguinte proto-

colo: fixação pelo metanol, seguido de uma exposição seqüencial à eosina e o corante tiazina. A preparação das lâminas, consistiu em 10µl da amostra espermática em esfregaço, e posterior exposição ao ar para secagem. Posteriormente, foram imersas nos corantes, seqüencialmente por 10 a 20 segundos em cada solução do kit e em seguida transpostas rapidamente na água, para remover o excesso de corante.

Foram preparadas lâminas com amostra seminal inicial (a fresco) e também com o sêmen pós-processado, através da técnica de gradiente de densidade

O estudo de cada lâmina foi feito, levando-se em conta duas categorias de espermatozoides corados: **A (Ctg.A)** - espermatozoides com a cabeça/núcleo normal, ou seja, os que apresentavam pigmentação na cabeça/núcleo leve e **B (Ctg.B)** - espermatozoides com cabeça/núcleo com fragmentação no DNA, na qual a cabeça/núcleo apresentava uma pigmentação intensa (FIG. 1). Duzentas células foram contadas em cada lâmina, separando-se os espermatozoides em uma das duas categorias descritas acima. Os dados estatísticos foram examinados com auxílio do software SPSS 8.0®, sendo empregadas análises de dispersão e regressão linear.

RESULTADOS

De acordo com a tabela 1, a incidência de espermatozoides **Ctg.B**, é maior nas amostras estudadas a fresco do que nas amostras estudadas após o processamento seminal. No geral, houve diminuição de 31,2% de espermatozoides **Ctg.B** na amostragem pós processamento.

Tabela 1. Incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**) na amostragem pré processamento (%) X Incidência de espermatozoides com cromatina não integra na amostragem pós processamento (%)

PRÉ	PÓS
1077	741

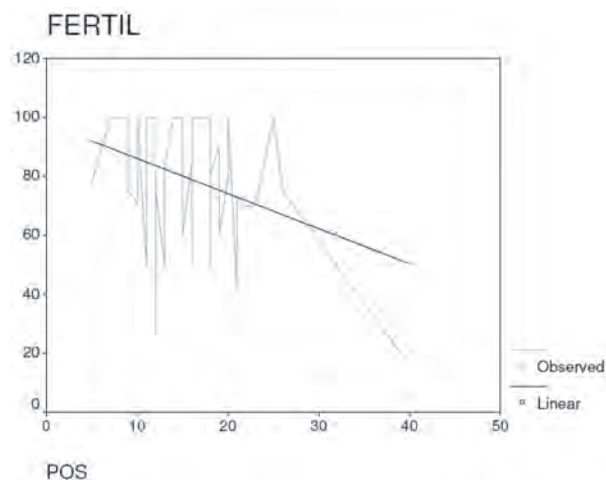


Gráfico 1: Incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**) (%) X Fertilização (%)

O gráfico 1 ilustra no eixo x, a incidência de espermatozoides com cromatina não integrada (**Ctg.B**), em analogia às taxas de óocitos fertilizados (eixo y).

De acordo com o teste de regressão linear mostrado acima, há uma relação negativa entre taxas altas de fragmentação do DNA espermático e fertilização oocitária, ou seja, quando a incidência de espermatozoides **Ctg.B** foi menor, houve um aumento nas taxas de fertilização.

Nota-se ainda que, em casos onde a incidência de espermatozoides **Ctg.B** ficou ao redor de 20%, a fertiliza-

ção atingiu taxas próximas a 80%. A partir dos 30% de espermatozoides **Ctg.B**, as taxas de fertilização se apresentam progressivamente piores e declinantes no gráfico.

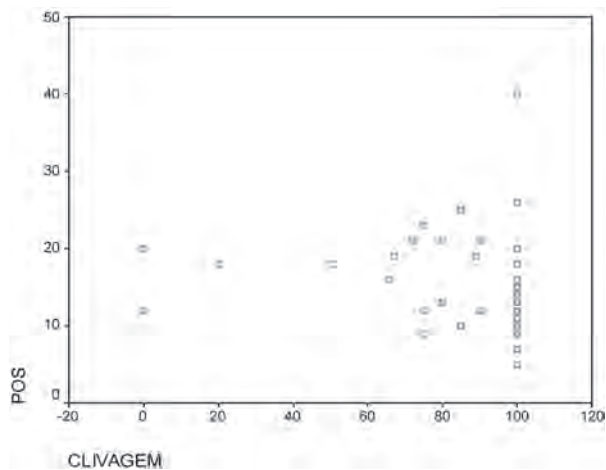


Gráfico 2: Incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**) (%) X Clivagem (%)

O gráfico 2 mostra no eixo y, a incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**), em analogia às taxas de clivagem embrionárias (eixo x).

De acordo com o teste de dispersão ilustrado, há uma relação negativa entre taxas altas de fragmentação do DNA espermático e clivagem embrionária. É possível notar uma concentração de pontos circunscritos em área representativa, onde a baixa incidência de espermatozoides **Ctg.B** indicam melhores taxas de clivagem.

Evidencia-se também que, valores da **Ctg.B** abaixo de 20%, correspondem a taxas de clivagem próximas a 100%. Ou seja, quando a incidência de espermatozoides **Ctg.B** foi menor, a clivagem embrionária aumentou.

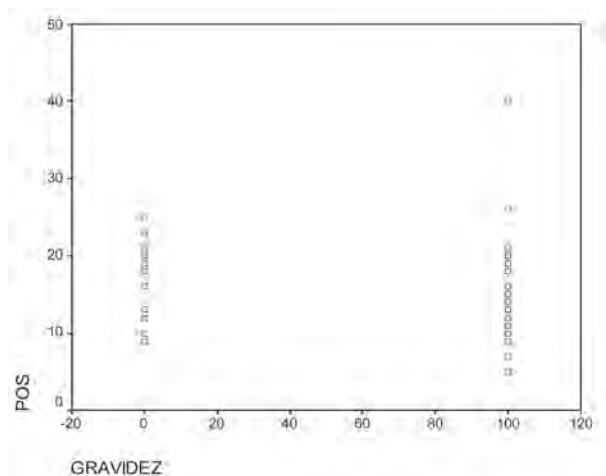


Gráfico 3: Incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**) (%) X Gravidez

O gráfico 3 mostra no eixo y, a incidência de espermatozoides com cromatina não integra (**Ctg.B**), em relação às gravidezes (eixo x), sendo 0 não-grávidas e 100 grávidas. De acordo com este teste estatístico de dispersão, não houve uma relação significativa entre taxas de fragmentação do DNA espermático e gravidez. Pode-se observar que a distribuição dos pontos em área representativa se equiparam nos dois grupos (grávidas e não-grávidas).

DISCUSSÃO

Os parâmetros seminais usualmente avaliados na rotina de laboratório de Andrologia em clínicas de Reprodução Humana Assistida (RHA), não examinam o status da cromatina espermática portanto, homens com DNA espermático anormal, podem apresentar espermograma normal (Agarwal & Allamaneni, 2004; Alvarez, 2003). Assim, não está sendo avaliado um importante parâmetro seminal, certamente relevante para o monitoramento da gametogênese e com possível influência nos resultados em RHA. (O'Brien & Zini, 2005; Spano et al., 2005; Li et al., 2006). Diversos estudos têm utilizado testes para analisar a integridade do DNA (Sharma et al., 2004, Evenson et al., 2002; Agarwal & Allamaneni, 2005; Fernandez et al., 2003), embora o que esteja sendo monitorado, pode ser mais bem definido como 'status da cromatina' ao invés de 'status do DNA'. Apesar dos seus possíveis valores clínicos, as técnicas para este tipo de análise são caras, consomem tempo, envolvem protocolos complexos, reagentes e equipamentos não disponíveis na maioria das clínicas de RHA. Portanto, para que seja possível o recrutamento desse tipo de análise rotineiramente, os laboratórios terão de contar com metodologia simples e factível (Perreault et al., 2003). O presente estudo sugere um simples, barato e rápido método que avalia o status da cromatina espermática, utilizando qualquer corante do tipo Diff-Quik, empregado no estudo da morfologia espermática.

Foi observado durante a pesquisa deste trabalho, a diminuição da incidência de espermatozoides com cromatina fragmentada, após o processamento seminal por gradiente de densidade. Este achado, reforça a eficiência e os benefícios do emprego do processamento seminal na melhora dos parâmetros seminais (WHO, 1999), inclusive na seleção de gametas seguros para casais sorodiscordantes (Queiroz, 2008).

Uma correlação significativa foi notada nas taxas de fertilização e clivagem embrionária em relação à incidência de espermatozoides com cromatina íntegra, divergindo de alguns estudos (Souza et al., 2009; Host et al., 2000; Larson-Cook et al., 2003, Henkel et al., 2004) e corroborando com outros trabalhos diversos (Sun et al., 1997; Lopes et al., 1998; Benchaib et al., 2007; Velles et al., 2007). Levando-se em conta que o genoma paterno é somente ativado 2 dias após a fertilização (Braude et al., 1988), o status do DNA espermático não deveria influenciar neste evento. No entanto, confirmando achados anteriores (Morris et al., 2002; Tesarik et al., 2004), houve neste trabalho uma associação negativa entre a porcentagem de **Ctg B** e desenvolvimento embrionário. De acordo com os resultados obtidos, amostras seminais que apresentavam até 30% de espermatozoides com cromatina não-integra (**Ctg. B**), mostraram-se bons para fertilização e clivagem embrionária. Este parâmetro de 30% observado em nosso estudo, corrobora com pesquisas científicas anteriores (Evenson et al., 2002; Souza et al., 2009; Bungun et al., 2007). Múltiplos parâmetros para integridade da cromatina espermática têm sido propostos, nos termos de sua possível capacidade preditiva em RHA. Por exemplo, um limite de 20% ou mais para 'TUNEL-espermatozoide positivo' (~ **Ctg.B**), foi proposto para distinguir homens férteis de inférteis (Sergerie et al., 2005), e assim definir um mal prognóstico de gravidez (Benchaib et al., 2003). Este valor corresponde matematicamente a uma linha de corte de ~32% observado em trabalhos anteriores (Souza et al., 2009), também notado em nosso estudo. É claro que vários aspectos deverão ser validados por mais trabalhos. Outra questão importante, diz respeito ao fato de que todas as observações de microscopia óptica, podem ter algum grau de subjetividade de acordo com os critérios técnicos

de leitura. Mesmo em ensaios como TUNEL, é necessário um padrão adequado para distinguir manchas genuínas do corante, de artefatos não-específicos (Souza et al., 2009). Nossa observação indicou não haver significância entre taxas de gravidez e espermatozoides com cromatina íntegra, discordando de alguns trabalhos (Tomlison et al., 2001, Benchaib et al., 2003). Este achado pode ser decorrente das múltiplas variáveis que envolvem o processo de implantação embrionária.

