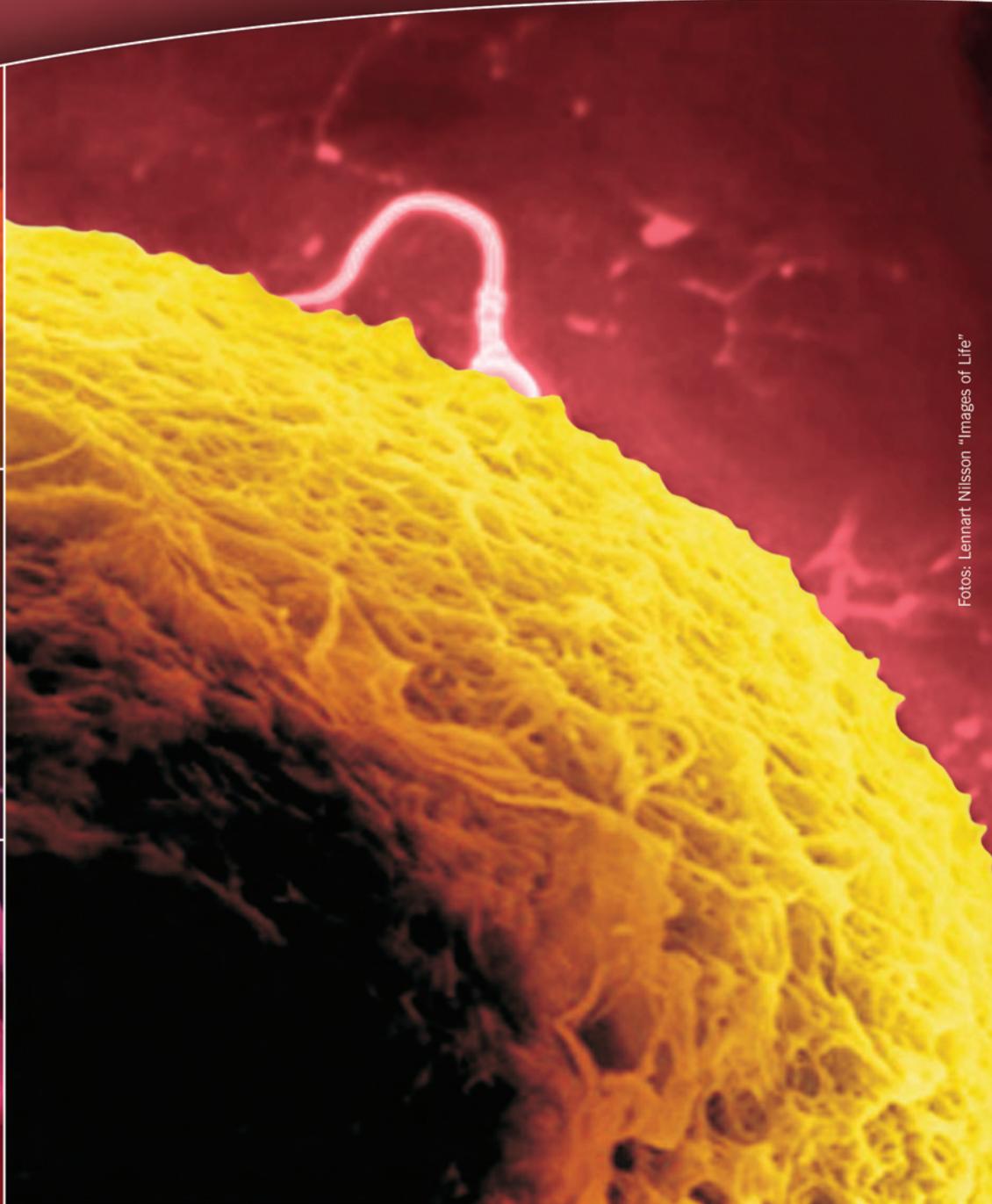


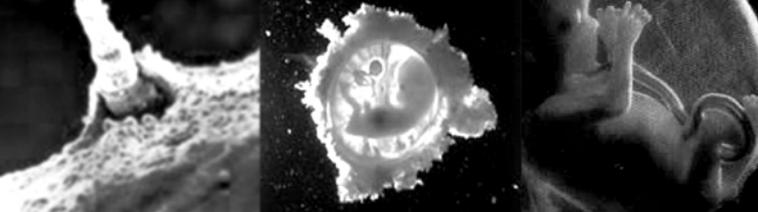
Volume 12 | Número 2 | Abr-Mai-Jun 2008 | ISSN 1517-5693

JB BRA

JORNAL BRASILEIRO DE
REPRODUÇÃO
ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"



JBRA JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

CORPO EDITORIAL NACIONAL

Editor	Clínica	Região
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra / UFRJ	RJ
Editor Adjunto		
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Consultor Editorial		
José Gonçalves Franco Júnior	CRH	SP
Assistente Editorial		
Bruno B de Souza		
Editores Associados		
Edson Borges Junior	FERTILITY	SP
João Batista Alcântara Oliveira	CRH - Ribeirão Preto	SP
Selmo Geber	ORIGEN	MG
Weydson Barros Leal	UFPE	PE
Conselho editorial		
Adelino Amaral Silva	GENESIS	DF
Alessandro Schuffner	CONCEBER	PR
Alvaro Petracco	FERTILITAT	RS
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O BARRA	RJ
Aroldo Camargos	UFMG	MG
Bela Zausner	GENESE	BA
Bruno Scheffer	IBRA	MG
Carlos André Henriques	G&O BARRA	RJ
Claudia G. Petersen	CRH - Ribeirão Preto	SP
Condesmar Marcondes Filho	NÚCLEO REPRODUÇÃO	SP
Dirceu Mendes Pereira	PROFERT	SP
Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR - UFRGS	RS
Elvio Tognotti	FMUSP	SP
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT
João Pedro Junqueira Caetano	PRÓ-CRIAR/MATER DEI	MG
Joaquim Roberto Lopes	CENAFERT	BA
Jonathas Borges Soares	PROJETO ALPHA	SP

Jorge Hallak	REPROFERTY	SP
Leila Montenegro Silveira Farah	FERTILITY	SP
Lídio Jair Ribas Centa	ANDROLAB	PA
Luiz Fernando Dale	CENTRO DE MEDICINA DA REPRODUÇÃO	RJ
Marcos Sampaio	ORIGEN	MG
Mariangela Badalotti	FERTILITAT	RS
Marilza Vieira Rudge	UNESP Botucatu	SP
Mario Cavagna	Hospital Pérola Byington	SP
Newton Eduardo Busso	UNIFERT	SP
Paulo Franco Taitson	IRH	MG
Paulo Serafini	HUNTINGTON	SP
Paulo Spinola	CEPARH	BA
Renzo Antonini Filho	INSTITUTO DE SAÚDE DA MULHER	MG
Ricardo Melo Marinho	MATER DEI	MG
Roberta Wonchockier	PROJETO ALFA	SP
Roger Abdelmassih	Clínica e Centro de Reprodução Humana	SP
Rosana Maria dos Reis	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto	SP
Sidney Glina	Hospital Israelita Albert Einstein	SP
Silvana Chedid	CEPERH	SP

CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

Anne R. Greenlee	EUA
Claudia Borrero	Colômbia
Claudio Chillik	Argentina
David L. Keefe	EUA
Esther Pollak de Fried	Argentina
Francisco Riskey	Venezuela
Iván Valencia Madera	Equador
Juan Manuel Montoya	Colômbia
Karen Sermon	Bélgica

Diretoria da SBRA - 2007/2008

Presidente: Eduardo Pandolfi Passos
www.sbra.com.br

Departamento de Publicações

Editora: Maria do Carmo Borges de Souza
Editor Adjunto: Paulo Franco Taitson
e-mail: jornalsbra@cmb.com.br

Presidente: Eduardo Pandolfi Passos
1º Vice-Presidente: Adelino Amaral Silva
2º Vice-Presidente: Newton Eduardo Busso
1º Secretário: Luiz Eduardo T. Albuquerque
2ª Secretário: Arminio Motta Collier
1º Tesoureiro: Elvio Tognotti
2º Tesoureiro: Antonio Cesar Paes Barbosa

Departamento de Publicações:

Editora: Maria do Carmo Borges de Souza
Secretario: Bruno B de Souza

Comissão de Atividades Internacionais:

Marcos Sampaio
Ricardo Baruffi

Departamento Científico:

Mario Cavagna
Fabio Pasqualotto
Eduardo Motta

Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:

Bela Zausner
Arthur Dzik
Lídio Jair Ribas Centa
Luiz Fernando Dale

Comissão de Educação Continuada:

Antonio Helio Oliani
Álvaro Petracco
Roberta Wonchockier
Maria Cecilia R.M. Albuquerque

Conselho Fiscal:

Joaquim Roberto C. Lopes
Condesmar Marcondes Filho
César
Jonathas Borges

Conselho Consultivo:

José Gonçalves Franco Júnior
Selmo Geber
Edson Borges
Maria do Carmo Borges de Souza

Comissão de Comunicação:

Paulo Franco Taitson
Lia Ferragut
César Cornel

Relações Governamentais:

Rosaly Rulli Costa
Hitomi Miura Nakagava

PGD:

Coordenador: Selmo Geber
Assumpto Iaconelli Junior
Leila Farah
Mariana Faller

DST:

Caio Parente Barbosa
Waldemar Diniz de Carvalho
Paulo Naud

Endoscopia:

Coordenador: Maria Cecilia Erthal
Paulo Beltrame
Sergio Galbinsky

Endometriose:

Coordenador: Vilmon de Freitas
Elvio Tognotti
João Pedro Junqueira

Enfermagem:

Coordenadora: Suzana Zachia
Renata Trigo
Jacqueline Aranki

Psicologia:

Coordenadora: Ana Rosa

Andrologia:

Coordenador: Edson Borges

Projetos Multicentricos:

Franco Junior

Comissão de Normatização - ANVISA e SELO SBRA

Maria do Carmo Borges de Souza
Jonathas Borges
Isabel Cristina Amaral de Almeida
Claudia Petersen
Condesmar Marcondes Filho
Gilberto Almodin

Endocrinologia:

Coordenador: Rui Ferriani
Helena Corletta
Paulo Spinola
Polimara Spritzer
Ricardo Marinho

INFORMAÇÕES GERAIS

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

2. Artigos submetidos ao J Bras Rep Assist 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 J Bras Rep Assist 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 J Bras Rep Assist passa pelo processo de revisão por especialistas (*peer review*). Os artigos submetidos são primeiramente encaminhados aos editores para uma avaliação inicial quanto ao escopo do trabalho e às exigências editoriais do Jornal. Se a avaliação é positiva, o artigo é enviado a dois revisores especialistas na área pertinente. Todo o processo é anônimo, ou seja, os revisores são cegos quanto à identidade dos autores e seu local de origem e vice-versa. Após a avaliação do artigo pelos revisores, os artigos podem ser aceitos sem modificações, recusados ou devolvidos aos autores com sugestões de modificações, sendo que cada artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e modificações, sem que isso implique necessariamente a aceitação futura do trabalho.

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

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

7. Para textos que forem aceitos para publicação, uma declaração, assinada por todos os autores deverá ser enviada à revista, contendo as seguintes informações: a) o manuscrito é original; b) o manuscrito não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no J Bras Rep Assist; 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 J Bras Rep Assist 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 (Stephoe, 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>

Editorial**A importância do conflito de interesses**Paulo Franco Taitson
..... 10

Artigo Original**Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo. Experiência de 10 anos**Antônio Mourthé Filho, Antônio Rafael Lemos Faria, Ubiratan Barros de Melo, Paulo Franco Taitson
..... 11**Incidência da infertilidade masculina por fatores ocupacionais no Estado de Minas Gerais**Paulo Franco Taitson & Maria do Carmo Borges de Souza
..... 14**Dados Brasil - 2005 - Resumo**

..... 19

Artigo de Revisão**Integrinas e Reprodução**Rogéria Teixeira Coelho ; Tsutuo Aoki ; Maria do Carmo Borges de Souza
..... 20**Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento**Luis Felipe Victor Spyer Prates, Felipe Massote, José Helvécio de Souza Kalil, Selmo Geber
..... 27**Marcadores de espermatogênese e fatores preditivos de biópsia testicular positiva**André Jafeth, Bruno Brum Scheffer, Rafaela Brum Scheffer, Juliano Brum Scheffer
..... 32

Relato de caso**Gravidez com a técnica de Vitriificação de embriões pelo método Cryotop® em Programa de Ovodoação**Bruno Brum Scheffer, Rafaela Brum Scheffer, Juliano Brum Scheffer
..... 37

Eventos

..... 40

A importância do conflito de interesses

O extraordinário desenvolvimento da ciência acoplado à rápida passagem das descobertas para novas tecnologias está gerando novo problema entre os pesquisadores. Antigamente, era a busca pelo conhecimento que motivava as mentes. Hoje, busca-se ainda a utilidade dos resultados e com isso a pesquisa deixou de ser neutra para ser vinculada, muitas vezes, aos interesses dos financiadores. O exemplo claro dessa nova visão está na área biológica, financiada por grandes corporações, seja na obtenção de novos fármacos, seja no desenvolvimento de variedades vegetais transgênicas ou no emprego de células-tronco na terapia celular. Assim, é fundamental conhecer quem são os financiadores, pois muitas vezes, além das agências públicas, os projetos têm o apoio de recursos adicionais provenientes de empresas. Essa transparência é importante para os analistas (revisores de periódicos) terem a isenção suficiente para opinar sobre a originalidade e viabilidade dos artigos. Embora os conflitos de interesses de ordem financeira sejam os mais evidentes e visados, aspectos subjetivos de ordem moral, religiosa, acadêmica, política, entre outros, costumam com frequência permear a elaboração e o julgamento de uma publicação científica, comprometendo a esperada fidedignidade e a desejável imparcialidade. Nesses casos, no entanto, a influência pode ser sutil a ponto de não ser percebida pelo próprio autor e identificada pelo avaliador e por leitores. Deve ainda ser lembrado que não apenas os artigos resultantes de investigação científica são passíveis de conflito de interesses. Outros tipos de artigos como revisões, editoriais e, eventualmente, até séries e relatos de casos também estão sujeitos à intervenção de interesses particulares. Pode-se lançar mão de algumas estratégias com finalidade de mitigar potenciais conflitos de interesses. A mais simples e ideal, porém mais difícil de aplicar, é abster-se de circunstâncias que possam gerar conflitos, por exemplo, evitando envolver-se em relações de qualquer natureza com fabricantes ou distribuidores de produtos. Outra estratégia pode ser a recusa em participar de estudos ou julgamentos em que interesses pessoais possam resultar em decisões parciais. A solicitação de participação de uma terceira parte na avaliação de um estudo também pode minimizar os efeitos advindos de conflitos de interesses. É chegada a hora de considerar na escolha dos membros das comissões e comitês, emissores de pareceres oficiais, além da competência técnica que os currículos podem refletir, o conflito de interesse.