Em síntese, o presente estudo procurou mostrar uma técnica simples que, utilizando corantes to tipo Diff-Quik, torna possível a avaliação rotineira do status da cromatina espermática humana, avaliando sua verdadeira importância como marcador da infertilidade masculina.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos a Luis Guilherme Franco Pires de Campos, pela consultoria matemática e estatística, essencial para realização do presente estudo.

Endereço para Correspondência:

Franco GRR, 55 (12) 3923 2659, www.embryolife.com
e-mail para contato : guilherme@embryolife.com, franco@embryolife.com

Referências

Agarwal A, Allamaneni SS. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes, a review. *Minerva Ginecol* 2004; **56**: 235-245.

Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005; **84**: 850-853.

Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol* 2003; **55**: 233-239.

Aravindan GR, Bjordhal J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm *in situ* DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res* 1997; **236**: 231-237.

Benchaib M, Braun V, Lournaje J, Haji S, Salle B, Lejeune H, Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rates in an assisted reproductive technique. *Human Reprod* 2003; **18**: 1023-1028.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reprod* 2003; **18**: 1023-2028.

Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, Francois Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* 2007; **87**: 93-100.

Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; **332**: 459-461.

Bungun M, Humaidan P, Spano M, Jepsen K, Bungun L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of IUI, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; **19**: 1401-1408.

Bungun M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungun L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reprod* 2007; **22**: 174-179.

Chohan KR, Griffin JT, Lafroboise M, De Jonge CJ, Carrel DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; **27**: 53-59.

Erenpreiss J, Elzanat S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from sperm infertile couples. *Asian J Androl* 2008; **10**: 786-790.

Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Malamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; **210**: 1131-1133.

Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; **23**: 25-43.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vasquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; **24**: 59-66.

Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* denaturation in abnormal human sperm cells: analogy

to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 202-205.

Henkel R, Hajimohammad M, Staf T, Hoogendik C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril* 2004; **81**: 965-972.

Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization *in vitro* in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **79**: 189-193.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperon KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; **80**: 895-902.

Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2006; **23**: 367-376.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in ICSI. *Fertil Steril* 1998; **69**: 528-532.

Morris ID, Illott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet Assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reprod* 2002; **17**: 990-998.

Mota PC, Ramalho-Santos J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as simple optical technique to assess changes in the DNA feline epididymal sperm. *Theriogenology* 2006; **65**: 1360-1365.

O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 2005; **65**: 16-22.

Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, Morris ID, Morris RA, Robbins WA, Sakkas D. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 2003; **518**: 253-268.

Queiroz P, Tanil CT, Madaschi C, Lopes DR, Iaconelli Junior A, Pasqualotto FF, Firmbach F, Borges Junior B. Safe gemetes acquisition through association of seminal processing techniques with HIV serodiscordant couples. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; **30**: 171-176.

Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to *in situ* denaturation associated with presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; **16**: 80-87.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reprod* 2005; **20**: 3446-3451.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008; **127**: 115-123.

Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; **6**: 139-148.

Souza APM, Tavares RS, Calle JFV, Figueredo H, Almeida V, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Dual use of Diff-Quik-Like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reprod* 2009; **24**: 28-36.

Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005; **17**: 255-260.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997; **56**: 602-607.

Tejada RI, Mitchel JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; **42**: 87-91.

Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reprod* 2004; **19**: 611-615.

Tomlison MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnam M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reprod* 2001; **16**: 2160-2165.

Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A, Ramalho-Santos J. Characterization of human sperm population using conventional parameters, surface ubiquitination and apoptotic markers. *Fertil Steril* 2007; **87**: 572-583.

Velles de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Gimenez C, Wittemer C, Thonneau P. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 2007, doi:10.1016/j.fertnstert.2007.09.021.

WHO. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Cambridge University Press*, 1999.

Polymorphism A1298C in 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) Gene: A New Marker for Ovarian Reserve?

Polimorfismo A1298C no Gene 5,10-Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*): Um Novo Marcador da Reserva Ovariana?

Raphaella P dos Santos¹; Joji Ueno²; Mariana Angelozzi de Oliveira²; Luciana Francisco Semião²; Ricardo M de Oliveira²; Ciro Dresch Martinhago².

¹Cell Therapy Center, Unit of Clinical Research, University Hospital Antonio Pedro, Fluminense Federal University, Niteroi, RJ, Brazil.

²RDO –Medical Diagnosis, São Paulo, SP, Brazil.

Trabalho apresentado no X Congresso Geral da RED Latinoamericana de Reprodução Assistida – Rio de Janeiro - Maio /2011

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, polymorphism *MTHFR*.

RESUMO

Objetivo: Verificar se o polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* está ou não associado com a diminuição da reserva ovariana. **Métodos:** Foram obtidas amostras de sangue periférico de 164 pacientes do sexo feminino e os genótipos do *MTHFR* foram comparados ao hormônio anti-mulleriano assim como o FSH, LH e inibina B.

Resultados: As amostras foram divididas da seguinte forma: 84 amostras de não-portadores para o polimorfismo A1298C no gene *MTHFR*, com genótipo 1298AA; 62 heterozigotos 1298AC para a mutação, e 18 apresentaram variação na forma homozigótica, o genótipo 1298CC. O valor médio mensurado para o AMH do genótipo 1298AA foi de 1,14 ng / mL; para o genótipo 1298AC foi de 0,91 ng / mL e para o genótipo 1298CC foi de 1,49 ng / mL. A correlação negativa entre o AMH e o FSH, LH e relação FSH/LH foi, como esperado. Inibina B, por outro lado, apresentou uma associação positiva com AMH, também conforme o esperado. **Conclusão:** Este estudo mostrou que, por si só o polimorfismo A1298C não parece afetar os níveis de AMH.

Palavras-chave: hormônio anti-mülleriano, FSH e LH, reserva ovariana, polimorfismo, *MTHFR*.

INTRODUCTION

Ovarian reserve is a term used to describe overall functional potential of the ovaries and reflects directly the quantity and quality of the oocytes contained within; the number of oocytes is known to declines with age, resulting in decreased female reproductive function (Maheshwari et al.,2006).

In subfertile populations, the ease and accuracy of tests for ovarian reserve could therefore provide valuable means to predict pregnancy chances for successful birth rates, either prior or post treatment,. Alternatively, it could ideally be used as a guide in choosing the most suitable gonadotrophins doses for ovarian cycle stimulation individually for each patient, according to her own specific reserve values (Coccia & Rizzello, 2008).

In this scenario, the anti-mullerian hormone (AMH) would be a putative candidate marker to evaluate ovarian reserve, since during menstruation this hormone is preserved from other influences such as the initial follicular development and also because it is not altered or modified by gonadotrophins, thus reflecting only the follicular cohort (Feyereisen et al.,2006).

A small number of genetic factors have been previously associated with response to ovarian stimulation (Perez Mayorga et al., 2000; Simoni et al., 2002). The *MTHFR* gene (OMIM, 607093) codifies the enzyme 5,10-ethylene tetrahydrofolate reductase, and is located in the short arm of the chromosome 1 (1p36.3). This enzyme catalyses the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) to 5 methyltetrahydrofolate (5-MTHF), the most important form of circulant folate. Folate itself is implicated in many biochemical pathways, including the remethylation of homocysteine to methionine, an important step in metabolic pathways that regulates nucleoside biosynthesis. Also present in the methylation of proteins, lipids and DNA (Hecht et al., 2009; Altmäe et al., 2010). Folate is one of the B complex vitamins believed to be essential in reproduction not surprisingly due to folate metabolism involvement in several physiological and pathophysiological processes (Altmäe et al., 2010). Altmäe *et al.* (2010) reported that variations in the *MTHFR* gene may be somewhat related to female infertility. They have assumed that polymorphisms in this gene affects embryonic implantation due to alterations in homeostasis balance between hemorrhage and thrombosis. Women with 1298CC genotype variant attain spontaneous pregnancy less frequently and, when submitted to assisted reproduction techniques also present less chances of carrying a pregnancy to completion after treatment

Table 1. *MTHFR* variables and comparison between the genotypes.

Variable	<i>MTHFR</i>	Mean	DP	Median	Minimum	Maximum	N	p
Age (years)	1298AA	39,76	4,43	41	26	51	84	0,067*
	1298AC	39,32	3,97	40	27	46	62	
	1298CC	37,06	5,85	38	22	45	18	
FSH	1298AA	15,13	15,02	9	0,3	90,6	84	0,768
	1298AC	15,77	19,13	10,65	1,9	109	62	
	1298CC	12,57	10,66	8,55	4,4	46,8	18	
LH	1298AA	9,92	9,33	6,35	0,3	41,8	84	0,524
	1298AC	9,61	12,04	6,5	0,8	81,6	62	
	1298CC	7,94	6,75	5,8	2,4	30,9	18	
Relation	1298AA	1,82	1,58	1,55	0,3	12,7	84	0,822
	1298AC	1,72	0,77	1,65	0,6	5	62	
	1298CC	1,71	0,66	1,65	0,6	2,9	18	
Inhibin B	1298AA	55,55	42,73	55,75	10	194	84	0,994
	1298AC	56,49	46,99	49,75	10	277,8	62	
	1298CC	57,88	45,81	53,9	10	208,2	18	
AMH	1298AA	1,14	1,72	0,495	0,1	10	84	0,184
	1298AC	0,91	1,31	0,415	0,1	5,96	62	
	1298CC	1,49	1,45	1,285	0,1	5,44	18	

* ANOVA result

Table 2. Spearman's Matrix of correlations between the study variables.