Paulo Franco Taitson

Editor Adjunto do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida

Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo. Experiência de 10 anos.

Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA): Experience of 10 years.

Antônio Mourthé Filho, Antônio Rafael Lemos Faria, Ubiratan Barros de Melo, Paulo Franco Taitson I.R.H. – Instituto de Reprodução Humana BH/MG

Resumo

Introdução: A técnica de aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA) tem sido discutida amplamente na literatura. Pontos discrepantes são relatados, como o número de espermatozoides na etiologia estudada, idade dos pacientes e incidência dos achados de azoospermia. No trabalho em questão, estudamos estas características levantadas e fundamentamos a utilização e importância desta técnica nos dias de hoje.

Material e Métodos: Foram avaliados 265 pacientes submetidos à técnica de aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo em nível ambulatorial com anestesia local. Paralelamente, realizou-se estudo clínico para caracterização da etiologia da infertilidade e análise dos dados obtidos em laboratório.

Resultados: A azoospermia obstrutiva esteve presente em 229 pacientes (86,41%) dentre os quais o perfil de pós-vasectomia apresentou maior incidência, com 101 casos (44,10%). A azoospermia secretora esteve presente com 34 casos (12,83%). Por fim, a síndrome de Kartagener e o trauma raque-medular apresentaram 1 caso (0,38% cada).

Conclusões: A azoospermia obstrutiva mostrou-se ser o principal achado no presente estudo. Ocorreram casos interessantes de fibrose cística, síndrome de Kartagener e trauma raque-medular. Por outro lado, é variável o número de espermatozoides obtidos por esta técnica. Concluímos assim, que a aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo poderá se firmar ainda mais com o advento de novos conhecimentos da anatomofisiologia testicular epididimária.

Palavras-chave: azoospermia, infertilidade masculina, PESA, anatomia epididimária.

Abstract

Introduction: Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) has been broadly discussed in several papers. Different points are related to the number of spermatozoa, age of patients and incidence of azoospermia findings. In the present paper, we have studied those characteristics and we have showed the impatience technical for 10 years.

Material and Methods: A total of 265 patients were submitted to percutaneous epididymal sperm aspiration in ambulatorial level with place anesthesia. Parallels, we have done a clinic study of infertility etiology and analysis of the number in laboratory.

Results: In 229 cases we had obstructive azoospermia (86,41%) as follows 101 vasectomized (44,10%). In 34 cases we had non-obstructive azoospermia (12,83%), 1 Kartagener syndrome (0,38%) and 1 injuries medullar (0,38%).

Conclusion: The obstructive azoospermia was present in the majority of cases. Interesting cases of cystic fibrosis, Kartagener syndrome and injuries medullar were related. On the other hand, the findings of number of spermatozoa were much variable. Finally, we concluded that percutaneous epididymal sperm aspiration needs to be more emphasized with the progress and advances of testicular-epididymal anatomy physiology studies.

Keywords: azoospermia, male infertility, PESA, epididymal anatomy

INTRODUÇÃO

A azoospermia se constitui em uma entidade andrológica com amplo espectro na etiologia, porém seu diagnóstico não oferece resistência. Pode ser classificada como secretora (distúrbios da espermatogênese), obstrutiva (obstrução da via seminal) ou mista. O epidídimo como entidade extratesticular e de maior realce da via seminal, apresenta funções vitais à estabilidade espermática. Notadamente, são diversas as indicações para a obtenção de espermatozoides ao nível epididimário, tais como ausência congênita das estruturas derivadas do canal de Wolff, obstrução epididimária, pós-vasectomia, obstrução pós-infecção, quistos, bridas, lesão medular, iatrogenia cirúrgica, síndromes de Young, Kartagener e fibrose cística (Belker, 1994; Tournaye et al., 1994).

A técnica de aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA), foi introduzida como uma técnica

menos invasiva para a recuperação espermatozoides, que podem ser realizados em nível ambulatorial com o uso de anestesia local. A percentagem de êxito é variável. Outras vantagens da PESA em relação à aspiração micro cirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA) são os mínimos desconfortos para o paciente, e a menor taxa de complicações quando comparado com cirurgia aberta. Além disso, PESA não precisa necessitar de instrumental microcirúrgico, como o microscópio, e é uma técnica muito simples com baixo custo (Dohle et al. 1998).

Uma vez obtido sucesso no recolhimento do gameta masculino e este canalizado para a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), observamos índices importantes de fertilização e evolução satisfatória de gravidez. As diferenças quanto à indicação de PESA ou micro MESA se baseiam no diagnóstico e na aptidão técnica do andrologista / urologista. Quando se comprova a existência do espermatozoide, nota-se uma variabilidade considerável quanto à concentração, etiologia, idade do paciente e viabilidade do gameta, sendo que a cabeça do epidídimo foi sempre a região puncionada (Silber et al., 1990; Schlegel et al., 1994).

Na investigação do estado de azoospermia, avalia-se o paciente pelo espermograma na tentativa de rastreamento do gameta, antecedendo ao balizamento do perfil hormonal do mesmo (dosagens de FSH, LH, testosterona e prolactina). O exame físico permite a identificação da higidez do trato genital masculino. A finalidade do presente trabalho é, portanto, comparar a incidência das principais etiologias de infertilidade masculina que tiveram como conduta, para a obtenção do espermatozoide, a aspiração percutânea de espermatozoides ao nível epididimário.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 265 pacientes azoospermicos no ejaculado submetidos à técnica de PESA (Craft et al., 1995) no período de janeiro de 1997 a janeiro de 2007. O procedimento foi conduzido sempre em nível ambulatorial com o paciente encontrando-se em decúbito dorsal. Com o estabelecimento da assepsia, foram colocados os campos. O epidídimo foi palpado e colocado mais próximo da pele da bolsa testicular. A apreensão do mesmo se fez entre o polegar e o indicador. Seguiu-se a anestesia local com xilocaína 1,0 % sem adrenalina. A aspiração dos gametas foi realizada com seringa de 5,0 mL (Becton Dickinson, Br) e agulha 27 G x 1/2 (Terumo Med. Corporation, USA) contendo meio de cultura (HTF, Irvine Scientific, USA). A análise imediata do material em microscopia permitiu maior acuidade frente aos parâmetros propostos. Por outro lado, cada paciente foi também clinicamente estudado na busca da etiologia do quadro azoospermico.

RESULTADOS

Tendo procedido a aspiração percutânea do epidídimo em 265 pacientes com punção positiva para achado de espermatozoides, agrupou-se os resultados conforme os achados. Todos os indivíduos eram azoospermicos no ejaculado. A azoospermia obstrutiva foi encontrada em 229 indivíduos (86,41%), se constituindo no principal achado. A azoospermia secretora esteve presente em 34 casos (12,83%).

Constatou-se um relato de síndrome de Kartagener (0,38%) e um de trauma raque-medular (0,38%). A idade média dos pacientes foi de 41 anos e 2 meses, sendo o mais novo de 26 anos e o mais velho de 73 anos. A concentração média de espermatozoides oscilou consideravelmente de etiologia para etiologia.

No contexto da azoospermia obstrutiva, o maior achado delineou-se nos casos de pós vasectomia com 101 relatos (44,10%), seguido por fator obstrutivo pós-infecção com 33 (14,41%), achados idiopáticos com 28 (12,23%), insucesso epidídimo-vasectomia com 25 casos (10,92%), agenesia deferencial (sendo relatados achados de fibrose cística e constatação de agenesia das vesículas seminais) e insucesso na vasovasostomia com 18 casos (7,86%), traumatismos na via extratesticular com relato de 15 casos (6,55%), bridas e quistos com 09 casos (3,93%). Dentre os relatos de azoospermia secretora, encontramos a hipoespermatogênese com 13 (38,24%), a parada na espermatogênese com 12 (35,29%) e a síndrome de "somente células de Sertoli" com 09 casos relatados (26,47%).

DISCUSSÃO

A utilização da técnica de PESA na aquisição do gameta masculino tem sido relatada em inúmeros estudos. A necessidade de se melhor definir as indicações para esta técnica, leva-nos, cada vez mais, a rever os conceitos sobre fisiologia epididimária. Sendo o órgão dividido anatomicamente em cabeça, corpo e cauda, a primeira porção é usualmente a escolhida, pela facilidade de exposição e contensão. Em 84% dos indivíduos a punção unilateral foi suficiente na obtenção de gametas de qualidade aceitável. A observância de assepsia adequada e anestesia local sem invasão de cápsula epididimária são condições fundamentais na abordagem pré-aspiração (Schlegel et al., 1994; Bromage et al., 2007).

Inúmeras têm sido as discussões no âmbito de se realizar uma recanalização deferencial (reversão da vasectomia) ou encaminhar o paciente para PESA ou MESA. Acreditamos que alguns parâmetros são singulares na definição da indicação, tais como: tempo de realização da vasectomia, número estimado de filhos que pretendem ter, idade do casal, custo dos protocolos indicados (reversão da vasectomia ou PESA + ICSI), qual do dois será poupado de protocolos mais invasivos (Bonduelle et al., 1996; Pavlovich & Schelegel., 1997).

A cirurgia de reversão da vasectomia é muito mais complexa que a vasectomia em si - e seus resultados tendem a serem pobres particularmente se o procedimento tiver ocorrido há mais de quinze anos. Por isso, são estabelecidos alguns requisitos básicos para a vasectomia, como a idade do paciente (superior a 25 anos) e, pelo menos, dois filhos vivos, ou casos em que a gravidez da parceira poderá por sua vida em risco. Cerca de 4% a 6% dos homens vasectomizados são submetidos à reversão ou a PESA e o contingente de homens que procuram pela vasectomia como método contraceptivo tem aumentado nas últimas décadas (Marmar et al., 2008).

Dentre os resultados, observamos que a ocorrência do caráter obstrutivo se ressalta entre as demais indicações de PESA. Os achados de pós vasectomia nos trazem a luz que um número considerável de casais tem optado pela contracepção masculina, pois a mesma é mais rápi-

da, menos invasiva e com menores percalços em relação à laqueadura tubária. A agenesia deferencial ocorreu em pequena porcentagem dos achados de azoospermia, sendo a palpação de bolsa testicular e as ultra-sonografias indicadas para tal diagnóstico. Por outro lado, observamos que em 54% dos indivíduos com agenesia das vesículas seminais, o ducto deferente encontra-se ausente. Dados estes, em consonância com a literatura (Domingues et al., 1991; Tang et al., 2007).

Os trinta pacientes que apresentaram diagnóstico de azoospermia secretora passaram pelo seguinte protocolo: constatou-se a azoospermia no ejaculado. Em seguida foram submetidos a rigoroso exame físico andrológico e exames hormonais, os testículos apresentavam-se, na maioria das vezes, ligeiramente atrofícos, mas o que chamou mais a atenção foi a dosagem de FSH que se encontrava ligeiramente aumentada. Indicou-se a seguir a técnica de PESA em que os espermatozoides não foram encontrados. A literatura nos mostra que alguns indivíduos com ligeira discrepância nas dosagens de FSH podem apresentar espermatozoides ao nível epididimário.

Dados característicos e conclusão de azoospermia secretora, somente após a tentativa de obtenção de gametas pela técnica de TESE (extração de espermatozoides do testículo) e exame anatomopatológico. Achados de síndrome de Kartagener associada com azoospermia são raros. Um fato que chamou a atenção é que pacientes com trauma raque-medular, como por exemplo, o paraplégico, pode utilizar a técnica de PESA haja vista que no passado eram submetidos à estimulação com eletroejaculador. As alterações como a hipoespermatogênese e a parada no desenrolar da formação do gameta masculino (achados peculiares da azoospermia secretora) nos leva a reflexão da obtenção do espermatozoide via PESA ou em caso negativo também em MESA, lançar mão da técnica de TESE (Morillas et al., 2007; Kremer & Visser, 2008).

A concentração de espermatozoides variou consideravelmente em cada etiologia relatada. Os principais achados de elevada concentração de espermatozoides se delinearam nos quadros de azoospermia obstrutiva e trauma raque-medular. Os de menor concentração nos casos de alteração estrutural testicular associada à azoospermia de causa desconhecida. Concluímos assim, que o aperfeiçoamento da técnica de PESA, bem como a sua adequada indicação aliada ao conhecimento da fisiologia epididimária-testicular possibilitará maiores sucessos na aquisição do espermatozoide no trato genital masculino (Wald et al., 2007).

Referências

Belker AM. The sperm microaspiration retrieval techniques study group. Results in the United States with sperm microaspiration retrieval techniques assisted reproductive technologies. *J Urol.* 1994;151:1255-9.

Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, VanAssche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers L. Prospective follow-

up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Human Reprod.* 1996;11(suppl.4):131-55.

Bromage SJ, Douglas J, Falconer DA, Lieberman BA, Payne SR. Factors affecting successful outcome from ICSI in men following previous vasectomy. *World J Urol.* 2007;25:519-24.

Craft L, Tsigiotis M, Bennett V, Taranissi M, Khalifa Y, Hogenind G, Nicholson N. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1995;63:1038.

Dohle GR, Ramos L, Pieters MH, Braat DD, Weber RF: Surgical sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection as treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1998;13:620-3.

Domingues C, Boronat F, Cunat E, Martinez R, Moreno B, Jimenez Cruz JF. Agenesis of seminal vesicles in infertile males: ultrasonic diagnosis. *Eur Urol.* 1991;10:129-32.

Kremer JA, Visser H. Testicular sperm extraction (TESE) with intracytoplasmic sperm injection (ICSI) now allowed in the Netherlands. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2008;152:164-6.

Marmar JL, Sharlip I, Goldstein M. Results of vasovasostomy or vasoepididymostomy after failed percutaneous epididymal sperm aspirations. *J Urol.* 2008;179:1506-9.

Morillas HN, Zariwala M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. *Respiration.* 2007; 74: 252-63.

Pavlovich CP, Schlegel, P. - Fertility options after vasectomy: a cost-effectiveness analysis. *Fertil. Steril.*, 67: 133-41, 1997.

Schlegel PN, Alikani M, Berkeley AS, Adler A, Goldstein M, Gilbert BR, Cohen, J, Rosenwaks Z. Epididymal micropuncture with in vitro fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 1994;61: 895 -901.

Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, Patrizio P, Asch RH. Congenital absence of the vas deferens: The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *N Engl J Med.* 1990; 323: 1788-92.

Tang QL, Xue J, Gao CG, Zhang X, Chen LS. Percutaneous epididymal sperm aspiration: an effective diagnostic method for azoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007;13: 161-3.

Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem AC.- Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: A new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril.* 1994;61:1045-51.

Wald M, Makhlof AA, Niederberger CS. Therapeutic testis biopsy for sperm retrieval. *Curr Opin Urol.* 2007;17:431-8.

Correspondência:

Prof. Dr. Paulo Franco Taitson
Laboratório de Morfologia Seminal e Criobiologia
I.R.H. - Instituto de Reprodução Humana
 Rua dos Otoni, Nº 690 / 4º andar
 São Lucas - Belo Horizonte - M.G. CEP: 30.150-270
 Tel: (31) 3273-0676 Fax: (31) 3273-0754
 e-mail: pftaitson@bol.com.br

Incidência da infertilidade masculina por fatores ocupacionais no Estado de Minas Gerais

Incidence of male infertility by occupational factors In the State of Minas Gerais

Paulo Franco Taitson *
Maria do Carmo Borges de Souza **

* PhD. Institute of Biological Sciences (ICBS), Pontifical Catholic University of Minas Gerais
Email: taitson@pucminas.br

** PhD. Institute of Gynecology (IG), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ)/ G&O Barra-RJ. Av das Américas 4666 salas 312-313, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ. Brasil. Cep 22649-900. Phone-55-21-2430-9060; Fax 55-21-2430-9070
Email: mariadocarmo@cmb.com.br

Abstract

Objective: *The occupational factors are defined in the etiology of male infertility.*

Methods and results: *This study was designed from the authors' database regarding 24.280 infertile men. 102 individuals (0,42%) were estimated for this set of causes. The professionals that work in X - ray services, 79 individuals (77,46%), were the most relevant finding. The cause of infertility in 15 men was the exposure to organochlorine insecticides. Three cases of infertility (2,94%) were reported in workers in the lead industry. The same number of cases and the same incidence (2,94%) were found in workers in precious stones mining, due to mercury handling. The exposure to cadmium and copper were able to generate infertility in one individual each (0, 98%).*

Conclusion: *The expressive sampling of etiologies in male infertility by occupational factors in the area studied (102) and the number of municipal districts where the datum was collected (27 districts), associated to the clinical conditions, qualify these etiologies as predictive-evolutionary markers of reproductive health in the state of Minas Gerais – Brazil - similar to what takes place with populations in other parts of the world.*

Key words: *environment; infertility; male infertility; occupational factors; epidemiologic studies*

Resumo

Objetivo: Fatores ocupacionais são hoje bem definidos na etiologia da infertilidade masculina.

Métodos e resultados: Os dados deste estudo foram obtidos da casuística dos autores, relacionados a 24.280 homens inférteis. Destes, 102 indivíduos (0,42%) foram identificados para esta etiologia. O achado mais relevante relacionou-se com os profissionais que trabalham com raios X (77,46%), seguidos de 15 exposições a inseticidas organoclorados. Houve 3 casos (2,94%) relacionados a trabalhadores da indústria do chumbo. O mesmo número e a mesma incidência foi registrado em trabalhadores de minas de pedras preciosas, devido à manipulação de mercúrio. A exposição ao cádmio e ao cobre causaram infertilidade em 1 caso cada (0,98%).

Conclusão: A expressiva amostragem das etiologias da in-

fertilidade masculina por fatores ocupacionais observada nesta casuística de localização geográfica definida (102) e o número de municípios em que o dado foi constatado (27 municípios), associados às condições clínicas, qualificam estas etiologias como marcadores preditivo-evolutivos de saúde reprodutiva no estado das Minas Gerais, à semelhança do que ocorre com populações de outras partes do mundo.

Palavras-chave: meio ambiente; infertilidade; infertilidade masculina; fatores ocupacionais; estudos epidemiológicos.

INTRODUCTION

Infertility is the inability or the reduced ability to achieve pregnancy, without using contraceptive methods, in a 12-month period. Nearly 50% of the couples conceive the first pregnancy in the first 3-5 months and 85% up to 12 months. In a subsequent pregnancy they have the following rates: 33% for the first month and 50% for two months. Out of these couples, 15% cannot get pregnant in a year, which defines the percentage of infertile couples (Greenhall et al., 1990; Irvine, 1998).

The occupational factors are well defined as one of the causes of male infertility. Significant associations were found when comparing the seminal parameter of individuals exposed to chemical substances, such as mercury, pesticides and estrogens. Psychological stress also proved to be another important factor for infertility. Other works already show the negative impact of stress in the seminal parameters. Thus, more and more, the occupational factor (work) appears as an important cause of male infertility (Sheiner et al., 2003).

The environment has the capacity of acting in different ways in male fertility. Each isolated causal factor is able to provoke different levels of commitment, either in the production of spermatozoa, sexual inadequacy, libido or even hormonal levels. The environmental hazards many times able to change the fertility in man are excessive heat, electromagnetic radiation and heavy metals. (Robaire et al., 1995; Orejuela et al., 1998).

Harmful effects in fertility have been observed in men routinely exposed to environments with excessive heat. Under normal conditions, the testicle acts as a system of thermoregulation, keeping the scrotal temperature at an average two degrees below body temperature. Professional drivers and particularly workers constantly exposed to high temperatures may develop the difficulty of keeping intratesticular temperature low (Thonneau et al., 1998).

The action of chemical substances in the organism, such as gonadotoxics, is linked to concentration, cumulative effect (low or partial excretion), duration of exposure, doses-effect relation and metabolism. In some cases the effects are reversible, but in others they are not. The main cytotoxic drugs that inhibit the spermatogenesis are cisplatin, busulfan, cyclophosphamide, chlorambucil, methotrexate and vincristine.

Although the ionizing radiations have a more discreet effect on the already differentiated cells, irradiated spermatozoa are usually unable to fertilize, due to the alteration in the chromatin. In turn, the mother cell of the spermatozoa (spermatogonia) is less sensitive to the action of radiations. After the irradiation, the testicles may need several years for the restoration of the germinative epithelium. Therefore, the professionals that work in this area (radiologists and radioactive material operators) may have their testicular function compromised (Queiroz et al., 2006).

Pesticides: Some organochlorides may cause damages by concealing or blocking steroid hormones that control growth and sex, especially estrogen (female sex hormone) and testosterone (male sex hormone). For the estrogen to produce its effects in the organism, in the same way as the other hormones, it is necessary to connect them to determined protein cells, called "receptors". The fitting of the receptor and the hormone is complex and extremely precise. Estrogen is essential for the normal development of the male and female reproductive organs, during fetal life, both in human beings and animals. For this reason, it is not surprising that organochlorides that conceal and block estrogen may indeed cause devastating effects in the development of the fetus' reproductive system. The effects on the offspring are permanent and irreversible. According to a study held in India, a group of men who worked with organochlorine pesticides, such as Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT), presented a reduction of fertility when compared to a less exposed group. There was also a significant increase in stillbirths, neonatal mortality and congenital defects in infants born to these men. Recent studies also indicated that occupational exposure to dioxins reduces the level of male sex hormone, the testosterone. During the Vietnam War, the soldiers who used Agent Orange, contaminated with dioxins, presented reduction in size of testicles (Rupa et al., 1991; Wole et al., 1995).

Lead: The effects of lead poisoning range from clear and clinical to subtle and biochemical. They involve several systems of organs. In adults with excessive or even incidental occupational exposure, the concern is peripheral neuropathy and chronic nephropathy. Not to mention the gastrointestinal and reproductive systems which are also targets of lead intoxication. There is evidence that heavy exposure to the inorganic lead alloy is harmful to the

quality of semen. Studies on the quality of human semen suggest that the adverse effects of lead would be low sperm concentration and reduced motility, in people with chronic exposure of Pb-S at level 40-50 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ (ATSDR, 1999). Bonde et al. in 2002 concluded that the adverse effects of lead on testicular function in concentrations below 45 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ are improbable. Lead is only found in the cytoplasm of macrophages in the interstitial tissue, but it is able to cross the hemato-epididymal barrier (Marchlewicz, 1994).

Mercury: It has been considered an environmental pollutant of the highest risk to human health; therefore, the one studied the most. The biological effects of this metal and its derivatives are extremely varied, comprising from cytological and reproductive effects (mainly teratogens) to neurological ones, the latter being well established. According to few studies referring to male fertility, it was possible to see that fertility was not affected by an average level of mercury around 50 $\mu\text{g/l}$. However, significant loss of libido after long periods of exposure to mercury (level 44 000 $\mu\text{g/m}^3$ in the air) was also observed. The appearance of abortions and congenital malformations after long periods of exposure to mercury by fathers is controversial (Alcser et al., 1989; WHO, 1991).

Cadmium: The exposure to cadmium affects more than 1 million workers a year in the United States, in the period of 10 to 30 years in the human being. Cadmium may cause direct injury in the testicles by vascular alteration. According to World Health Organization (WHO, 1991), the high level of exposure to cadmium occurs when, through a blood test, numbers over 10 $\mu\text{g/L}$ can be observed. Its effect is evident in Sertoli cells, showing alteration in its morphology, degeneration of its seminiferous tubules, testicular atrophy and, in some advanced cases, deficiency in the production of androgenic hormones and necrosis of tissue. Cadmium may also interfere in the mitochondrial enzymes (Telisman et al., 2000; Kidambi et al., 2003).

Copper: It may compromise male infertility, since it is able to alter the normal spermatogenesis due to the action of follicle-stimulating hormone in the receptors (Queiroz et al., 2006).

Both authors share a leadership in a CNPq research group certificated by PUC/MG. They worked together in designing this research. The first author produced the database. The study is part of the pos-doctor from the first author. The analysis and the interpretation of data, the drafting and the revision were a product of discussion between them.

MATERIAL AND METHODS

The data for the present study were obtained from the authors' database regarding 24.280 infertile men in the period of February/1992 to February/2003 evaluated in the city of Belo Horizonte – MG – Brazil - in clinics of gynecology, human reproduction and centers of general practice. These individuals belonged to a range of infertile couples (couples without children after two years of coitus planning to have children) and apparently the woman was healthy in this context.

The infertility period varied from 2,1 to 16,4 years, with the mean period of 6,7 years. All the individuals included

Table 1. Male infertility by occupational factors.