Correlation	Age (years)	FSH	LH	Relation	Inhibin B	
FSH	r	0,186				
	p	0,017				
	N	164				
LH	r	0,098	0,688			
	p	0,212	<0,001			
	N	164	164			
Relation	r	0,143	0,455	-0,212		
	p	0,068	<0,001	0,006		
	N	164	164	164		
Inhibin B	r	-0,052	-0,283	-0,323	-0,059	
	p	0,505	<0,001	<0,001	0,457	
	N	164	164	164	164	
AMH	r	-0,218	-0,510	-0,371	-0,300	0,512
	p	0,005	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	N	164	164	164	164	164

(Rosen et al., 2007). Comcomitantly, women with higher chances of getting pregnant by FIV have elevated folate status (Haggarty et al., 2006).

The literature highlights that the *MTHFR* A1298C polymorphism, when connected to expression in cumulus cells, may also directly affect the production of the anti-mullerian hormone (Rosen et al., 2007; Altmäe et al., 2010), but there has been no consistent association or a structured study design for *MTHFR* indirect influence on ovarian function through AMH. In addition to the general lack of consensus for the election of any highly reliable markers in diagnosis, it becomes fundamental and simultaneously difficult to pinpoint confidently such markers for clinical practice. Hence, a putative genetic marker like the A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene would be desirable. Should there be an association between AMH levels and *MTHFR* genotypes It could in theory be used to predict ovarian reserve status with greater accuracy once it is not known to be influenced by inter and intracycles variabilities.

This study intends to verify the hypothesis that the A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene may be associated to alterations in AMH's levels and also if this should be true, if it may or may not be associated to a decrease on ovarian reserve as well.

MATERIALS AND METHODS

164 Samples of peripheral blood from woman, taken from patients aged between 22 to 51 who have been actively pursuing IFV or other treatments for fertility, have been analyzed in the third day of the cycle. All these female subjects, even those aged between 45 to 51 years-of-age, were assumed as non-menopausal in relation to their FSH and AMH levels. Subsequently, DNA was extracted with the use of a commercial *kit*, following manufacturer's instructions. The DNA of these patients was amplified by the PCR technique in real time using primers and probes for the AA, AC or CC 1298 genotypes. The hormonal dosage of AMH and inhibin B was performed by ELISA, while

The hormonal levels between the study group (carrier of mutations in both heterozygous and homozygous form) and controls (non-carriers of mutations in the gene) was compared by Kolmogorov-Smirnov analysis.

The statistical significance between AMH levels and *MTHFR* A1298C polymorphism was evaluated by Kruskal-Wallis test to assess the ovarian reserve (Excel, 2003; SPSS 15.0).

The hypothesis of normal distribution of the variables was accepted. Age comparison between genotypes was done using ANOVA parameters.

In order to verify or discard a relationship between AMH levels and other variables we performed: a Spearman test to calculated correlations (see results); a dispersion section to calculate AMH variability in relation to other variables by dispersion diagrams. All the statistical tests were performed within the 95% confidence level.

RESULTS

Of 164 total samples obtained, 84 carried no mutation and had the 1298AA genotype; 62 were heterozygous to the mutation with a 1298AC genotype; and 18 presented the variation in the homozygous form with a 1298CC genotype. There was no observed statistical age difference among the different genotypes, so it was not necessary to divide them according to age.

The genotypes from *MTHFR* gene were then compared with anti-mullerian hormone as well as FSH, LH and inhibin B. The variables analyzed in this study are described in Table 1 according to their *MTHFR* genotype and in comparison between the three possible genotypes. We found was no significant difference within variables among women according to their *MTHFR* genotype ($p > 0,05$).

Table 2 shows that AMH levels are inversely correlated with age ($r = -0,218$ e $p = 0,005$), for FSH ($r = -0,510$ e $p < 0,001$), LH ($r = -0,371$ e $p < 0,001$) and the FSH/LH relation ($r = -0,300$ e $p < 0,001$). However, both inhibin B and AMH appear to be directly correlated ($r = 0,512$ e $p < 0,001$).

DISCUSSION

It was observed in this study that there seems to be no statistical significance between the *MTHFR* genotypes and anti-mullerian hormone levels alone. However, the relationship between *MTHFR* genotype and AMH showed to be the closest related among all the analyzed variables ($p=0,184$), which could be an indication of other parameters involved or even a multifactorial scenario.

Unlike what was observed in our data, a study conducted by Rosen *et al.* (2007) has demonstrated the association between the 1298AC variant of *MTHFR* with the FSH value in day 3 of the menstrual cycle. Using linear regression, the above named study noticed that women with the heterozygous genotype of the polymorphism had FSH levels three times higher than those who presented the wild type form. However and perhaps most interestingly, no relation was found with carriers of the homozygous genotype.

We have nonetheless successfully corroborated other results from other groups. The negative correlation between AMH and both FSH and LH levels has been confirmed in this study, thus corroborating Fanchin *et al.* (2003, 2005) and Eldar-Geva *et al.* (2005). The inverse relation between FSH and AMH could be caused by the direct effect of FSH in hormone secretion in cumulus cells (La Marca *et al.*, 2006).

We have also noticed that the higher the values of the inhibin B the higher the AMH levels. This data also corroborates previous studies that observed a positive relation between AMH and inhibin B levels. However, the observed correlation may not correspond to a direct relationship between these two hormones (Fanchin *et al.* 2003;2005), probably because inhibin B is dependent on gonadotrophins status, while AMH is not directly influenced. Wunder *et al.* (2008) and Muttukrishna *et al.* (2005) demonstrated independently a positive relationship between measured AMH and inhibin B levels, and the number of fertilized oocytes and successful pregnancy results.

Another study conducted by Andersen *et al.* (2008) with 43 patients has verified nonetheless, a negative correlation with AMH levels by measuring follicular fluid and inhibin B, whereas La Marca *et al.* (2006) didn't find the relation between the two hormones to be of statistical significance. This rather intriguing and somewhat contradictory literature track may also be an indication of other, underappreciated factor influencing AMH levels.

Through our study we have demonstrated that AMH levels decrease with age. This result corroborates previous investigations that associate age increase with reduction of AMH levels (De Vet *et al.*, 2002; Fanchin *et al.*, 2003; Eldar-Geva *et al.*, 2005), potentially due to a decline in ovarian function as a result from a reduction in the small antral follicles pool (Ruess *et al.*, 1996).

CONCLUSION

The present work had the objective of evaluating the relationship between anti-mullerian hormone and A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene. For all effects we have not found statistical significance in the correlation between AMH and *MTHFR* 1298 polymorphism. However, we would like to highlight that such a possibility should not be completely discarded yet because further experiments comparing both 677 and 1298 polymorphism to AMH levels might be more indicative of association or no association as the combination of these two *MTHFR* polymorphisms seems to be more directly linked to infertility than each one alone.

The search for genetic markers to evaluate the women's reproductive potential is of great interest in reproductive medicine field, such markers appear to be very promising in predicting ovarian reserve with more accuracy. For all this reason, further studies continue to be necessary to better evaluate that relation.

Endereço para Correspondência:

Dr. Ciro Dresch Martinhago.

RDO – Medical Diagnosis

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

E-mail: ciro@rdo.med.br

References

- Altmäe S, Stavreus-Everrs A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvane T, Yngve A, Salumets A, Nilsson TK. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertil Steril*. 2010; 94: 130-7.
- Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG. Concentration of anti-Mullerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 93:2344-2349.
- Coccia ME, Rizzello F. Ovarian reserve. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1127: 27-30.
- De Vet A, Laven JS, De Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77:357-362.
- Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimonl T, Gal M, Zylber-Haran E, Margalioth EJ. Dynamic assays of inhibin B, anti-Mullerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005; 20:3178-3183.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003; 18: 323-327.
- Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouye J. High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005; 20:923-927.
- Feyereisen E, Mendezlozano DH, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-Mullerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:695-703.
- Haggarty P, McCallum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, Templeton A, Haites N, Campbell D, Bhattacharya S. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367:1513-1519.
- Hecht S, Pavlik R, Lohse P, Noss U, Friese K, Thaler CJ. Common 677C-->T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects follicular estradiol synthesis. *Fertil Steril* 2009; 91:56-61.
- La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2006; 21:3103-3107.
- Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of ovarian reserve-should we perform tests of ovarian reserve routinely? *Hum Reprod* 2006; 21:2729-2735.
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2005; 112:1384-1390.
- Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3365-3369.
- Rosen MP, Shen S, McCulloch CE, Rinaudo PF, Cedars MI, Dobson AT. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 2007; 88:632-638.
- Ruess ML, Kline J, Santos R, Levin B, Timor-Tritsch I. Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:624-627.
- Simoni M, Nieschlag E, Gromoll J. Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 2002; 8:413-421.
- Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhauser MH, Bersinger NA. Anti-Mullerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008; 90:2203-2210.

Envelhecendo na Fila da Inseminação Artificial: A Realidade dos Casais Inférteis de Baixa Renda do Rio de Janeiro.

Aging in Line for Artificial Insemination: The Reality of Infertile Couples in Low-Income from Rio de Janeiro.

Tatiana Henriques Leite¹, Whitaker Jean Jaques e Silva¹, Sirlene Lucena de Moura¹, Tonia Costa¹, Marilena Cordeiro Dias Villela Corrêa², Maria do Carmo Borges de Souza¹

¹Instituto de Ginecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro,

²Instituto de Medicina Social- Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Instituição onde o trabalho foi realizado: Instituto de Ginecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

RESUMO

Objetivo: 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.

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, *timing* do HCG e resultado da capacitação espermática.

Resultados: A idade média do casal é 35,5 anos (sd=5,71) mulheres e 38,1 anos (sd=8,95) 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, 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 RJ. Paralelamente, vem sendo estabelecida fila para aquelas com indicação clínica, dentro do limite de idade.

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

ABSTRACT

Objective: To report results/consequences of homologous artificial insemination (IUI) conducted since the re-structuring of the waiting list for the procedure and the operation of the laboratory.