Etiologies detected among 24 280 cases in the state of Minas Gerais- Brazil

N cases	%	etiology
79	77,46	X ray services
15	14,7	organochlorine insecticides
3	2,94	lead industry
3	2,94	precious stone mines(mercury)
1	0,94	cadmium
1	0,94	copper

in the present study were born and live in the referred cities or were born in other cities but have now been living in the referred city for at least 20 years. After the geographic distribution of these individuals, 219 cities in the state of Minas Gerais presented cases. The age in these individuals ranged from 21 to 50, with the mean age of 37, 2, divided into three groups: the first between 21 and 30 representing 27% of the group; the second between 31 and 40 with 45% and the third between 41 and 50 with 27, 9%.

To determine the diagnosis of male infertility, the data found were supported by clinical and complementary examination for each case, according to WHO. The individuals evaluated were submitted to thorough medical anamnesis, hormonal dosages of FSH, LH, free and total testosterone and at least two semen analyses with the interval not inferior to 15 days between one and the other. Complementary examinations with the attempt to enhance the diagnosis were added in some cases, such as ultrasonography, CAT scan, G-banded karyotype, high-resolution karyotype, genetic study of Y-chromosome micro deletions, genetic study of cystic fibrosis, testicular biopsy, specific serology, etc.

In the sequence, the incidence of the etiologies found was compared to the data from WHO, through the works of Comhaire et al., 1987. Means and standard deviations were assessed with the use of Matlab® statistics program. The Student's t-test was used with the level of significance of 0,05.

The present research was submitted to the Ethics and Research Committee of PUC Minas according to the requirements of Res. CNS 196/96 and its complements, being totally approved, without exceptions, in detailed report dated December 09/2003.

RESULTS

In the present study, 102 individuals (0, 42%) were estimated for this set of causes (Table 1). These data did not present significant difference in relation to the data from WHO (Irvine, 1998), that is, 0,3% ($p > 0, 05$). This classification was characterized in 27 municipal districts, distinguishing Belo Horizonte with 39 cases. The district

of Contagem accounted for 11 cases, Uberaba 06 cases, Juiz de Fora, Uberlândia, Ouro Branco and Betim 05 cases each, Pará de Minas, Diamantina and Curvelo 03 cases each. In 17 municipal districts, 01 case was catalogued in each one of them.

The professionals that work in X: ray services, totaling 79 individuals (77, 46%), were the most relevant finding among the causes of male infertility by occupational factors. In 15 individuals (14, 7%), the cause of infertility was due to exposure to organochlorine insecticides such as DDT and its prototype. These people were rural producers who alleged having worked with these substances for at least 10 years, under daily exposure, since the insecticides were applied in the plantations. Three cases of infertility (2, 94%) were reported in workers in the lead industry. The same number of cases (three) and the same incidence (2, 94%) were found in workers in precious stones mining, due to their exposure to mercury. The exposure to cadmium and copper was able to generate male infertility in one individual each (0, 98%).

DISCUSSION

The manifestations of occupational tendencies in the male reproductive function have called the attention of several researchers. By exploring regional differences, it is possible to increase the value of genetic and environmental impacts and lifestyle in man. The 21st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), held in Copenhagen - Denmark in June / 2005, concluded by observing the tendency of an increase in the number of men who need treatment in the reproductive sphere of up to 7% in the next decade.

This concern was always object of study in several European countries. Making an analysis, for instance, of the level of fertility in several European countries, greater sperm concentrations were found in Finnish people as compared with Scottish and Parisian people. These studies deserve prestige in the scientific field for the amplitude of the number of individuals studied and for the sampling diversity. This difference was also found when the comparison was made among young men (Jorgensen et al., 2002).

Specifically in relation to the Scandinavian countries, where studies in epidemiology of male infertility are advanced, recent studies have shown that the difference between Denmark and Finland, regarding waiting time to achieve pregnancy, is related to the high rates of seminal quality in Finnish men as compared with a corresponding group of Danish men. It is interesting to observe that the population of Finland is genetically similar to the population of Denmark. However, the variations in seminal quality reach 30% favoring Finland (Jensen et al., 2001).

Interesting reports show the variations in different regions in France (Auger et al., 1995; Bujan et al., 1996), where there is a periodical publication of the ranking of etiologies of male infertility and the number of children born through human reproduction techniques in the French specialized centers.

In the United States, Fisch et al. in 1996 reported a lower rate of sperm concentration in men born in Columbia than in New York, Minneapolis, Minnesota and Los Angeles, ranging from $59 \times 10^6/\text{mL}$ to $103 \times 10^6/\text{mL}$. The

establishment of universal criteria in fertility is objective of questionings. The variability is also observed in our country. Some researchers have valued the need of establishing regional criteria for the definition of normality parameters of semen in Brazil (Marinelli et al., 2003).

In the present study, the city of Belo Horizonte was responsible for 49, 4% of the findings in male infertility as a result of ionizing radiations (100% of workers in radiology clinics). The city of Uberaba showed the greatest incidence (33, 4%) of infertility cases caused by organic chlorides (DDT). Most of these individuals were workers in the rural area who constantly used these substances in their daily work on the land. The three cases of infertility by lead, due to occupational factors, were registered in Ipatinga, Caeté and Nova Lima, cities traditionally working with metal in the state of Minas Gerais.

The city of Diamantina was the focus of all three cases of infestation by mercury. The city is one of the main diamond minings in the state and mercury is used to facilitate the separation and cleaning of the material obtained in the plow in the small rivers. The metals cadmium (in the city of Ouro Branco) and copper (Uberlândia) presented 01 case each in the findings of male infertility by occupational factors.

Although traditional parameters of seminal quality can be easily measured., a significant change in the seminal profile may not be an absolute sign of a lesion in the male reproductive tract. A change in the seminal quality does not necessarily have to lead to clinical abnormalities. The reduction of male fertility can be evidence of systemic disease but it would be better having evaluation methods of male infertility by occupational factors (Levine, 1983). Many types of exposures and chemical products were shown to affect the quantity and quality of the human semen. In the literature, there are reviews that focus on occupational effects at the intratesticular level, such as the effects of dibromochloropropane. Prolonged heat is clearly harmful to spermatogenesis. The studies on occupational heat, radiation and chemical exposures and their effects on the semen were revised. Therefore, there are reasons to suggest that human seminal parameters can be used as valuable indicators of toxicity by the human body and, in the future, be able to better explain these effects due to occupational and environmental factors (Lahdetie, 1995).

Some studies tried to determine the association between exposure to occupational factors and male infertility. For this, a retrospective case control study was made using the data collected between 1991 and 1997 in nine American clinics. It was possible to observe an association between infertility and occupational factors such as exposure to radiation. There was no significant association in individuals exposed to electromagnetic cables, solvents, some pesticides and stress at work (Gracia et al., 2005). It is important to emphasize the difficulty in evaluating, in numbers, the incidence of infertility in one population since the prevailing estimate is usually computed in couples that come for appointments. Therefore, there are a significant number of men who present fertility problems and do not search for evaluation for their cases. The number of infertile men who seek help in a doctor is increasing every decade, probably because of the fall of some taboos and, without a doubt, because of the almost

generalized explanation showing the difference between the concepts of sexual power and fertility.

It is very important for the couple to come to interviews and examinations not only for mutual support but also for the understanding of what is happening in relation to the investigation and choice of treatment. This involvement is fundamental for the couple's motivation and basic when establishing trust in the professional, based on a systematic in clinical approach and in safety, in choosing a determined therapeutical conduct.

The expressive sampling of etiologies in male infertility by occupational factors among men in this study (102) and the number of municipal districts where the data were collected (27 districts), associated to the clinical conditions, qualify these etiologies as predictive-evolutionary markers of reproductive health in the state of Minas Gerais, similar to what takes place with populations in other parts of the world.

This population-based study has the objective of generating information to be practiced in the production and implementation of health programs as well as prevention programs.

References

21st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Copenhagen – Denmark, 2005.

Alcser KH, Brix KA, Fine LJ, Kallenbach LR, Wolfe RA. Occupational mercury exposure and male reproductive health. *Am J Indust Med* 1989; 15: 517-29.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995; 332:281-5.

Bonde JP, Joffe M, Apostoli P, Dale A, Kiss P, Spano M et al. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002; 59:234-42.

Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *Br Med J* 1996; 312: 471-72.

Comhaire FH, De Kretser D, Farley TMM, Rowe PJ. Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. Results of a World Health Organization Multicentre Study. *Int J Androl* 1987; 10: 1-53.

Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 1996; 65: 1009-14.

Gracia CR, Sammel MD, Coutifaris C, Guzick DS, Barnhart KT. Occupational exposures and male infertility. *Am J Epidemiol* 2005; 162:729-33.

Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril* 1990; 54: 978-83.

Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13 (Suppl 1): 33-44.

Jensen TK, Slama R, Ducot B, Suominen J, Cawood EH, Andersen AG. Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Human Reprod* 2001; 16: 2697-704.

Jorgensen N, Carlsen E, Nermoen I, Punab M, Suominen J, Andersen AG. East-West gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in

- Denmark, Norway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2002; 17: 2199-208.
- Kidambi SS, Lee DK, Ramamoorthy A. Interaction of Cd and Zn with biologically important ligands characterized using solid-state NMR and ab initio calculations. *Inorg Chem* 2003;42: 3142-51.
- Lahdetie J. Occupation and exposure-related studies on human sperm. *J Occup Environ Med* 1995; 37:922-30.
- Levine RJ. Methods for detecting occupational causes of male infertility. Reproductive history versus semen analysis. *Scand J Work Environ Health* 1983; 9: 371-6.
- Marchlewicz M. Effectiveness of blood-testis and blood-epididymis barriers for lead. *Ann Acad Med Stetin* 1994; 40:37-51.
- Marinelli CM, Brito J, Wroclawski ER, Borelli M, Rodrigues AO, Queiroz MVB. Análise dos parâmetros seminais em pacientes férteis na Região do Grande ABC-Zona urbana industrial. *International Braz J Urol* 2003; 29 (Suppl 1): 119.
- Orejuela F, Lipschultz LI. Effects of working environment on male reproductive health. *Contemp Urol* 1998; 10: 86-93.
- Queiroz EKR, Waissmann, W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad. Saúde Pública* 2006; 1-17.
- Robaire B, Pryor JL, Transler JM. *Handbook of Andrology*. Lawrence: Allen Press; 1995.
- Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. Reproductive performance in population exposed to pesticides in cotton fields in India. *Environmental Research* 1991; 55:517-29.
- Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD, Potashnik G, Carel R. *Ind Health* 2003;41: 55-62.
- Telisman, S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000; 108:45-53.
- Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* 1998; 13: 2122-25.
- US Department of Health and Human Services, Public Health Service, ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological profile for lead*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services; 1999.
- WHO. International program on chemical safety. *Environmental health criteria: Methylmercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.
- Wole WH, Michalek JE, Miner JC. *The Air Force Human Health Study: an epidemiologic investigation of health effects in Air Force personnel following exposure to herbicides. Reproductive outcomes*. Brooks Air Force Base, TX: US Air Force School of Aerospace Medicine (NTIS no. ADA-255262) 1995.

Registro latinoamericano de reprodução assistida- Brasil- 2005

Registro latinoamericano de reproducción asistida- Brasil- 2005

Latin america registry on assisted
reproductive techniques- REDLARA- Brazil- 2005

Resumo

Este relato inclui informação das características dos diversos tipos de tratamentos, gestações, partos e recém-nascidos pelas clínicas brasileiras da Redlara.

Abstract

This paper includes the brazilian data on ART from the clinics that report to Redlara.

Resumen

Esse reporte incluye información acerca de las características de los diferentes tipos de tratamientos, embarazos y partos obtenidos por las clínicas de Brasil en la Redlara.

2005	Frozen thawed embryo transfers	GIFT	IVF	ICSI	OD (fresh)	OD (FTE)	Total
Initiated cycles		8	1,068	9,286			10.362
Oocyte pick ups		7	922	8,742			9,671
Embryo transfers	1,226	7	778	7,961	858	104	10,934
Clinical pregnancies	284	0	266	2,800	312	29	3,691
Deliveries ≥ 1 live bom	199	0	239	2,192	239	18	21887
Mean embryos transferred	2.9	3.9	3.1	3.0	3.3	3:0	3.0
Clinical pregnancy rate per transfer	23.2%	0.0%	34.2%	35.2%	36.4%	27.9%	33.8%
Delivery rate per transfer	16.2%	0.0%	30.7%	27.5%	27.9%	17.3%	26.4%
Multigestation							
double	14.8%	0.0%	22.8%	24.0%	21.8%	20.7%	23.0%
triple	4.9%	0.0%	4.2%	6.4%	7.1%	3.4%	6.2%
cuad+	0.7%	0.0%	0.0%	0.6%	3.5%	0.0%	0.8%

Integrinas e Reprodução

Integrins and reproduction

Autores: Rogéria Teixeira Coelho^{1 2}
Tsutomu Aoki²
Maria do Carmo Borges de Souza³

Profértil Centro de Medicina Reprodutiva
Associação Instituto Sapientiae-SP
G & O Barra-RJ Reprodução Humana

Resumo

Integrinas são moléculas de adesão, localizadas na membrana plasmática de todas as células humanas, exceto eritrócitos. São responsáveis por mecanismos celulares como adesão, orientação, migração, organização com a matriz extracelular, desenvolvimento e até crescimento celular, estando presentes inclusive em células neoplásicas. São formadas por duas cadeias de subunidades (α e β), que se combinam ligações químicas não-covalentes; são conhecidas 18 subunidades α e 8 subunidades β , formando em combinação cerca de vinte e quatro heterodímeros de integrinas. A subunidade α regula a adesão de ligantes e a conformação extracelular, enquanto a β tem predomínio intracelular e está associada a proteínas do citoesqueleto, com modulação de dentro-para-fora e de fora-para-dentro, com expressão de genes, proliferação, migração e diferenciação celular. As estruturas nas quais se ligam são seqüências curtas de aminoácidos, presentes em vários locais da matriz extracelular. A seqüência de reconhecimento mais comum é a seqüência "Arginina-Glicina-Ácido Aspártico", mas também se ligam à vitronectina, à fibronectina, à laminina, à actinina, ao colágeno IV e a outros. Os mecanismos envolvidos na reprodução humana, desde o crescimento e desenvolvimento foliculares sob a influência dos esteróides ovarianos, a ovulação, a fertilização, a implantação do blastocisto no endométrio e, finalmente, a invasão e crescimento embrionário, exigem o conhecimento de todo o processo reprodutivo. Este trabalho objetiva revisão sobre o envolvimento das integrinas com o intrincado processo da reprodução humana. Relacionar essas moléculas de adesão ao processo de reprodução humana torna-as alvo interessante de pesquisa para explicar as falhas que ocorrem no processo de reprodução humana assistida.