Methods: Cross-sectional study, a quantitative approach. Couples (74) with clinical indication for AHI between 2003 and 2010 joined the queue, prioritizing waiting time for the procedure and patient age. Results of 24 cycles

(17 women) with sperm capacitation and AHI integrated database in Excel / Office 2003 and the Special Program for Social Sciences (SPSS) version 17.0. The variables include age of the couple, cause of infertility, number and size of follicles after ovulation induction, gonadotropin dose, timing of HCG and the result of sperm capacitation. Results: The mean age of the couple is 35.5 years (sd = 5.71) women versus 38.1 years (sd = 8.95) men. Of the 17 women who underwent IUI, nine (54.9%) were aged 35 years. Of the 24 cycles performed, 12 (50%) were in patients over 35 years. Some, for lack of financial resources to fund treatment in the private sector and transport and accommodation in other states, simply aged in line. **Conclusions:** Age of the patients harms the success rate of pregnancies expected to IUI. There is also concern that the demand of the reproductive will increase too much as it easily will channel all patients with IUI/ SUS indication from RJ. In parallel, it has been established a new line for those with clinical indication, within the age limit.

Keywords: infertility - homologous artificial insemination - age - access to assisted reproduction

INTRODUÇÃO

Em setembro de 2010 foi inaugurado laboratório de sêmen em hospital universitário, referência em Reprodução Humana. O laboratório tem por finalidade atender a demanda do serviço de média complexidade em reprodução assistida por meio da técnica de inseminação artificial homóloga (IAH). Embora no Brasil a Portaria Nº 426/GM/2005 (BRASIL, 2005) estabeleça a implantação da Política Nacional de Reprodução Assistida (RA) em todas as unidades federadas (Art. 1º), o serviço é o primeiro no estado do Rio de Janeiro a ser oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Desigualdades de direitos vivenciadas por pessoas de diversas estratificações sociais na busca por concepção são evidenciadas por meio do perfil das mães brasileiras (Censo 2000 – IBGE) (BRASIL, 2008) e de dados da Rede Latino Americana de Reprodução Assistida (RedLARA), que em 2005 registrou 45% do total de ciclos (11.859 ciclos) em território brasileiro, a maioria no setor privado (Souza, 2008).

O hospital universitário recebe prioritariamente mulheres com idades entre 26 a 35 anos (63,9%) e sem filhos (73% de infertilidade primária), sendo que 65,8% buscavam assistência por 3 a 8 anos antes de chegarem à

instituição (Costa et. al, 2009). O setor de infertilidade registra cerca de 4000 consultas por ano – primeira vez e seguimento – e o tempo de espera para ingressar pode chegar a seis meses. Desde 2003, havia a tentativa de estabelecimento e consolidação de oferta de tecnologia de média e alta complexidade, o que só foi viabilizado parcialmente em 2010, com a estruturação do laboratório de sêmen e a oferta de IAH. Durante o período, os casais com esta indicação clínica que não quiseram ou não puderam buscar outros serviços formaram fila de espera, re-estruturada recentemente.

O objetivo deste estudo é relatar os resultados/ desdobramentos das inseminações artificiais homólogas (IAH) realizadas no hospital universitário desde a re-estruturação da fila de espera e do funcionamento do laboratório de sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa configura-se como estudo descritivo, transversal, de abordagem quantitativa (Luiz & Nadanovsky, 2005; Alves-Mazzotti & Gewandsznajder, 2004). Os casais com indicação clínica para IAH entre 2003 e 2010 integraram fila, organizada priorizando o tempo de espera pelo procedimento e a idade da paciente. Devido à limitação da técnica, foram adotados critérios de inclusão para as mulheres – ao menos uma trompa permeável – e homens – pelo menos 5 milhões de espermatozoides após capacitação – e casais – sorologias negativas para HIV1 e 2, HTLV 1e 2 (vírus linfotrópico para células T), VDRL (sífilis), hepatite B e C negativos.

A fila foi re-estruturada em julho de 2010 e contava então com 74 casais, cujas mulheres teriam menos de 42 anos. Um total de 27 mulheres puderam ser contatadas por telefone. Destas, duas haviam engravidado espontaneamente e apenas uma não manifestava desejo de engravidar naquele momento.

Dados dos prontuários e dos resultados dos procedimentos de 24 ciclos (17 mulheres) com capacitação espermática e IAH foram registrados e arquivados em ordem numérica, segundo a data da coleta. Posteriormente integraram banco de dados no programa Excel/Office 2003 e no *Special Program for Social Sciences* (SPSS) versão 17,0. As variáveis consideradas foram: 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. Foi feita a distribuição das frequências das variáveis para avaliar os resultados do procedimento ofertado pelo laboratório de sêmen recém inaugurado.

A pesquisa foi realizada de acordo com as rotinas, normas, consentimento e aprovação do Hospital Universitário. Não houve danos aos sujeitos participantes, os quais assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), segundo as normas preconizadas pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL. 1996).

RESULTADOS/ DISCUSSÃO

Com relação ao protocolo de indução e de capacitação para IAH, o primeiro prevê uso de gonadotrofina de diferentes tipos (recombinantes ou urinárias, de acordo com quatro diferentes protocolos, 75UI em dias alternados como prioridade (Bulus et. al, 2009), com acompanhamento do desenvolvimento do folículo por ultra-sonografia seriada. O rhCG é prescrito quando de folículos com pelo menos 18 mm (de 1 a 4) e as inseminações (uma por ciclo) realizadas entre 30 a 44 horas depois. No dia seguinte à inseminação, a paciente inicia o uso de progesterona, mantendo-a até o resultado do β -hCG. A capacitação espermática dá-se por gradiente por diferença de densidade a 40 e 80% e meio HTF suplemen-

tado com SSS. Para a inseminação são requeridos pelo menos 5 milhões de espermatozoides móveis.

O β -hCG é pedido 15 dias depois da inseminação. No caso de resultado negativo, a paciente inicia novo ciclo, num total de 3 ciclos/tentativas, não sendo necessário entrar na fila novamente. As condições foram informadas ao casal pela equipe e destacadas no termo de consentimento assinado no dia da realização do procedimento. Nos 24 ciclos de IAH realizados (17 mulheres), de dezembro de 2010 até fevereiro de 2011, as causas da infertilidade incluem: esterilidade sem causa aparente (50%), anovulação (14,3%) e fator masculino leve/ moderado (35,7%). 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. A amplitude de idade varia entre 29 e 42 anos. Nos homens a variação é maior: o homem mais jovem tem 31 anos e, o mais velho, 62. Todas as pacientes inseminadas produziram somente um folículo maior ou igual a 18 mm. A dose média de gonadotrofina foi de 267 UI.

A concentração média de espermatozoides inseminados foi de 62 milhões. A motilidade média foi de 23,3% de móveis progressivos rápidos, 42,6% de progressivos lentos, 15,6% sem progressão e 18,3% de imóveis. Ainda não foi obtida gravidez; porém 14 ciclos permanecem em aberto.

Das 17 mulheres que se submeteram à IAH, 9 (54,9%) tinham idades superiores a 35 anos. Dos 24 ciclos realizados, 12 foram em pacientes acima de 35 anos, ou seja, 50% dos ciclos, conforme ilustrado na tabela 1:

Tabela 1. distribuição das idades e dos ciclos de IAH por idade das pacientes.

Faixa etária	Frequência de pacientes	%	Frequência de ciclos	%
20-25	1	6,0	1	4,1
26-30	4	32,5	5	20,9
31-35	3	17,6	6	25,0
36-42	9	52,9	12	50,0
total	17	100,0	24	100,0

A idade das mulheres que integraram a lista de espera para IAH merece destaque. Apesar do desenho de indicação clínica para inseminação ser até 35 anos, até pela limitada perspectiva de resultados, constituem exceções: as pacientes que envelheceram na lista de espera, sem condições financeiras para realizar o tratamento no setor privado ou em outros estados (pelo SUS).

No que concerne as 74 pacientes da lista de espera, a idade média é de 33,3 anos (sd=4,01), com amplitude entre 24 a 43 anos. Com relação ao tempo de espera, uma paciente está na lista desde 2003, quatro desde 2006, 9 desde 2007, 26 desde 2008, e igual número (16) entre 2009 e 2010. Outras duas mulheres integram a lista, mas não há registro do tempo em que houve a indicação clínica para IAH.

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. Algumas pacientes esperam pelo procedimento desde 2003, ou seja, o período varia de 1 a 8 anos. No primeiro caso, a paciente hoje tem 41 anos e, portanto, excede o limite de idade, mas tinha 33 quando da indicação clínica para IAH. O mesmo se repete em outros casos: mulheres com 33 anos que estão com 38, 36 e 35 anos; com 34 que agora têm 38, 37 e 36 anos; que tinham 33 e, no momento, têm 38, 36 e 35 anos.

Embora os registros da Redlara concernentes ao ano de 2008 (Zegers-Hochschild et al., 2011) explicitem que a taxa de gravidez de 7.339 ciclos de IAH é maior em mulheres com idade inferior a 34 anos (34% em mulheres \leq 34 anos, 16% com idades entre 35-39 anos e 10 > 40

anos), optou-se por manter as pacientes na fila nas condições já descritas, o que resultou em 50% dos 24 ciclos realizados em mulheres com idades entre 36 a 42 anos.

CONCLUSÃO

Em função da idade das pacientes, pode haver comprometimento da taxa de sucesso de gravidez esperada para IAH no hospital universitário estudado. Ainda assim, mesmo com chances reduzidas, essas pacientes estão tendo a oportunidade de tentar a gravidez desejada por tantos anos. A opção por mantê-las na fila decorre inclusive do entendimento de que a técnica oferecida representa a última esperança e tentativa da maternidade.

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. Cumprindo a função de hospital universitário, a qualificação multiprofissional inicial e continuada em reprodução vem tentando resgatar a demanda reprimida e otimizar o fluxo de pacientes por meio do estabelecimento de redes de atendimento (referência e contra-referência).

Como desdobramento, vem sendo estabelecida fila paralela para pacientes com esta indicação clínica, dentro do limite de idade, que iniciaram atendimento no setor. O objetivo é garantir o acesso à tecnologia de RA, conforme o disposto na legislação (BRASIL, 2005) e o esforço da equipe é evitar que outras pacientes também envelheçam na fila, convertendo a IAH no setor público do Rio de Janeiro em última tentativa vazia.

Endereço para Correspondência:

Tonia Costa
Divisão de Reprodução Humana- IG- IFRJ
e-mail toniacos@gmail.com

Referências

Alves-Mazzotti, AJ; Gewandsznajder, F. O método nas ciências naturais e sociais: pesquisa quantitativa e qualitativa. São Paulo: Pioneira Thompson Learning; 2004.