Palavras-chave: Integrinas, infertilidade, reprodução humana, implantação, infertilidade masculina.

Abstract

The integrins are adhesion molecules, located in the plasmatic membrane of all cells of the human organism, except in the erythrocytes. They are responsible for many mechanisms of cellular function, as adhesion, orientation, migration, extracellular matrix organization, development and even the cellular growth, being present including in tumoral neoplasms cells. They are constituted by two chains of subunits α and β that relate each other through no covalents chemical ligations; eighteen subunits α and eight subunits β are known creating about for

twenty four integrins heterodimers. The subunit α regulates the adhesion of ligants and the extracellular conformation, while the subunit β that has intracellular predomination, is associated the cytoskeleton proteins, with modulate inside to out and outside to in, with the genes expression, with proliferation, with migration and with cellular differentiation. The structures in which they attach are short sequences of aminoacids founds in many places of the cellular matrix. The most known sequence is the Arginine-Glycine-Aspartic Acid, but they the attach to other molecules like vitronectin, fibronectin, laminin, actinin, collagen IV and others. Various mechanisms involved in the human reproduction process, beginning by follicular growth and development influenced by ovarians steroids culminating with ovulation; the fertilization, the blastocyst implantation in the endometrium, and the invasion and the embryonary growth, ask for a deep knowledge about the reproductive process. The aim for this work is to present a review about the integrins involvement with the complex process of the human reproduction. It points to its importance in researching the failures in the assisted reproductive techniques.

Keywords: integrins, infertility, human reproduction, human implantation, male infertility.

INTRODUÇÃO

A Matriz Extracelular (EMC) é constituída por intrincada rede de macromoléculas, que preenchem o volume do espaço extracelular, composto por proteínas e polissacarídeos secretados localmente e "amontoados" em malhas organizadas, próximas à superfície das células que os produzem. Na maioria dos tecidos conjuntivos, são secretadas por fibroblastos ou por suas subfamílias, os condroblastos ou osteoblastos. A adesão celular é fundamental para a célula, pois permite a sua ancoragem, orienta a sua migração e sinaliza o seu crescimento e sua diferenciação; as integrinas pertencem à família de moléculas responsáveis pela adesão celular a EMC. Foram assim nomeadas no final dos anos 80 por "integrarem" o meio externo com o citoesqueleto interno da célula, comunicando-o a EMC (Hynes et al. 1992).. As integrinas desempenham a adesão celular, direcionam a formação da EMC pelas células e estão relacionadas com a agregação das plaquetas, as funções imunes, o reparo tecidual e a invasão tumoral.

Dentro da biologia molecular, a descoberta das integrinas (Tamkun et al., 1986) torna-as potencialmente atrativas como participantes dos complexos eventos da fertilização, da implantação e da placentação.

Apesar das técnicas de reprodução assistida (RA) terem evoluído muito desde o nascimento do primeiro bebê como resultado da "fertilização *in vitro*", em 1978, ainda as taxas de implantação, fertilização e gestação permanecem apenas um pouco melhores que os resultados de uma gravidez natural. O desenvolvimento sincrônico do endométrio com as células embrionárias parece ser o ponto crítico do sucesso da implantação. A perda desta sincronia tem sido demonstrada como causa de perdas gestacionais e falhas de implantação. Lessey (2002) demonstrou a expressão de $\alpha\upsilon\beta3$ no endométrio e de outras integrinas como a $\alpha1\beta1$ e a $\alpha4\beta1$, expressas somente durante a fase secretora do ciclo menstrual e co-expressas durante a suposta "janela de implantação", entre os dias 20 e 24 do ciclo menstrual. As integrinas são os primeiros marcadores imuno-histoquímicos que realmente definem o período de receptividade máxima do endométrio.

As restrições éticas e as dificuldades experimentais em humanos dificultam a análise profunda da interação embrião-útero. Entretanto, o entendimento destes mecanismos se faz necessário, por permitir a compreensão das causas de infertilidade e de falhas na reprodução assistida, assim como para assegurar o nascimento de bebês saudáveis. O embrião representa uma unidade funcional ativa, com uma programação molecular própria e produção de fatores de crescimento que regulam seu desenvolvimento e diferenciação (Dey et al., 2004). O desenvolvimento e a diferenciação do embrião pré-implantação, que culmina na formação do blastocisto, requer a ativação do genoma embrionário. No embrião humano esta ativação acontece no estágio de quatro a oito células, e é essencial para a implantação (Artley et al. 1992). Em 1995 demonstrou-se que seis subunidades de integrinas ($\alpha3$, $\alpha\upsilon$, $\beta1$, $\beta3$, $\beta4$ e $\beta5$) são consistentemente expressas no meio do período de pré-implantação, tendo sido demonstradas subunidades de integrinas $\alpha2$, $\alpha4$, αL , $\beta2$ e $\beta7$ em pequeno número de oócitos.

Baseado nestes estudos de localização das subunidades, é possível que não menos que quatro complexos de integrinas sejam expressos no embrião durante o desenvolvimento pré-implantacional (complexos $\alpha3\beta1$, as $\alpha\upsilon\beta1$, as $\alpha\upsilon\beta3$ e as $\alpha5\beta5$). Recentemente, tem-se verificado o aumento gradual da expressão da subunidade $\alpha\upsilon$ integrina em embriões humanos desde o estágio de duas células até o estágio de blastocisto (Dubey et al., 2001).

OBJETIVO

Pesquisar através de revisão científica as funções fisiológicas das integrinas no sistema reprodutivo humano.

MATERIAL E MÉTODO

Revisão sistemática da literatura do período de 1980 a 2006 nos bancos-de-dados: MEDLINE e LILACS e, na internet : www.scholar.google.com, www.bireme.com.br e www.pubmed.com, sendo obtidos 97 trabalhos de maior ou menor relevância para o tema. As palavras-chave utilizadas foram: *integrins*, *infertility*, *human reproduction*, *human implantation*, *male infertility*.

1-CONSIDERAÇÕES FISIOLÓGICAS SOBRE AS INTEGRINAS

A - Estrutura e função

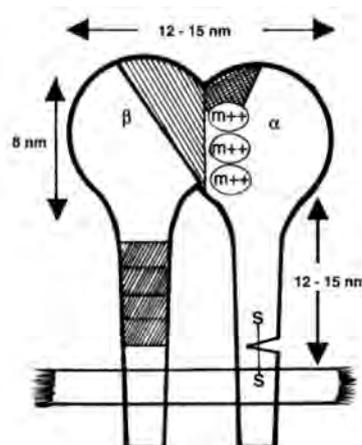
As integrinas compõem uma grande família de receptores heterodiméricos trans-membrana e cátions-dependentes, compostos por ligantes, não covalentes, com subunidades α e β . Atuam como moléculas de ligação trans-membrana ao se ligarem à matriz protéica (no exterior da célula) e ao citoesqueleto de actina, por meio da ligação via proteínas talina e α actina (no interior da célula). O tamanho dessas subunidades varia de 90 mil a 200 mil daltons (Hynes et. al, 1992).

As subunidades α e β são glicosiladas, mantidas por ligações não-covalentes. O receptor de fibronectina possui uma subunidade α constituída por uma única cadeia de polipeptídeos, a qual é clivada numa cadeia menor através da membrana citoplasmática e numa cadeia maior extracelular. Ambas são mantidas juntas por uma ponte dissulfídica constante (Savaris et al., 2000)

Na atualidade, dezoito α e oito β subunidades foram identificadas, com ligantes específicos. Além de expressar as integrinas específicas, as células são hábeis em modular as propriedades de ligação das mesmas: portanto, num dado tipo de célula, uma integrina, em particular, pode não exibir todas as suas especificidades. A especificidade ligante de cada heterodímero é determinada por combinações específicas de subunidades α e β (Hemler, 1990). A maioria das subunidades β pode associar-se com mais uma subunidade α (por exemplo, a $\beta1$ subunidade pode se combinar com mais ou menos 11 subunidades α diferentes).

A subunidade α regula a adesão de ligantes e a conformação extracelular, enquanto a subunidade β , com predomínio intracelular (40-60 aminoácidos), está associada com proteínas do citoesqueleto, com modulação de dentro-para-fora e de fora-para-dentro, com expressão de genes, com proliferação, com migração e com diferenciação celular. Estes efeitos são regulados pela fosforilação da porção intracelular da subunidade β (Sastry et al., 1993).

Figura 1: subunidade integrina mostrando a configuração, lado-a-lado, de uma possível localização rica em cisteína repetida da subunidade β e de metais se ligando aos locais da subunidade α (Magnésio 2+). A área sombreada representa as regiões de ligação entre as subunidades baseado na ligação através da membrana e seus ligantes (Hynes et al., 1992).



A região ligante necessita de uma seqüência de reconhecimento de aminoácidos para ambas as subunidades α e β . As estruturas, nas quais elas se ligam, são seqüências curtas de aminoácidos, presentes em vários locais (Figura1). A seqüência de reconhecimento mais comum é "Arginina-Glicina-Ácido Aspártico" (RGD). As integrinas que contêm a subunidade αv reconhecem a seqüência de ligação de três aminoácidos (RGD). As integrinas diferem dos receptores hormonais da superfície celular e de outras moléculas sinalizadoras solúveis, pois se ligam aos seus receptores com afinidade relativamente baixa ($K_a = 10^6$ - 10^9 litros/mol) e estão presentes com concentração de cerca de 10 a 100 vezes maior na superfície celular.

B - Modulação das integrinas

A regulação da expressão das integrinas é complexa e específica para cada tipo celular. Duas subunidades centrais de integrinas, αv e $\beta 1$, são produzidas em abundância e podem ser pareadas com muitas outras subunidades. O fator limitante de inserção de uma integrina na membrana citoplasmática é a disponibilidade de pareamento com a subunidade α ou β , sendo que a célula controla a expressão das integrinas, por meio do controle da produção dessas subunidades (Klein et al., 1993).

A célula expressa somente as integrinas necessárias para manter a sua função. Achado importante nas células neoplásicas, o padrão desordenado da expressão das integrinas contribui para o fenótipo celular aberrante. Uma célula normal tem a capacidade de mudar o seu complemento de integrina de acordo com os sinais do seu meio, como ocorre com a $\alpha 2 \beta 1$, a qual se liga ao colágeno na presença de Mg^{+2} , porém o Ca^{+2} inibe essa ligação (Ruoslahti et al., 1994).

Os fatores de crescimento e as citocinas são importantes fatores reguladores da expressão das integrinas. Por exemplo, as células endoteliais aumentam a expressão de $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha v \beta 4$, em resposta ao fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF) e, simultaneamente, diminuem a expressão de $\alpha 1 \beta 1$ e $\alpha v \beta 3$. Entretanto, as citocinas inflamatórias como a interleucina

-1 α (IL-1 α), geram diminuição da expressão da integrina $\alpha 6 \beta 1$ e aumento da integrina $\alpha v \beta 3$. O fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), por sua vez, aumenta a expressão da subunidade $\alpha 1$, aumenta esse controle em até três vezes, além de promover a síntese da secreção de vários componentes da EMC, incluindo a fibronectina, a osteopontina e os proteoglicanos (Klein et al., 1993).

2- INTEGRINAS E FUNÇÃO ENDOMETRIAL

O endométrio humano é composto por distintos arranjos de linhagens celulares. Estes incluem glândulas endometriais, células estromais, fibroblastos, células linfóides, células endoteliais e células musculares lisas, as quais revestem os vasos endometriais. A estrutura do endométrio requer arranjo distinto de moléculas, que contribuem para a distribuição celular, para o tráfego celular e para a interação das células constituintes da matriz endometrial, incluindo o colágeno, a fibronectina, a laminina e outras (Tabibzadeh, 1991).

Lessey et al (1992) e Shiokawa et al (1996) confirmam a presença de $\beta 1$ integrinas no endométrio humano e demonstram que a sua expressão é processo dinâmico relacionado ao ciclo menstrual (Tabela 1).

A distribuição de diferentes subunidades de α e β integrinas no tecido endometrial humano nos diferentes estágios do ciclo menstrual, tem sido determinada por imunohistoquímica (Figura 2).