BRASIL. MS. Política Nacional de Atenção Integral a Reprodução Humana Assistida. PORTARIA MS/GM Nº 426 de 22/3/2005.

BRASIL. IBGE. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e indicadores sociais. Uma abordagem demográfica para estimar o padrão histórico e os níveis de subenumeração de pessoas nos censos demográficos e contagens da população. Revisão 2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1272&id_pagina>. Acesso em 04/12/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Resolução 196/96 – Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos, 1996. [online]. Brasil; 1996. Disponível em <<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>>. Acesso em 15/11/2010.

Bulus, MMC; Souza, MCB; Mancebo, ACA; Almeida Filho, GL; Henriques, CA; Silva, KS. Avaliação comparativa do rFSH preenchido por bioensaio versus rFSH preenchido por massa em inseminação intra-uterina. JBRA Assist Reprod.2009;13(3):30-34.

Costa, T; Stotz, EN; Luiz, R; Souza, MCB. de. América Latina e busca por reprodução assistida: perfil da paciente em um serviço público de referência no Rio de Janeiro (Brasil). JBRA Assist Reprod.2009; 13(3):21-25.

Luiz; RR, Costa; AJL, Nadanovsky; P. Epidemiologia e estatística na pesquisa odontológica. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005.

Souza, MCB. Current Practice of management of infertility in low-resource settings: a Brazilian perspective. Apresentado no "Assisted Reproductive Technologies: Common Terminology and Management in Low-Resource Settings". World Health Organization WHO/ ICMART/ LIVFF –2008; Geneve; 2008.

Zegers-Hochschild, F; Schwarze, JE; Galdames, V. (Eds.). Registro Latino Americano de Reprodução Assistida. Disponível em <<http://www.redlara.com>>. Acesso em 01 de março de 2011.

Standard References for Natural Fertility and ART¹

Padrões de Referência para a Fertilidade Natural e Reprodução Assistida

Ian D. Cooke F Acad Med Sci (London), FRCOG (London), FRANZCOG (Hon)
 Emeritus Professor
 University of Sheffield
 United Kingdom
 Formerly Director of Education
 International Federation of Fertility Societies (IFFS)
 Tel +44 114 2620718
 e-mail: <i.d.cooke@sheffield.ac.uk>

¹Title of a presentation given at the IFFS Workshop, "Global impacts in infertility" on 21 May for REDLara in Rio de Janeiro, Brazil. The Workshop was supported by unrestricted educational grants to IFFS from Schering-Plough, Merck Serono, IBSA and CasMed and by REDLara.

ABSTRACT

Standard references may be classic papers, those based on large data sets or more simply and commonly, the best data set to the present. The latter may be superseded at any time, but the standard must be better. It is incumbent on all practitioners to study the literature and know about the best evidence available. This is continuing education. This paper provides a contemporary list of a number relevant to today's issues with a brief description of each. They would all repay more detailed study as they set benchmarks for quality.

Keywords: standard references, natural fertility, Assisted Reproductive Technologies, ART

RESUMO

Padrões de referências podem ser publicações clássicas, aquelas baseadas em dados robustos ou, mais simples e frequentemente, os melhores dados disponíveis. Estes últimos podem ser substituídos a qualquer momento, mas o padrão deve ser sempre o melhor. Todos devem buscar a literatura especializada em busca da melhor evidência. Isto é educação continuada. Este artigo fornece uma lista contemporânea de um número de trabalhos relevante para os temas em estudo, com uma breve descrição de cada. Todos mereceriam um estudo mais detalhado, já que definem parâmetros fundamentais para a qualidade.

Palavras-chave: padrões de referência, fertilidade natural, reprodução assistida

INTRODUCTION

Thinking of "standard references" about natural fertility, papers such as that of Tietze (1957), of pregnancy rates unfettered in a Hutterite population, of Tietze (1968) after stopping intrauterine or oral contraception or of Vessey et al. (1976) in a population stopping barrier contraception, spring to mind. Although these are rarely quoted nowadays they remain benchmarks because of the unique nature of the population studied, the size of the study or the conceptual or organisational skill in carrying it out. Of more interest recently has been the pregnancy rate in untreated subfertile couples (Snick et al., 1997) in a rural environment and the rate of treat-

ment seeking for infertility across the world as described by Boivin et al. (2009). Of course there is a place for these classical papers, as there is for a first report, the first randomised controlled trial of a treatment, the largest study with good statistics, a fine review or a meta-analysis. In a fast moving field, what should one keep to await a better paper, one that covers a more representative or better selected population or one that is large enough to support appropriate statistical analysis? It depends on the question asked. In some areas a single element cannot be isolated for long enough to build up the numbers to obtain an adequate result or there is too much variation in practice to make a result more widely applicable. So let me describe a number of papers that I think have current relevance and will continue to be influential. They all repay careful perusal by demonstrating good design and implementation and can act as models for subsequent studies. Perhaps this should be the interpretation of the "standard references" of the title. Allusions to them in this paper will be brief, but sufficient to indicate their importance.

Papers considered

Van der Steeg et al. (2008) collected data from 24 hospitals in the Netherlands and related Body Mass Index (BMI) to the time to natural pregnancy in 3029 subfertile patients using a smooth polynomial curve. They showed that a BMI of 21-29 was associated with a minimum time. Above 29 there was a 4% lower pregnancy rate achieved. Criteria for a normal semen analysis have been arbitrarily chosen, but the recent 5th Edition of the WHO Manual has also provided the 2.5, 97.5 and intermediate centiles for men whose partners conceived within 12 months of discontinuing contraceptive use as published by Cooper et al. (2010). These parameters exclude morphology, although limits for Kruger strict morphology are given separately. This is the standard international reference for andrology. The difficulty of showing statistical significance has been highlighted by Sripada et al. (2010) who show, using Receiver Operating Characteristic curves, that only motility and morphology are significantly associated with natural pregnancy. Another way of looking at fertility in the female is to measure the live birth rate using optimum semen quality as chosen in a donor insemination programme. De Brucker et al. (2009)

showed cumulative rates for age groups from 20-45 over a 12 month period of treatment with particular emphasis on the 40-45 year age group.

The efficacy of ovulation induction using gonadotrophins to achieve conception and live birth over 12 months was described by Balen et al. (1994) in those with cycle abnormalities, as shown by the clinical conditions of weight related amenorrhoea, polycystic ovaries and hypopituitary hypogonadism. They reached the pregnancy rates of natural conception as described by Tietze (1968).

A later treatment format reported by Dovey et al. (2008), clomiphene (50-100mg) and intrauterine insemination (IUI), yielded cumulative pregnancy rates over 9 months in groups of < and > 35 years. Treatment was cancelled if a luteinising hormone (LH) surge was not detected using dipsticks, there was no follicle >15 mm or if a serum progesterone concentration >3ng/ml was detected, but the analysis was done by intention to treat. Goverde et al. (2000) had randomised patients between IUI using spontaneous ovulation, stimulated IUI and *in vitro* fertilisation (IVF) for unexplained infertility and male factor infertility and shown that there was no difference between any of the three treatments and that differences in the pregnancy rate per cycle over 6 cycles for each condition could be accounted for entirely by the age of the woman. Importantly this showed that IVF was three times the cost for the same outcome.

Prediction of response has become important for identifying non-responding patients and those who have excess response, likely leading to ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Nelson et al. (2007) demonstrated that serum Anti-Müllerian Hormone (AMH) could differentiate these conditions better than could serum Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Jayaprakasan et al. (2010) using 3D vaginal ultrasound elegantly showed that identifying and measuring individual antral follicles correlated well with serum AMH. Those patients with polycystic ovaries had more readily distinguishable responses shown by serum AMH than by serum FSH or Antral Follicle Count (Nardo et al., 2009).

It is becoming increasingly important to record the outcomes from treating infertility to influence the political decision to provide infertility treatment, including the various forms of assisted reproductive technologies (ART), as an integral part of a national health service. Data on outcome have been presented by Pinborg et al. (2009) following up patients from four large public hospitals in Denmark. That represented two thirds of all those achieving at least one delivery in the 5 years after treatment, which could include three reimbursed cycles of IVF. Outcome was recorded for each of natural conception and the results of treatment by IUI, IVF, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and frozen embryo replacement (FER); 69% achieved a delivery. Modelling the effects of IVF on a population to predict the number of first live-born deliveries per 100,000 women trying for their first baby over 10 years, Habbema et al. (2009) concluded that offering IVF after one year's infertility was less cost-effective than offering it after 3 years' infertility as the additional number of deliveries was so small.

IVF takes many forms and the cumulative pregnancy and live birth rates following natural cycle IVF over 10 months have been reported by Nargund et al. (2001). Conventional stimulated cycles have been linked in the Massachusetts Society for ART (SART) registry and described at different ages using a patient's own oocytes and using donor oocytes (Stern et al. 2010).

National databases offer much larger numbers of treatment cycles and a full spectrum of conditions treated, so

smooth out the peaks and troughs seen in smaller ones. The Australian database can be compared with the New Zealand, contrasting a reimbursed private system with a national health service system based on strict criteria for access. Farquhar et al. (2010) show the results of single embryo transfer (SET) and the overall results of cycles using a patient's own oocytes, both by female age.

By linking the ART and Birth Defects registries and in-patient records Hansen et al. (2008) showed that there was a fourfold risk of being admitted to hospital, (both neonatal intensive care and later) in the first year after an ART birth.

Although some countries now predominantly use SET, many do not. Although a meta-analysis emphasises the dilemma by showing that although a double embryo transfer (DET) slightly increases the live birth rate it markedly increases the rate of multiple pregnancy (Gelbaya et al., 2010). On the other hand Veleva et al. (2009) in an equally large data set clearly show that *when frozen embryo transfer (FER) is also available elective SET markedly increases the cumulative live birth rate and dramatically reduces the multiple birth rate per oocyte retrieval*. Subsequent frozen/thawed embryo replacement does not increase the total number of fresh and frozen transfer cycles per woman. As the cost of a FER is about 20% of that of IVF/ICSI, it reduces the overall cost and achieves a slightly better overall live birth rate than does DET.