Em humanos considera-se que as integrinas $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 6$ e $\beta 4$, presentes no epitélio endometrial, apresentam função importante na receptividade para a implantação do embrião (Sueoka et al., 1997). Atualmente, 14 integrinas têm sido identificadas no endométrio humano (Reddy et al., 1999).

Outros autores identificaram em humanos as subunidades de integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\alpha 9$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ e $\beta 6$ no epitélio luminal uterino, com a exceção da $\beta 5$ e $\beta 6$. Todas as integrinas listadas são, também, expressas no epitélio glandular, que exibem subunidades integrinas $\alpha 1$ e $\alpha 4$ (Lessey et al. 1996; Aplin et al., 1994; Reddy et al., 1999). Portanto, é possível que heterodímeros conhecidos que possam

Tabela 01: distribuição de subunidades de integrinas no endométrio normal por meio do ciclo menstrual.

Fase do ciclo	Subunidades de integrinas								
	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	αv	$\beta 1$	$\beta 4$
Fase proliferativa (dias 8/9)									
Células epiteliais	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Células estromais	-	+-	+-	-	-	+	-	+	+
Fase ovulatória (dias 14/15)									
Células epiteliais	+-	+-	+-	+	-	+	-	+	+
Células estromais	+-	+-	+-	+	-	+	-	+	+
Fase lútea média (dias 19/20)									
Células epiteliais	+	+	+	++	-	++	+++	+	+
Células estromais	+-	+	+	++	-	++	+++	+	+
Fase menstrual (dias 26/27)									
Células epiteliais	-	-	+-	+-	-	+	-	+-	+-
Células estromais	-	-	+-	-	-	+	-	+-	+-

Fonte : Reddy,2003

Figura 2: padrão da expressão das integrinas nas glândulas do endométrio humano P: Proliferativo S: Secretor I: Inicial M: Média T: Tardia. Adaptado de Lessey (1992) e Tabibzadeh (1995).

Expressão regulada						$\alpha v \beta 3$
					$\alpha 1 \beta 1$	
Expressão contínua	$\alpha 4 \beta 1$					
	$\alpha 2 \beta 1$	$\alpha 3 \beta 1$	$\alpha 5 \beta 1$	$\alpha 6 \beta 1$	$\alpha 6 \beta 4$	
	PI	PM	SI	SM	ST	

Fonte: Savaris, 2000

ser encontrados na superfície da cavidade uterina incluem $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha 1 \beta 5$ e $\alpha v \beta 6$.

Outros heterodímeros de integrinas expressos no endométrio são constitutivos ou estão pouco expressos durante a fase secretora média ($\alpha 2 \beta 1$ e $\alpha v \beta 6$) (Bischof et al. 1993). A $\alpha 4 \beta 1$ está ausente no endométrio proliferativo, aparece nas células epiteliais glandulares, justamente depois da ovulação (dia 14) e desaparecem no dia 24 do ciclo quando o período de receptividade endometrial máxima termina (Lessey 1996; Reddy et al., 1999).

A molécula de $\alpha 1 \beta 1$ é expressa nas células epiteliais, entre os dias 14 e 28 do ciclo. A $\alpha v \beta 1$ integrina está expressa nas células do epitélio glandular depois dos dias 19 e 20 do ciclo, quando a "janela de implantação" se fecha. Durante este período, a $\alpha v \beta 3$ aparece, pela primeira vez, nas células endometriais. Este período coincide com a receptividade uterina máxima (Reddy et al., 1999). Parece que a co-expressão destas integrinas, durante este período, seja crucial para o reconhecimento embrio-materno e a implantação do blastocisto (Reddy et al., 1999). A perda da expressão integrina $\alpha 4 \beta 1$ sinaliza o fechamento da "janela de implantação" (Lessey et al., 1996). Com a descoberta da $\alpha 1 \beta 1$ receptor colágeno/laminina (VLA-1) e sua expressão no epitélio endometrial na fase secretora, parece que a progesterona aumenta diretamente esta integrina no endométrio (Lessey et al., 1997).

3 - INTEGRINAS NO ESPERMATOZÓIDE

A subunidade integrina $\beta 1$ foi detectada no espermatozóide humano por análise fluxométrica (Glander et al, 1993). No testículo humano as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ têm sido detectadas por imuno-citoquímica, o que sugere função no arranjo das células de Sertoli-Sertoli, e na adesão espermatogônia-Sertoli.

A detecção de laminina ligada à membrana basal do túbulo seminífero do testículo humano, e a expressão da subunidade integrina $\alpha 6$ no espermátócito, na espermátide e no espermatozóide maduro, sugerem uma função da laminina e $\alpha 6$ na interação entre as células germinativas e somáticas durante a espermatogênese (Schaller et al. 1993).

Um número de integrinas pode facilitar a adesão do espermatozóide à zona pelúcida, por meio da migração através desta zona e, finalmente, à adesão das duas membranas plasmáticas por meio da ativação da proteína fertilina (Myles et al., 1997).

Após sofrer a reação acrossômica, o espermatozóide libera proteases que dissolvem a zona pelúcida do oócito e expõem lugares de ligação para o espermatozóide neste local. Após penetrar a zona pelúcida, o segmento equatorial do espermatozóide está hábil para se atar à membra-

na ooplasmática. Existem fortes evidências que integrinas e proteínas semelhantes às mesmas estão envolvidas nesta adesão. O primeiro candidato à ligação e à fusão de gametas é a proteína conhecida como "Fertilina" (pH 30), membro da família das "ADAMS" (Myles et al, 1997), identificadas em roedores, primatas e humanos.

A Fertilina é uma proteína heterodimérica composta de α e β subunidades. O domínio extracelular da subunidade β é caracterizado pela presença de "desintegrina" dominante que contém peptídeos ARG-GLY-ASP (RGD), um ligante conhecido de inúmeras integrinas. A fertilina reconhece uma integrina na superfície do oócito. Seguindo à ligação da desintegrina e a mudança estrutural do heterodímero fertilina, a subunidade α é exposta, e, ela media a fusão das duas membranas (Ramarao et al., 1994).

4 - INTEGRINAS NO OÓCITO

Durante o desenvolvimento folicular, as células da granulosa primeiramente apresentam atividade proliferativa, após se diferenciam em células secretoras de estradiol e, finalmente, se luteinizam produzindo progesterona. Em todos os seus estágios de desenvolvimento, as células da granulosa estão sujeitas a apoptose, processo que ocorre extensivamente nos folículos que se degeneram por atresia. Esta transição celular entre proliferação, diferenciação e apoptose, está sob o controle de vários fatores endócrinos e parácrinos, como as gonadotrofinas hipofisárias e fatores de crescimento. Entretanto, evidências sugerem que vários componentes da EMC ovariana, presentes na membrana basal do folículo, ao redor das células da granulosa, e no fluido folicular, são importantes reguladores da atividade das células da granulosa. Estes componentes da EMC agiriam através das integrinas (Monniaux et al, 2006).

Os oócitos expressam um único repertório de subunidades de integrinas: $\alpha 3$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$. Apesar de serem detectadas por mRNA e/ou análise de proteínas, não está bem claro como as integrinas se expressam na superfície do oócito (Sutherland et al., 1993)

Embora o oócito expresse diferentes subunidades de integrinas, a de maior importância na superfície do oócito tem sido a $\alpha 6 \beta 1$, onde o complexo pode facilitar a fertilização, por interagir com a fertilina. A ativação da $\alpha 6 \beta 1$ pode levar a sinais intracelulares que poderiam auxiliar no desenvolvimento do embrião. Mais estudos são necessários para avaliar, diretamente, a interação da fertilina com a $\alpha 6 \beta 1$ na fusão espermatozóide-oócito e na tradução de sinais e expressão em outros animais.

A distribuição de três subunidades de integrinas, $\alpha 3$, $\alpha 5$ e αv em oócitos maduros e imaturos tem sido examinadas usando-se a imunofluorescência e a microscopia confocal, observando-se que ambas $\alpha 5$ e αv estão presentes no estágio de vesícula germinativa, enquanto que a subunidade $\alpha 3$ só foi detectada em oócitos depois da quebra da vesícula germinativa, nas fases de metáfase I e II do oócito. Clavero et al. (2004) observaram a expressão da $\alpha 5$ integrina, significativamente, maior nas células granu-

losas obtidas de folículos cujos oócitos foram colhidos no estágio de metáfase II.

5 - INTEGRINAS E A FERTILIZAÇÃO

A fertilização em mamíferos envolve uma cascata de interações célula-célula e célula-matriz. Na adesão espermatozóide-oócito, a expressão de várias integrinas tem sido relatada em todas as espécies testadas. O espermatozóide se liga à zona pelúcida, e a várias proteínas da EMC ao redor do oócito. Este gatilho de interações, como a reação acrossômica, é seguido pela penetração do espermatozóide na zona pelúcida. Finalmente, após a passagem, liga-se e se funde com a membrana plasmática do espermatozóide. A fibronectina é detectada, imunocitoquimicamente, na cabeça do espermatozóide humano (Glander et al., 1987). A banda circular de fibronectina está presente no seguimento equatorial da cabeça do espermatozóide, na região na qual o espermatozóide primeiro interage com a membrana plasmática do oócito durante a fertilização (Glander et al., 1987).

Bronson e Fusi (1996) propuseram múltiplas etapas no processo de adesão: ação de selectinas; integrinas ancorando o espermatozóide ao oócito; cistatina/ $\beta 1$ espermática uma classe de integrina do óvulo e, fertilina ou moléculas relacionadas a ADAM, permitindo ligações irreversíveis no seguimento equatorial e na sua fusão pós-equatorial. O sistema CD46/C3b/ $\alpha 5 \beta 2$ também poderia participar desta etapa de adesão inicial. Uma das muitas moléculas ADAM espermáticas podem estar envolvidas por meio de ligantes nas integrinas do oócito; ligação e domínio de fusão podem estar localizados na mesma proteína ou presente em moléculas separadas.

Na ativação do oócito, as integrinas são receptores de membranas hábeis em traduzir sinais, via proteínas, do citoesqueleto (talina, vinculina e α - actinina) ligada à porção posterior do citoplasma. As subunidades integrinas influenciam a reorganização da actina. Este caminho induz a uma rápida fosforilação das proteínas submembranosas a quinases adaptadas, as quais ativariam uma cascata de fosforilação intracitoplasmática (Shwartz et al, 1995).

6 - INTEGRINAS E IMPLANTAÇÃO

A implantação embrionária é seqüência de eventos, extremamente coordenados, envolvendo a aderência, a aposição e, principalmente, a invasão do embrião dentro do útero. Entretanto, o embrião só pode se implantar no útero em um momento precisamente regulado, conhecido como "janela de implantação". A interação entre o embrião e o epitélio uterino é muito similar às interações leucócito - endotelial e ao processo metastático, onde as integrinas são as moléculas dominantes e as moléculas de adesão final no processo de junção (Lessey et al., 1992). Para o embrião humano, a implantação ocorre quando o tecido tissular endometrial e a configuração vascular alcançam estágio receptivo, na fase proliferativa e no início da fase lútea, sob a influência dos hormônios sexuais, dos fatores de crescimento e dos agentes angiogênicos e vasomotores .

Na ausência de gravidez, o estroma endometrial contém colágenos da EMC, que são colágenos I, III, V e VI, fibronectina de depósitos de tenascina periglandular. As subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 4$ estão expressas no epitélio endometrial

durante a fase lútea do ciclo ($\alpha 1$ do dia 15 ao dia 28 do ciclo e $\alpha 4$ do dia 14 ao dia 24 do ciclo).

A subunidade $\beta 3$ aparece no dia 20 do ciclo e co-existe com as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 4$ quando o embrião está implantado (dias 20 a 24). A unidade $\alpha 4 \beta 3$ é, então, um excelente marcador da "janela de implantação". As subunidades αv e $\beta 1$, também, estão presentes, além do mais, estão induzindo à organização de heterodímeros de integrinas, como a $\alpha v \beta 3$, a $\alpha v \beta 1$, a $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 1 \beta 1$ (Merviel et al., 2001).

Durante a fase na qual o embrião adere ao endométrio, um novo grupo de subunidades de integrinas ($\alpha 2$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$) se mostra neste blastocisto, que adquiriu a capacidade de estar implantado. As integrinas $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha 7 \beta 1$ ligam-se à laminina, que é encontrada em abundância na membrana basal do epitélio endometrial durante a "janela de implantação". Similarmente, a $\alpha 4 \beta 1$ é expressa no endométrio e interfere com a fibronectina trofoblástica. A superfície apical do trofoectoderma possui integrinas funcionais que participam do diálogo entre o blastocisto e os componentes da EMC e, são elas, três subunidades $\alpha 2$, $\alpha 6 A$ e $\alpha 7$, são expressas quando o blastocisto se torna competente para aderir-se (Bevilacqua et al., 1988).

7 - INTEGRINAS DECIDUAIS

A decidua humana se diferencia da linhagem uterina estromal dentro da atividade do tecido secretor, sob estímulo hormonal na gravidez inicial. A decidua materna está em contacto direta com o trofoblasto fetal; além do mais, esta provém de ambiente hospitaleiro para a implantação do blastocisto. Wewer et al (1985) identificaram imunohistoquímica e morfologicamente três subpopulações separadas de células deciduais que podem representar diferentes estágios de linhagem da célula decidua humana. A decidualização parece representar um contínuo arranjo de células estromais para células deciduais maduras hipertrofiadas. A expressão da $\beta 1$ integrina nas células deciduais pode representar algum ou todos desses estágios de diferenciação .

O padrão de distribuição pericelular da EMC ao redor das células deciduais individuais sugere que receptores desta estão presentes na superfície das células deciduais. O estudo prévio de Sueoka et al. (1998), usando citometria de fluxo, revelou que as células deciduais expressam altos níveis de $\alpha 1$ e $\alpha 2$ subunidades de integrinas e níveis moderados de $\alpha 5$ e $\alpha 6$ subunidades.

8 - EXPRESSÕES DE INTEGRINAS NOS EMBRIÕES

Poucas informações são conhecidas a respeito das moléculas de adesão celular durante a embriogênese pré - implantacional em seres humanos. O mecanismo pelos quais as $\beta 1$ integrinas promovem o crescimento trofoblástico, pode estar relacionado à sua conhecida função de adesão e sua participação na fixação celular, na separação e na migração celular (Ruoslahti et al, 1987). Proteínas da EMC estão expressas durante a embriogênese inicial.

Campbell et al (1995) demonstraram que seis subunidades de integrinas ($\alpha 3$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$) são consistentemente expressas durante o período pré - implantacional. Evidências têm demonstrado subunidades de

integrinas $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\beta 7$ em um pequeno número de oócitos. Baseado neste estudo de localização das subunidades é possível que quatro complexos de integrinas ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$) possam estar expressos nos embriões durante o desenvolvimento pré - implantacional. Recentemente, a subunidade de integrina αv foi demonstrada por estar expressa em embriões humanos, em seu estágio de desenvolvimento inicial, no estágio de duas células até o estágio de blastocisto.

A expressão da subunidade integrina αv aumenta gradualmente com o desenvolvimento do embrião e pode ser medido, quantitativamente, por análise de imagem (Dubey et al., 2001). Especificamente, a cadeia de laminina $\beta 1$ e $\beta 2$ aparece no estágio de quatro células. A fibronectina e o colágeno tipo IV são, primeiramente, conectados no estágio de blastocisto (Wu et al., 1983). Os anticorpos monoclonais direcionados contra as $\beta 1$, as $\alpha 1$, as $\alpha 2$, as $\alpha 5$ e as $\alpha 6$ subunidades, afetam ao desenvolvimento do embrião, mas não às suas adesões, sugerindo que estas e o desenvolvimento do blastocisto podem ser mediados por mecanismos diferentes. Consequentemente, a expansão do trofoblasto envolve inúmeros eventos celulares necessários para produzir mudanças morfológicas e migração celular (Sutherland et al., 1993).

9 – INTEGRINAS E O DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO

Após a adesão do trofoectoderma, o trofoblasto começa a invadir o útero e formar a placenta funcional através de interface entre o suprimento de sangue materno (hemocorial) e os vasos da parede uterina. Ainda é desconhecida a real forma de invasão que o trofoblasto usa, mas acredita-se que ocorra uma fagocitose do epitélio uterino. Ao invadir, as células do trofoblasto secretam metaloproteínas que facilitam a sua migração entre as células epiteliais uterinas; as células do trofoblasto se proliferam rapidamente. A participação das integrinas poderia ser manter o desenvolvimento e a arquitetura da placenta, criar nova vascularidade (angiogênese), ajudar na migração das células trofoblásticas e na transdução de sinais ativadores específicos que promovem o desenvolvimento fetal (Cross et al., 1994).

O citrotrofoblasto proximal, que está ancorado às vilosidades, expressa integrina $\alpha 6\beta 4$; esta integrina se liga ao desmossomo e é um marcador do epitélio normal. Estas células também expressam integrinas $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 6$, que podem impedir a migração celular. A importância dessas integrinas estaria em limitar a migração do citrotrofoblasto (Zhou et al., 1997). Como as células do citrotrofoblasto formam colunas que se tornam ancoradas às vilosidades, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha v\beta 6$, não se expressam por muito tempo; ao terminar a formação do trofoblasto em colunas ele será chamado de citrotrofoblasto em concha, e as células expressam a integrina $\alpha v\beta 3$, que pode facilitar a invasão.

Referências:

Aplin, JD., Seif, MW., Graham, RA., Hey, NA., Behzad, F, Campbell S. The endometrial cell surface and implantation: expression of the polymorphic mucin MUC-1 and adhesion molecules during the endometrial cycle. *Ann N Y Acad Sci* . 1994; 734: 103-21.

Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Human Reprod* 1992; 7: 1014-1021.

Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. *J. Morphol* 1988; 198: 341-351.

Bischof, P., Redard, M, Gindre, P, Campagna, A. Localization of $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$ integrin subunits in human endometrium, decidua and trophoblast. *Eur J Obstet Gynecol*. 1993; 51: 217-26.

Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD. *Mol Hum Rep*. 1995; 1, ver *Hum Rep* , 10: 1571-1578.

Clavero A, Castilla JA, Martinez L, Mendoza N, Fontes N, Maldonado V. Expression of integrin fraction and adhesion molecules in human granulosa cells and its relation with oocyte maturity and follicular steroidogenesis. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 187-95.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994 ; 266: 1508-1518.

Dey SK, Lim H, Sanjoy K, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endoc Rev* 2004. 25: 341-73.

Dubey AK, Cruz JR, Hartog B, Gindoff PR. Expression of the αv integrin adhesion molecule during development of pre-implantation human embryos. *Fertil Steril*. 2001; 76: 1153-56.

Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, Montesano M, Ferrari A, Bronson RA. The expression αv , $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\beta 3$ integrins chain on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Mol Human Reprod* ; 2: 169-175.

Glander HJ, Herrmann K, Hausteil UF. The equatorial fibronectin band (EFB) on human spermatozoa : a diagnostic help for male infertility? *Andrologia* 1987; 19: 456-459.

Glander HJ, Schaller J. Beta-1 integrins of sperm- a flow cytometric analysis *Int J Androl* 1993; 16: 105.

Hemler EM. VLA proteins in the integrin family: structures functions and their role in leukocytes. *Annu Immunol* 1990 ; 8 : 365- 400.

Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69: 11-25.

Klein S, Giancotti FG, Presta M, Albelda SM, Buck CA, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cell. *Mol Biol Cell*. 1993; 4: 973-82.

Lessey, BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM., Buck CA. (1992). Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest.* **90**, 188-195.

Lessey, B.A., Ilesanmi, A.O., Lessey, M.A., Riben, M., Harris, J.E., Chwalisz, K. Luminal and glandular endometrial epithelium express integrins differentially throughout the menstrual cycle: implications for implantation, contraception and infertility. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996; 35, 195-204.

Lessey BA, Young SL. Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 291-99.

Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 101-12.

Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S. The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diag Ther*. 2001; 16: 364-71.

Monniaux D, Calderwood CH, Le Bellego F, Fabre S, Monget P, Calderwood DA. Integrins in the ovary. *Sem Reprod Med* 2006; 24: 251-61.

- Myles DG, Promakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins p-20 and fertilin in arriving at, and fusing with the egg. *Biol Reprod* 1997; 56: 320-27.
- Ramarao CS, Myles DG, Promakoff P. Multiple roles for p20 and fertilin in sperm-egg interactions. *Semin Cell Dev Biol* 1994; 5: 265-71.
- Reddy KVR, Meherji PK. Integrin cell adhesion molecules in endometrium of fertile and infertile women throughout menstrual cycle. *Ind J Exo Biol* 1999; 37: 323-31
- Reddy KVR, Rajeev SK, Gupta SM. $\alpha\beta 1$ integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertil Steril* 2003; 79: 1590-96.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspective in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497.
- Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA. Integrins. *Kidney Int* 1994; 45: 17-22.
- Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains; mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Op Cell Biol* 1993; 5: 819-31.
- Savaris R, Zettler CG. As integrinas na Reprodução Humana. *Femina* 2000; 28: 67-70.
- Schaller J, Glander HJ, Dethloff J. Evidence of $\beta 1$ integrin and fibronectin on spermatogenic cells in human testis. *Human Reprod* 1993; 8: 1873.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549-99.
- Shiokawa S, Yoshimura Y, Nagamatsu S, Sawa H, Hanashi H, Oda T. Expression of $\beta 1$ integrins in human endometrial stromal and decidual cells. *J Clin Metabol* 1996; 81: 1533-40.
- Sueoka K, Shiokawa S, Toyohiko M, Kuji N, Tanaka M, Yoshimura Y. Integrins and reproductive physiology; expression and modulation in fertilization, embryogenesis and implantation. *Fertil Steril* 1997; 67 (5), 799-811.
- Sueoka K, Shiohara M, Tsachiya S, Kobayashi N, Kuroshima M. A flow cytometry of C-Kit positive spermatogonia. *J Fertil Impl (Tokyo)* 1998; 15: 102-4.
- Sutherland AE, Colarco PG, Damsky CH. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 1993; dec 119 (4): 1175-86
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986; 46: 271-82.
- Tabibzadeh S. Distinct subsets of stromal cells confined to unique microenvironments in human endometrium through the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26: 5-10.
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbolic interaction between blastocyst and endometrium adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995; 10: 1579-1602
- Wewer UM, Faber M, Liotta LA, Albrechtsen R. Immunochemical and ultrastructural assessment of the nature of the pericellular basement membrane of human decidual cells. *Lab Invest* 1985; 53: 624-33.
- Wu TC, Wan YJ, Chung AE, Damjanov I. Immunohistochemical localization of entactin and laminin in mouse embryos and fetuses. *Dev Biol* 1983; 100: 496-505.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janaptour M, Genbacev O, DeJena E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: a strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-2151.

Transplante autólogo de tecido ovariano para o peritônio de ratas após congelamento e descongelamento

Autologous transplantation of cryopreserved ovarian tissue to the peritoneum of rats

Luis Felipe Victor Spyer Prates¹, Felipe Massote², José Helvécio de Souza Kalil³, Selmo Geber⁴

¹ Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

² Cirurgião Geral

³ Doutor em Ginecologia pela Faculdade de Medicina (FM) da UFMG

⁴ Faculdade de Medicina (FM) da UFMG, Clínica Origen, BH

Serviço:

Trabalho executado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Financiamento:

Não houve

Resumo

Um dos problemas da medicina reprodutiva é a incapacidade da preservação de oócitos em candidatas a tratamento químico ou radioterápico e/ou cirurgia. O transplante de tecido ovariano criopreservado poderia, além de recuperar a capacidade fértil, ser alternativa à terapia de reposição hormonal. **Objetivo:** verificar a viabilidade funcional do transplante ovariano autólogo para o peritônio, após congelamento e descongelamento. **Métodos:** Estudo experimental descritivo com 67 ratas Holtzman: grupo 1 (20), submetido a ooforectomia bilateral; grupo 2 (24), submetido a laparotomia e inspeção ovariana e grupo 3 (23), ooforectomia bilateral seguida de congelamento de um dos ovários e posterior descongelamento e transplante peritoneal, à esquerda do feixe vaso-nervoso epigástrico esquerdo. Foi realizada citologia vaginal funcional por 10 dias nos três grupos e análise histopatológica dos ovários transplantados para avaliação da função ovariana. **Resultados:** Todas as 20 ratas ooforectomizadas apresentaram padrão persistente de atrofia na citologia vaginal, compatível com ausência de ciclo estral. No grupo controle, todas apresentaram citologia vaginal típica de estro. No grupo transplante, 21 animais (91,3%) apresentaram alterações citológicas compatíveis com ciclo estral. Aplicado modelo de regressão logística, não se verificou efeito significativo do tipo de intervenção cirúrgica na probabilidade da ocorrência de ciclos irregulares. Após 40 dias do transplante, todos os 23 ovários apresentavam folículos em todas as fases de desenvolvimento, além de corpos lúteos. **Conclusão:** o transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas, após congelamento e descongelamento, é capaz de restaurar o desenvolvimento folicular adequado, havendo até mesmo evidências da ocorrência de ovulação nos implantes.

Palavras-chave: Transplante, ovário, criopreservação, ratos

Abstract

One of the major problems against reproductive medicine is the incapacity of oocyte preservation. In these cases, ovary preservation could restore hormonal e fertility capacity. Objective: Assess the ovarian function after removal of the

ovaries, cryopreservation and intraperitoneal autotransplantation. Materials/Methods: Prospective experimental study involving 67 Holtzman rats randomized to one of the three groups: Group 1 (20) bilateral oophorectomy, Group 2 (24) sham operation, Group 3 (23) cryopreserved ovarian autotransplantation group. The rats in Group 3 had frozen/thawed ovaries replaced to the peritoneum 10 days after freezing with DMSO. Daily vaginal cytology was performed for 10 days starting 7 days after surgery in group 1 and 2, and 15 days after surgery in group 3. Histologic examination of the transplanted frozen/thawed ovarian tissue was performed in all cycling animals 40 days following transplantation. Results: In group 1 none of the animal showed cytologic alterations compatible with estrus. All animals in group 2 were considered as having hormone secretion. Cytologic examination of vaginal smears from group 3 revealed 21 animals with the normal cycle (91.3%). Morphologic study of the ovaries showed no ischemic or inflammatory alterations and all ovaries showed follicles in different stages of maturation, i.e., viable primordial, antral follicles and corpus luteum. Conclusions: Our study demonstrates that frozen/thawed ovaries transplanted to the peritoneum without vascular anastomosis in rats preserve endocrine and reproductive functions.