Evaluation of perinatal outcome after FER indicates that there is no increase in perinatal or infant mortality; the babies are more likely to be larger and less likely to be smaller than after fresh embryo transfer (Pelkonen et al., 2010; Pinborg et al., 2010). Although the reason for having oocyte donation is because a patient's own oocytes are unlikely to result in a pregnancy, increasing age of the recipient of frozen embryos resulting from oocyte donation also results in reduced pregnancy rates (Dessolle et al., 2009).

Attempted culture to blastocyst stage does not always result in having an embryo to transfer. However, using the Australian national database a comparison of outcome of cleaved embryo transfer at an earlier stage and blastocyst transfer at a later stage shows that selection of a single blastocyst results in a significantly greater delivery rate of a healthy baby (>37 weeks, >2.5Kg, surviving at least 28 days and without congenital abnormality) than any form of DET (Wang et al., 2010).

Examining the total costs of an ART service within a national programme (Griffiths et al., 2010) demonstrates clearly that the overall cost of having a first baby at aged 42-45 is at least fourfold the cost of having one at 30-33 years of age. Similarly the older age group costs at least sixfold that of the younger for a second baby. Intermediate ages reflect intermediate costs, which in some systems have an effect on decisions about access.

CONCLUSION

These few examples of high quality papers across the spectrum of ART underline the diversity of material and the fact that almost all are recent. "Standard" papers referenced should be the best that are available and reflect a snapshot in time. The list requires selection from an increasing number of published papers and puts the onus on practitioners to keep up to date by reading at least the main relevant journals. This is continuing education, a demanding but enjoyable task.

References

Balen AH, Braat DDM, West C, Patel A, Jacobs HS. Cumulative conception and live birth rates after the treatment of anovula-

- tory infertility: safety and efficacy of ovulation induction in 200 patients. *Hum Reprod.* 1994;9:1563-70.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates on infertility prevalence and treatment seeking: potential need and demand for medical care. *Hum Reprod.* 2009;24:2380-3.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM et al. World Health Organization values for human semen characteristics *Hum Reprod Update.* 2010;16:231-45.
- De Brucker M, Haentjens P, Evenepoel J, Devroey P, Collins J, Tournaye H. Cumulative delivery rates in different age groups after artificial insemination with donor sperm. *Hum Reprod.* 2009;24:1891-9.
- Dessolle L, Darai E, Cornet D, Rouzier R, Coutant C, Mandelbaum et al. Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod.* 2009;24:3082-9.
- Dovey S, Sneeringer RM, Penzias AS. Clomiphene citrate and intrauterine insemination: analysis of more than 4100 cycles. *Fertil Steril.* 2008;90:2281-6.
- Farquhar CM, Wang YA, Sullivan EA. A comparative analysis of assisted reproduction technology cycles in Australia and New Zealand 2004-2007. *Hum. Reprod.* 2010;25:2281-9.
- Gelbaya TA, Tsoumpou I, Nardo LG,. The likelihood of live birth and multiple birth after single versus double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2010;94:936-45.
- Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JPW, Schats R, Rutten FFH, Schoemaker J. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet Jan 1, 2000*;355:13-18.
- Habbema JDF, Eijkemans MJC, Nargund G, Beets G, Leridon H, te Velde ER. The effect of *in vitro* fertilization on birth rates in western countries. *Hum Reprod.* 2009;24:1414-9.
- Hansen M, Colvin L, Petterson B, Kurinczuk JJ, de Klerk N, Bower C. Admission to hospital of singleton children born following assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod.* 2008;23:1297-305.
- Jayaprakasan K, Milhan Batcha SD, Hopkisson J, Johnson I, Campbell B, Raine-Fenning N. The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2010;94:2281-6.
- Nardo LG, Gelbaya TA, Wilkinson H, Roberts SA, Yates A, Pemberton et al. Circulating basal anti-Müllerian hormone levels as predictor of ovarian response in women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2009;92:1586-93.
- Nargund G, Waterstone J, Bland JM, Philips Z, Parsons J, Campbell S. Cumulative conception and live birth rates in natural (unstimulated) IVF cycles. *Hum Reprod.* 2001;16:259-62.
- Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulation cycles – implications for individualization of therapy. *Hum Reprod.* 2007;22:2414-21.
- Pelkonen S, Koivunen R, Gissler M, Nuojua-Huttunen S, Suikkari A-M, Hyden-Granskog C et al. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finnish cohort study 1995-2006. *Hum Reprod.* 2010;25:914-23.
- Pinborg A, Hougaard CO, Andersen AN, Molbo D, Schmidt L. Prospective longitudinal cohort study on cumulative 5-year delivery and adoption rates among 1338 couples initiating infertility treatment. *Hum Reprod.* 2009;24:991-9.
- Pinborg A, Loft A, Henningsen A-K A, Rasmussen S, Andersen AN. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The Danish National Cohort Study 1995-2006. *Fertil Steril.* 2010;94:1320-7.
- Snick HKA, Snick TS, Evers JLH, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod.* 1997;12:1582-8.
- Sripada S, Townend J, Campbell D, Murdoch L, Mathers E, Bhat-tacharya S. Relationship between semen parameters and spontaneous pregnancy. *Fertil Steril.* 2010;94:624-30.
- Stern JE, Brown MB, Luke B, Wantman E, Lederman A, Missmer SA et al. Calculating cumulative live-birth rates from linked cycles of assisted reproductive technology (ART): data from the Massachusetts SART CORS. *Fertil Steril.* 2010;94:1334-40.
- Tietze C. Reproductive span and rate of reproduction among Hutterite women. *Fertil Steril.* 1957;8:89-97.
- Tietze C. Fertility after discontinuation of intrauterine and oral contraception *Int J Fertil* 1968;13:385-9.
- van der Steeg JW, Steures P, Eijkeman MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Burggraaff JM et al. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod.* 2008;23:324-8.
- Veleva Z, Karinen P, Toma C, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer with cryopreservation improves the outcome and diminishes the costs of IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2009;24:1632-9.
- Vessey M, Doll R, Peto R, Johnson B, Wiggins P. A long term follow-up study of women using different methods of contraception. An interim report. *J Biosoc Sci* 1976;8:373-427.
- Wang YA, Kovacs G, Sullivan EA. Transfer of a selected blastocyst optimizes the chance of a healthy term baby: a retrospective population based study in Australia 2004-2007. *Hum Reprod.* 25: 1996-2005, 2010
- Griffiths et al *Hum Reprod* 2010;25:924-31.
- WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th Ed. Geneva, WHO, 2010.

Revisiting Ovarian Reserve Evaluation with Focus on Infertility

Revendo a Avaliação da Reserva Ovariana com Foco na Infertilidade

Bruno Ramalho de Carvalho, MD, MSc ¹, Pryia Maseelall, MD ², Stephen J. Bacak, DO, MPH ², David Barreira Gomes Sobrinho, MD ¹, Adelino Amaral Silva, MD ¹, Hitomi Miura Nakagava, MD ¹

¹ Genesis - Centre for Assistance in Human Reproduction, Brasília, Distrito Federal, Brazil.

² Department of Obstetrics and Gynecology, Northeastern Ohio Universities College of Medicine and Pharmacy, United States of America.

The authors of the present study declare that they have no conflict of interest regarding the attempted issues or the materials discussed in the text; this includes work relations, consultantships, honoraria and authors' rights.

ABSTRACT

The current trends to postpone motherhood and the increase in demand for assistance in reproductive medicine highlight the need for seeking guidelines for the establishment of individualized treatment protocols. Although the ability to assess the functional ovarian reserve remains limited, the tests that are currently available provide guidance for assistance to infertile couples and ease the emotional burden of a process whose results are still lagging behind. In this paper, we will revisit literature and highlight current tests available for assessing functional ovarian reserve, intending to embrace propaedeutic strategies and their interpretation in order to have reproductive success.

Keywords: Infertility, In Vitro Fertilization, Intracytoplasmic Sperm Injection, Ovarian Reserve, Assisted Reproduction, Follicle-Stimulating Hormone, Anti-Müllerian Hormone, Antral Follicle Count.

RESUMO

A tendência atual de se postergar a maternidade e o aumento das demandas pela assistência em medicina reprodutiva destacam a necessidade de se buscarem diretrizes para o estabelecimento de protocolos terapêuticos individualizados. Embora a capacidade de avaliar a reserva funcional ovariana permaneça limitada, os testes disponíveis atualmente oferecem um norte para assistência aos casais inférteis e amenizam a carga emocional de um processo de resultados ainda aquém dos almejados. Neste trabalho, revemos a literatura especializada e destacamos os testes de avaliação funcional da reserva ovariana disponíveis na atualidade, com o intuito de fornecer subsídios para o planejamento propedêutico e a interpretação dos resultados, com vistas ao sucesso reprodutivo.

Palavras-Chave: Infertilidade, Fertilização In Vitro, Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides, Reserva Ovariana, reprodução Assistida, Hormônio Folículo-Estimulante, Hormônio Anti-Mülleriano, Contagem de Folículos Antrais.

INTRODUCTION

Due to the modern tendency to postpone motherhood and the increasing demand for services of reproductive medicine, great attention has been given to the relationship between physiological ovarian ageing and progressive

loss of follicular reserve. Follicular exhaustion is markedly accelerated from the fourth decade of life (Block, 1952), but initial decline precedes this while women maintain regular menses between 30 and 40 years of age, representing a major challenge to specialists.

In this context, and especially when ovarian stimulation for assisted reproduction techniques (ART) is the first therapeutic choice, an ideal test for the inference of density and quality of remaining ovarian follicles after each normal menstrual cycle (ovarian reserve) is still absent (Broekmans et al, 2006; Carvalho et al, 2008; Domingues et al, 2010).

In the last two decades, great insights have been made in both serum and sonographic markers of female gonadal reserve. However, no consensus has been established on their relevance along the pre-treatment investigation of infertility. There is not strong evidence that any of the tested markers reflects the complex dynamics of ovarian follicles or allows specialists to infer quality or quantity of functional viable units. Women's age seems to be the only confident marker of ovarian reserve reduction.

Knowledge on the currently available markers do not support real expectations on inference of the pool of follicles that would meet the continuity of ovulatory cycles and thus the perpetuation of long-term reproductive potential (Broekmans et al, 2006, Carvalho et al, 2008). Specialists deal with this complex scenario on initial counseling of infertile couples and the establishment of individualized treatment protocols.

In this article, we aim to revisit the rationale for ovarian reserve evaluation by providing a critical analysis of endocrine and sonographic tests, in addition to age as easily accessible markers, with the intent to assist physicians on their selection, interpretation, and establishment of individualized therapeutic strategies in ART cycles.

AGE AS AN OVARIAN RESERVE MARKER

Age is the single most important factor in determining the quality of ovarian reserve. It is well known that both the quantity and quality of ovarian follicles significantly decreases as a woman advances in age. The quantity of ovarian oocytes begins to decrease in utero. It is estimated that the maximum number of oocytes, approximately 6 million, occurs at twenty weeks gestation. The oocyte pool continues to decline until menopause mainly through the processes of ovulation and atresia (Maseelall & McGovern, 2008). Multiple studies have reported on the

processes leading to diminished oocyte quality, including decreased discrimination in follicle selection, chromosomal abnormalities, and alterations in granulosa cell functions (Volarcik et al, 1998; Klein et al, 1996; Seifer et al, 1996; Seifer et al, 1999).

The inverse relationship between fecundity and age is long established. Menken et al reported that when compared to women aged 20 to 24 years, fertility is reduced by 14% in women 30 to 34 years and by 31% in women age 35 to 39 (Menken et al, 1986). Recent published data demonstrated significantly elevated pregnancy rates among women aged less than 35 years, even if follicle-stimulating hormone (FSH) levels were elevated, when compared to older patients with normal FSH levels (Luna et al, 2007).

Van Rooij reported that age was the significant factor associated with a poor response and embryo quality in a cohort of women aged 41 years and older undergoing *in vitro* fertilization (Van Rooij, 2003). Other studies suggest a similar relationship between advanced maternal age and response to assisted reproduction technologies (Gomes et al, 2009; Carvalho et al, 2010a).

According to the Centers for Disease Control and Prevention's 2007 ART Success Rates Report, the percentages of ART cycles resulting in pregnancy and live births continuously declined beginning in the mid 30's (CDC/ASRM/SART, 2009). Data from *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida* demonstrated a significant reduction of pregnancy rates per cycle with follicular aspiration: 38% in women 30 to 34 years; 31% in women 35 to 39 years; and 16% in older patients (Zegers-Hochschild et al, 2008). Furthermore, studies have shown that women of advanced maternal age unable to achieve pregnancy through *in vitro* fertilization (IVF) are able to conceive using donor oocytes from younger women (Steiner & Paulson, 2006).

Fertility is most favorable during the mid twenties. While there is no known cutoff value in age to predict fecundity, the literature suggests optimal fertility occurs before age 30. As we revisit serum markers in the evaluation of ovarian reserve, it is imperative to keep age at the forefront of our assessment as serum tests have greater predictability in older women.

BASAL ENDOCRINE MARKERS

1. Estradiol

Basal estradiol (E2) is still used in some services for the initial counselling of infertile couples and as pre-ART approach, but, considering the low predictive accuracy and the lack of standardization of a cut-off with high sensitivity and specificity, its adoption as a determinant for inclusion in therapeutic programs should be avoided (Broekmans et al, 2006).

While a higher rate of cancelled ART cycles has been demonstrated in patients whose levels of E2 were < 20 pg / mL or \geq 80 pg / mL (Fratarelli et al, 2000), the bulk of literature is flawed in supporting its clinical applicability as a marker of ovarian reserve. Even studies that favor its use for this purpose have been unable to correlate it to the follicular development or demonstrate its ability to predict the occurrence of pregnancy (Licciardi et al, 1995; Smotrych et al, 1995; Fratarelli et al, 2000). Fiçicioglu et al have also showed no significant differences on serum levels of E2 between good and poor responders' to ART stimulation (Fiçicioglu et al, 2006).

2. Follicle-stimulating hormone

Basal FSH is the most studied and worldwidely used endocrine ovarian reserve marker (Broekmans et al, 2006; Silberstein et al, 2006). However there is great variability

of in serum FSH levels within and between menstrual cycles, and the postulated interference of external factors such as smoking (Lambalk & de Koning, 1998).

According with Broekmans et al, the accuracy of FSH in predicting poor response to ART stimulation would depend on the identification of very high serum thresholds, which are infrequent (Broekmans et al, 2006). Ashrafi et al showed a significant reduction in the number of retrieved oocytes and increased cancellation rates in IVF cycles of women with FSH levels \geq 15 IU/mL (Ashrafi et al, 2005). Klinkert et al also suggested lower rates of pregnancy between women with levels \geq 15 IU/L and those with lower levels, but with no statistical significance (Klinkert et al, 2005).

In fact, it was recently demonstrated that pregnancy rates in women aged < 35 years with elevated basal FSH were higher than those of older women with normal levels of the hormone (Luna et al, 2007), reinforcing age as a main ovarian reserve marker. FSH is an easily accessible and low-cost marker, and could be useful in the pre-treatment evaluation of infertile women in specific groups, such as those carrying anovulatory cycles (van Montfrans et al, 2000) or endometriosis (Carvalho et al, 2010b), or in patients over 35 years of age (Watt et al, 2000, Luna et al, 2007).

3. Inhibin-B

The studies of Franchimont et al and Fowler et al pointed to the composition of follicular fluid as an index of maturation and suggested a possible association between concentrations of inhibin and oocyte quality (Franchimont et al, 1990; Fowler et al, 1995).

Tinkanen et al investigated infertile women between 24 and 40 years of age, and found significant negative correlation between serum inhibin-B and FSH. Also, the authors found significant positive correlation between inhibin B and antral follicle count at basal evaluation (Tinkanen et al, 2001). In agreement with them, Seifer et al demonstrated the presence of higher estrogenic response and number of oocytes obtained after stimulation for ART when women had serum inhibin-B \geq 45 pg/mL, while cancellations were three times more frequent among patients with lower levels (Seifer et al, 1997).

Other studies, however, were unable to repeat favorable results on the use of inhibin-B as a marker of ovarian reserve (Corson et al, 1999; Scheffer et al, 2007). The systematic review of Broekmans et al was categorical in stating that the high rate of false positives in routine determination of basal inhibin-B should lead to unnecessary exclusion of patients from IVF programs. Moreover, they noted that even using very low levels, the accuracy of inhibin-B in predicting poor response was only modest when compared the other available markers (Broekmans et al, 2006).

4. Anti-müllerian hormone

In the last decade, anti-müllerian hormone (AMH) has been used as predictor ovarian follicular reserve, since it signals the size of the pool of growing follicles, which in turn would be correlated to the stock of primordial follicles. In other words, it is considered to be an accurate marker, able to estimate the amount and activity of recruitable follicles at early stages of maturation, being, thus, more reliable for prediction of ovarian reserve (van Rooij et al, 2002; Fanchin et al, 2003, Muttukrishna et al, 2005, Scheffer et al, 2007).

Since AMH reduced variability in serum has been demonstrated along menstrual cycles, the marker has gained credibility and consistency when compared with FSH, inhibin-B and E2 (Fanchin et al, 2005; La Marca et al,

2006; Elgindy et al, 2008). Elgindy et al performed enzyme immunoassay and found median AMH values of 1.4 ± 1.1 ng / mL, 1.43 ± 1.08 ng / mL and 1.35 ± 1.02 ng / mL in follicular, ovulatory and mid-luteal phases, respectively, confirming results from previous studies and realizing that there was no gonadotrophic influence on its production (Hehenkamp et al, 2006; La Marca et al, 2006). Likewise, Tsepelidis et al found stable levels, even higher, averaging 2.4 ± 1.1 ng / mL along menstrual cycle in normo-ovulatory women (Tsepelidis et al, 2007). Reproducibility of AMH in subsequent cycles was demonstrated by Fanchin et al, who studied its behavior in infertile women aged between 20 and 40 years. The authors demonstrated that variations in AMH serum levels in consecutive cycles were lower than those found with FSH, inhibin-B and E2; moreover, there was a positive correlation with antral follicle count (AFC), but this marker was more susceptible to variations (Fanchin et al, 2005).

In ART cycles, studies have associated lower levels of AMH to poor response in gonadotropin stimulated cycles (van Rooij et al, 2002; Tremellen et al, 2005; Fiçioğlu et al, 2006; Gleicher et al, 2010). Muttukrishna et al prospectively evaluated women over 38 years of age with a previous poor response and supposed low ovarian reserve based on elevated basal FSH; reduced levels of AMH and inhibin-B were clearly demonstrated among women whose cycles were canceled, but AMH were considered to be a superior marker among the three markers (Muttukrishna et al, 2004).

La Marca et al confirmed expectations on AMH as a predictor of poor response, demonstrating a sensitivity of 80% and specificity of 93% in ART cycles, when considered as a threshold of 0.75 ng/mL (La Marca et al, 2007). Similar conclusions have been reached with higher cut off levels (Gnoth et al, 2008), maintaining a lack of standardization of a cut-off with satisfactory sensitivity and specificity for routine use.

Also, an association between AMH levels and the occurrence of pregnancy after ART has been studied. Values above 2.7 ng / mL were associated with higher rates of implantation and pregnancy, but with no significance (Silberstein et al, 2006). Recent data from the study of Gnoth et al defended AMH as a marker of response to stimulus but was unable to find its value in predicting pregnancy (Gnoth et al, 2008). Arabzadeh et al have recently demonstrated positive correlation between serum basal AMH levels and the number of oocytes retrieved and the percentage of mature oocytes, but significance was also not reached in correlation between the marker and implantation rate (Arabzaedh et al, 2010).

Given the scarcity of studies and lack of standardization of a cut-off with high sensitivity and specificity, it is still early to determine the real significance of AMH in the prediction of ovarian reserve and response. However, based on the favorable results presented and the significant correlation with important variables such as AFC, number of oocyte yielded and their maturity (van Rooij et al, 2002; Fiçioğlu et al, 2006; La Marca et al, 2007), we believe in the promising future of this marker.

ULTRASONOGRAPHIC MARKERS

1. Antral Follicle Count

Pre-therapeutic ultrasonographic AFC has been shown to be an excellent predictor of ovarian reserve and response to gonadotropins, with significant superiority in relation to other markers (Bancsi et al, 2002; Scheffer et al, 2003; Verhagen et al, 2008). According with Muttukrishna et al, AFC should allow identification of 89% of poor responders, in spite of low specificity (Muttukrishna et

al, 2005), and other authors admit its importance as a screening test for infertile couples (Broekmans et al, 2006). Data from the study of Maseelall et al demonstrated that chance of live birth is lower with an AFC of 10 or less; authors also suggested that patients should be advised about the increased risks of miscarriage, cycle cancellation, use of more gonadotropins, fewer oocytes yielded, and lower clinical pregnancy rates if compared with women with an AFC of 11 or greater (Maseelall et al, 2009).

Recent studies have shown significant correlations between AFC and the concentrations of classically used serum markers (Haadsma et al, 2007) and AMH (Fanchin et al, 2003, Visser & Themmen, 2005), as well as significant differences between women with normal response to stimulation and poor responders. In a recent study, Elgindy et al assessed AFC (follicles with up to 10 mm in diameter) and found 10.1 ± 3.0 and 5.7 ± 1.0 antral follicles for those two groups, respectively (Elgindy et al, 2008).

Special attention has been given to initial antral follicles when considering ovarian reserve evaluation. Klinkert et al demonstrated that the frequency of normal response to stimulation was significantly elevated in patients with $AFC \geq 5$ units with up to 5 mm in diameter (Klinkert et al, 2005) and Haadsma et al demonstrated significant correlation between follicles with up to 6 mm in diameter and all ovarian reserve endocrine tests, in contrast to that observed with larger follicles, which were consistent only with ovarian volume and serum levels of inhibin-B. Also, the authors postulated that smaller follicles should be significantly reduced in number with the advance of age, while the pool of larger follicles should virtually remain unchanged until the middle of fifth decade of life (Haadsma et al, 2007).

In summary, results of literature seem to converge to recognition of the importance of AFC as a predictor of ovarian response. Although the test should not be used to exclude women from IVF programs, it should a very useful instrument for couples counseling and determining individualized treatment protocols in IVF cycles. Since endovaginal ultrasound evaluation is normally required in pre-ART evaluation, we believe that it should be definitely included as a routine marker of gonadal reserve.

2. Ovarian Volume

Ovarian volume (OV) has also been associated with fertility potential. In a study evaluating women undergoing ART cycles, between 23 and 46 years of age, Syrop et al demonstrated a clear reduction in the number of yielded oocytes and pregnancy rates, with decreased ovarian volumes (Syrop et al, 1999). However, ten well-designed studies on ovarian volume as a marker of gonadal reserve were systematically revised by Broekmans et al, with little clinical applicability in the prediction of poor response or pregnancy (Broekmans et al, 2006).

Recently, Bowen et al demonstrated significant correlation between the decrease in ovarian measures, increased age and elevated serum FSH (Bowen et al, 2007), which was not demonstrated by Elgindy et al, whose data showed no difference in OV between young women with normal and poor response in ART cycles (means of 4.1 ± 0.66 cm³ and 3.36 ± 0.71 cm³, respectively) (Elgindy et al, 2008). McIlven et al reached a similar conclusion when evaluating women at high risk for ART cancellation (McIlven et al, 2007).

FINAL CONSIDERATIONS

Since single ovarian reserve markers have unsatisfactory sensitivity and specificity, a combination of markers should be a more efficient strategy in clinical practice.

Although a recent meta-analysis has concluded for the equivalent potential of multivariate models and AFC alone for predicting poor response in IVF cycles (Verhagen et al, 2008), combinations have not been sufficiently evaluated and there are few data comparing AMH and AFC. Further studies evaluating this and other combinations will be necessary to discard the use of multivariate models, which, in our view, are still the best strategy to address conclusions on ovarian reserve. For now, none of the currently available tests of ovarian reserve can reliably predict response or pregnancy in ART. They shall be used as complementary tools in counseling process, which must be based on age and individuality. This rationale is further supported by a review of ovarian testing by Sun et al (Sun et al, 2008). The authors state that interpretation of ovarian reserve testing should be based on women's age and that in women younger than 35 any single test suggesting decreased reserve should be supported by additional testing.

Correspondence to:

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

References

- Arabzadeh S, Hossein G, Rashidi BH, Hosseini MA, Zeraati H. Comparing serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone as a predictor of in vitro fertilization outcomes in patients with and without polycystic ovary syndrome. *Ann Saudi Med* 2010;30:442-7.
- Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int. J Gynaecol. Obstet.* 2005;91:53-7.
- Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2002;77:328-36.
- Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat. (Basel).* 1952;14:108-23.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update.* 2006;12:685-718.
- Carvalho BR, Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Ovarian Reserve Evaluation: State of the art. *J Assist Reprod Gen.* 2008;25:311-22.
- Carvalho BR; Cabral IO; Nakagava HM; Silva AA; Barbosa ACP. Woman's age and ovarian response in ICSI cycles. *JBRA Assist Reprod* 2010a; 14: 24-7.
- Carvalho BR, Rosa e Silva ACJS, Rosa e Silva JC, Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sá MF. Increased basal FSH levels as predictors of low quality follicles in infertile women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010b;110:208-12.
- Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2007 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National and Fertility Clinic Reports, Atlanta: US. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Available at: http://www.cdc.gov/art/ART2007/PDF/COMPLETE_2007_ART.pdf. Accessed: 01/02/2011.
- Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod.* 1999;14:2818-21.
- Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22:271-6.
- Elgindy EA, El-Haieg DO, El-Sebaey A. Anti-Müllerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. *Fertil Steril.* 2008;89:1670-6.
- Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod.* 2003;18:323-7.
- Fanchin R, Taieb J, Lozano DHM, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproductibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Hum Reprod.* 2005;20:923-7.
- Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular anti-Müllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006;85:592-6.
- Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, Cunningham P, Fraser M, Hull MG, Templeton A. Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 1995;10:68-74.
- Franchimont P, Hazeé-Hagelstein MT, Charlet-Renard C, Jaspard JM, Hazout A, Salat-Baroux J, Schatz B, Demerlé F. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. II. Inhibin and aromatase inhibitor activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:748-54.
- Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2000;74:518-24.
- Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Discordances between follicle stimulating hormone (FSH) and anti-Müllerian hormone (AMH) in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:64.
- Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod.* 2008;23:1359-65.
- Gomes LMO, Canha AS, Dzik A, Novo NF, Juliano Y, Santos SIS, Cavagna M. The age as a predictive factor in in vitro fertilization cycles. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31:230-4.
- Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, Hoek A. The number of small antral follicles (2-6mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod.* 2007;22:1925-31.
- Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, te Velde ER, Broekmans JM. Anti-Müllerian Hormone Levels in the Spontaneous Menstrual Cycle Do Not Show Substantial Fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4057-63.
- Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:2742-5.
- Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005;83:811-4.
- La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2006;21:3103-7.
- Lambalk CB, de Koning CH. Interpretation of elevated FSH in the regular menstrual cycle. *Maturitas.* 1998;30:215-20.
- Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1995;64:991-4.
- Luna M, Grunfeld L, Mukherjee T, Sandler B, Copperman AB. Moderately elevated levels of basal follicle-stimulating hormone in young patients predict low ovarian response, but should not be used to disqualify patients from attempting in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2007;87:782-7.
- Maseelall PB, McGovern PG. Ovarian reserve screening: what the general gynecologist should know. *Womens' Health.* 2008;4:291-300.
- Maseelall PB, Hernandez-Rey AE, Oh C, Maagdenberg T, McCulloh DH, McGovern PG. Antral follicle count is a significant predictor of livebirth in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2009; 91:1595-7.

- Menken J, Trussel J, Larsen U. Age and Infertility. *Science*. 1986;233:1389-94.
- McIlven M, Skull JD, Ledger WL. Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod*. 2007;22:778-85.
- Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG*. 2005;112:1384-90.
- Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan N. Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *BJOG*. 2004;111:1248-53.
- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999;72:845-51.
- Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, de Jong FH, te Velde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod*. 2003;18:700-6.
- Scheffer JB, Lozano DM, Frydman R, Fanchin R. Relationship of serum anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and FSH on day 3 with ovarian follicular status. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29:186-91.
- Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, et al. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1996;66:593-8.
- Seifer DB, Lambert Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril*. 1997;67:110-4.
- Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB, Keefe DL, Blazar AS. Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo quality. *Hum Reprod*. 2006;21:159-63.
- Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995;64:1136-40.
- Steiner AZ, Paulson RJ. Oocyte Donation. *Clin Obstet Gynecol*. 2006;49:44-54.
- Sun W, Stegmann BJ, Henne M, Catherino WH, Segars JH. A new approach to ovarian reserve testing. *Fertil Steril*. 2008;90:2196-202.
- Syrop CH, Dawson JD, Husman K, Sparks AET, Van Voorhis BJ. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod*. 1999;14:1752-6.
- Tinkanen H, Bläuer M, Laippala P, Tuohimaa P, Kujansuu E. Correlation between serum inhibin B and other indicators of the ovarian function. *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;94:109-13.
- Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005;45:20-4.
- Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy Ch, Englert Y. Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007;22:1837-40.
- van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertility population. *Fertil Steril*. 2000;74:97-103.
- van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fert Steril*. 2003;79:482-8.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*. 2002;17:3065-71.
- Verhagen TEM, Hendriks DJ, Bancsi LFJMM, Mol BWJ, Broekmans FJM. The accuracy of multivariate models predicting ovarian reserve and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2008;14:95-100.
- Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-Karim FW, Hunt P. The meiotic competence of in vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence the folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod*. 1998;13:154-60.
- Watt AH, Legedza ATR, Ginsburg ES, Barbieri RL, Clarke RN, Hornstein MD. The prognostic value of age and follicle-stimulating hormone levels in women over forty years of age undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Gen*. 2000;17:264-8.
- Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Galdames V (Eds). *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida*. 2008. Available at: http://www.redlara.com/imagenes/araq/2008_registro%202008.pdf. Accessed: 02/02/2010.

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>



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

SBRA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE
REPRODUÇÃO ASSISTIDA


FLORIANÓPOLIS e REGIÃO
Convention & Visitors Bureau

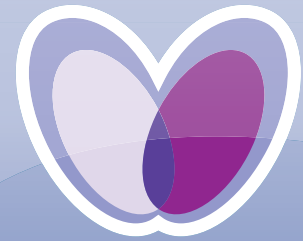

ACORIANA

Praxis
FEIRAS E CONGRESSOS

48 3028.5154 - www.praxis.srv.br

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