Key-words: Transplantation, ovary, cryopreservation, rats

INTRODUÇÃO

A necessidade de preservação dos gametas femininos e o problema da reposição hormonal relacionado à melhor droga, dose e via de administração, indicações e efeitos colaterais são assuntos que vêm sendo discutidos há décadas e que até o momento não apresentam soluções definitivas. O banco de tecido ovariano congelado pode ser uma das alternativas possíveis para atender estas questões e encontra-se em investigação experimental tanto em animais quanto em humanos, ainda em fases iniciais. Ele pode ser uma solução para a preservação da fertilidade em pacientes com câncer, situação em que o tratamento poderá levar à falência hormonal, assim como

o que ocorre em pacientes com endometriose grave ou tumores ovarianos benignos.

No ano de 2006, foram estimados 1.399.790 novos casos de câncer nos Estados Unidos, sendo 679.540 em mulheres e 8% disso em mulheres abaixo de 40 anos (Jemal et al., 2006). A American Cancer Society (ACS) preconizou que, em 2007, ocorreriam 22.430 eventos novos em relação aos tumores ovarianos e 11.150 eventos de tumor do colo uterino (ACS, 2008).

Os efeitos das quimioterapias, radioterapias e cirurgias mutiladoras no futuro da fertilidade são matéria de estudos e preocupações das pacientes e de seus familiares. A quimioterapia, especialmente quando se utilizam agentes alquilantes, é reconhecidamente gonadotóxica (Lobo, 2005). Já a dose de radiação calculada para destruir 50% da reserva oocitária é estimada em menos de 2 gray (Gy) (Wallace, 2003).

O único método estabelecido até o momento e rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução assistida é a criopreservação de embriões, mas essa opção requer estimulação ovariana, coleta de oócitos e fertilização *in vitro*, o que pode levar entre 2-5 semanas. Assim, o atraso no início do tratamento quimioterápico para o armazenamento de embriões não é factível para algumas pacientes e pode ser, até mesmo, um risco em alguns tipos de câncer. Mais ainda, esse método não deve ser considerado uma opção em garotas pré-puerperais e é freqüentemente inaceitável por mulheres que não possuem parceiro fixo e naquelas que não desejam utilizar espermatozoide de doadores (Kim, 2006).

Outra alternativa é a criopreservação de oócitos, que pode ser utilizada em mulheres sem parceiro sexual definido e que tenham condições de serem submetidas a um ciclo de estimulação ovariana antes do início da quimioterapia (Jain & Paulson, 2006). Meta-análise publicada por Oktay et al. (2006a) mostrou: taxa de nascimento por oócito descongelado variando de 1,9 a 2,0%; taxa de nascimento por oócito injetado de 3,4% e por embrião transferido de 21,6%. Pode ser considerado um método promissor, mas ainda assim apresenta baixas taxas de sucesso.

A criopreservação de tecido ovariano é a única opção disponível para mulheres pré-púberes e para aquelas em que não é possível postergar o início da quimioterapia. O congelamento de tecido ovariano foi realizado, até o momento, por três técnicas: ovário inteiro com pedículo vascular, fragmentos do córtex ovariano e folículos isolados. A maioria das pesquisas animais e em humanos concentra-se em métodos de congelamento e transplante de fragmentos da córtex avascular, sendo que essa técnica foi a única que possibilitou a ocorrência de nascimentos em humanos até o momento (Donnez et al., 2006). Realmente, a preservação do tecido ovariano através de congelamento/descongelamento tem se mostrado um sucesso em animais, mas existe ainda a questão de como desenvolver esses folículos imaturos armazenados no tecido congelado e permitir a fertilização. Algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para permitir o desenvolvimento dos folículos, entre elas cita-se o transplante autólogo/heterólogo e a cultura *in vitro*. A estratégia mais desejada seria a que permitisse o desenvolvimento de um meio que possibilitasse o crescimento e maturação in

vitro, considerando a ausência de novos procedimentos cirúrgicos, melhor acompanhamento do desenvolvimento e risco zero de transmissão de células cancerosas (Shaw et al., 1996). Apesar de já ser possível isolar folículos primordiais de tecido ovariano humano, não se obteve sucesso na sua maturação *in vitro*. A confirmação da viabilidade do transplante autólogo foi confirmada por Barros et al. (2001), após demonstrarem que o transplante ovariano autólogo, sem reanastomose vascular, em peritônio de ratas castradas, restaura o ciclo estral desse animal e o desenvolvimento folicular adequado.

OBJETIVO: do nosso estudo foi verificar a viabilidade funcional hormonal do transplante ovariano autólogo para o peritônio de ratas, após o congelamento e descongelamento, através de citologia vaginal seriada e estudo histológico dos fragmentos de ovários transplantados.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo experimental descritivo que utilizou ratas albinas da raça Holtzman, nuligestas, com idade e peso semelhantes. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A abordagem dos animais foi feita de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque e com as Normas Internacionais de Proteção aos Animais (Cooper, 1985).

As ratas foram divididas em 3 grupos e os animais foram operados em conjuntos de 6, todos pertencendo à mesma ninhada, sendo 2 para cada um dos grupos de estudo, de forma aleatória. No grupo 1 (n=20) foi realizada ooforectomia bilateral. No grupo 2 (n=24), foi realizada laparotomia e inspeção dos ovários (controle). No grupo 3 (n=23) foi realizada ooforectomia bilateral, seguida de congelamento e descongelamento de um dos ovários e posterior transplante para a superfície peritoneal, à esquerda do feixe vasculo-nervoso epigástrico esquerdo (transplante). Desta maneira, os três grupos foram emparelhados quanto à habilidade do cirurgião, no decorrer do experimento e ao tempo decorrido entre a cirurgia e o início da realização da citologia vaginal funcional. Todas as ratas foram identificadas por meio de pequenas incisões ($\pm 0,5$ cm) nas orelhas das mesmas.

Os ovários removidos foram colocados em meio de cultura tamponado (Hepes buffered - Earle's Balanced Salt Solution) em tubos Eppendorf numerados, em gelo, para transporte. Os ovários foram então preparados para o congelamento, através da retirada de toda gordura peritoneal e peri-ovariana e secção em duas metades. Foi realizado o congelamento de apenas uma das metades de cada ovário. Cada fragmento foi lavado por três vezes em meio de cultura tamponado contendo 10% de substituto sintético de soro (SSS - Irvine® - Estados Unidos da América - EUA) e então colocado em criotubos contendo um volume final de 1,8 ml de crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich® - EUA) 1,5 Molar, acrescido de 10% de SSS. Os criotubos foram identificados com a mesma marcação dos tubos Eppendorf que continham os ovários previamente. Em seguida, foram colocados em uma máquina de congelamento (KRYO 10 - Planer - EUA) para a realização do

procedimento, seguindo-se o protocolo lento, primeiramente descrito por Newton et al. (1996). Inicialmente, a temperatura foi reduzida em 2°C por minuto até atingir a temperatura de -9°C, quando foi realizado o seeding e a temperatura foi mantida por 10 minutos. Em seguida, as rampas foram de: 3°C por minuto até -40°C e 10°C por minuto até atingir -140°C, quando os tubos foram levados para os racks e inseridos em nitrogênio líquido a -196°C, onde foram mantidos por 10 dias (Geber et al., 2002).

O descongelamento de cada fragmento de ovário foi realizado após 10 dias do congelamento, individualmente na manhã do transplante seguindo protocolo rápido (Newton et al. 1996): os tubos foram colocados em banho-maria à temperatura de 37°C por 3 minutos em agitação. A metade do ovário descongelada era, então, suturada com um ou dois pontos simples à superfície peritoneal, à esquerda do feixe vaso-nervoso epigástrico esquerdo.

A citologia vaginal funcional foi realizada por 10 dias seguidos, nos três grupos, e iniciada 7 dias após a cirurgia nas ratas dos grupos 1 e 2, e 15 dias após a segunda cirurgia nas ratas do grupo 3. O padrão de atrofia foi definido pelos achados citológicos das ratas do grupo 1 (Ooforectomia). O ciclo foi considerado inadequado quando havia estro persistente, por pelo menos quatro dias, ou quando não havia uma ciclicidade com padrão proestro => estro => metaestro => diestro => proestro.

As ratas do grupo do transplante (Grupo 3) foram sacrificadas por meio de deslocamento cervical 40 dias após a segunda cirurgia e tiveram seus implantes ovarianos excisados e preparados para análise histológica. As lâminas foram estudadas no microscópio ótico, com aumentos de 100 e 400 x (Nikon Labophot 2, Japão), procurando-se folículos nos seus vários estágios de desenvolvimento (primordiais, primários, pré-antrais e antrais) e corpos lúteos, de acordo com as características descritas por Oktay et al. (1995).

RESULTADOS

Um total de 67 ratas, todas com aproximadamente 60 dias de vida, foram incluídas neste estudo. Não foram observados óbitos ou perdas durante a realização do mesmo. O peso das ratas variou de 200 a 350g e não houve diferença significativa entre os três grupos pela análise de variância ($p = 0,432$).

Com relação à análise do ciclo hormonal estral nas ratas estudadas, no grupo 1 (ooforectomia), todas as 20 ratas apresentaram um padrão persistente de atrofia na citologia vaginal, compatível com ausência de ciclo estral. No grupo 2 (controle), todas as ratas apresentaram citologia vaginal típica de secreção hormonal cíclica (estro). No grupo 3 (transplante), 13 animais apresentaram ciclo estral normal e 8 apresentaram alterações citológicas compatíveis com o ciclo estral. Uma rata teve 4 dias de diestro e 2 de metaestro, outra apresentou 3 dias de estro, seguido de 1 dia de metaestro e 1 dia de diestro.

O estudo histológico para análise morfológica dos ovários congelados/descongelados e transplantados demonstrou uma ausência de alterações isquêmicas ou inflamatórias, e todos os ovários apresentaram folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação, isto é, folícu-

los primordiais, antrais e corpo lúteo. Verificou-se uma grande quantidade de vasos sanguíneos, em todos os cortes de todos os implantes, traduzindo a intensa revascularização dos tecidos.

DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou a viabilidade funcional hormonal do transplante ovariano autólogo para o peritônio de ratas, após o congelamento e descongelamento, através de citologia vaginal seriada e estudo histológico dos ovários transplantados.

Optamos por utilizar ratas com o mesmo peso e a mesma idade, com objetivo de evitar as possíveis interferências desses, no resultado final. As ratas da mesma ninhada foram aleatorizadas para os três grupos a fim de evitar interferência da habilidade do cirurgião, uma vez que a curva de tempo de aprendizado poderia ser fator de viés nos resultados.

Utilizamos o DMSO para o congelamento, devido a nossa maior experiência com esse crioprotetor (Geber et al., 2002). Mais ainda, Newton et al. (1996) compararam a eficácia de diversos crioprotetores (DMSO, Propileno-glicol, Etileno-glicol, Glicerol) avaliando a viabilidade de fragmentos de tecido ovariano que foram congelados através de protocolo lento e transplantados para ratas imunodeficientes.

O posterior transplante do tecido ovariano criopreservado é outro fator fundamental para a aplicação da técnica de congelamento ovariano. A simplicidade do procedimento e sua viabilidade técnica são os principais aspectos a serem considerados, uma vez que não adiantará se preservar o tecido ovariano se não houver condições de reimplantá-lo. O uso da técnica de transplante sem reanastomose vascular para a superfície peritoneal já foi comprovadamente demonstrado como viável por nosso grupo (Barros et al., 2001) e apresenta as vantagens de ser um procedimento simples, que evita a utilização das complexas técnicas e do material de microcirurgia.

Quando procedemos ao estudo histológico dos ovários transplantados após criopreservação, não observamos alterações isquêmicas ou inflamatórias e todos os ovários apresentaram folículos em diferentes estágios de desenvolvimento e maturação, isto é, folículos primordiais, antrais e corpo lúteo. Verificou-se uma grande quantidade de vasos sanguíneos, em todos os cortes de todos os implantes, traduzindo a intensa revascularização dos tecidos. Segundo Dissen et al. (1994), é necessário um intervalo de aproximadamente 7 dias para que ocorra a revascularização total do implante e conseqüente retomada da produção hormonal. Em nosso estudo, aguardamos um período de 15 dias entre o transplante e o início da coleta de citologia para que não houvesse dúvida com relação à funcionalidade no implante. Já em relação ao crescimento folicular, Freeman (1994) relata que este dura entre 8 e 14 dias e que a duração máxima do corpo lúteo é de 19 dias. Assim, a presença de folículos nos seus estágios avançados de desenvolvimento, incluindo os grandes folículos antrais, e o encontro de corpos lúteos nos implantes, após um intervalo mínimo de 20 dias, descartam a possibilidade de que estes elementos estivessem presentes desde o momento da primeira cirurgia, já que o estudo histológico foi realizado 40 dias após a segunda cirurgia.

Com relação à análise do ciclo hormonal estral nas ratas estudadas, pudemos verificar que, como esperado, no grupo ooforectomizado, todas as ratas apresentaram um padrão persistente de atrofia na citologia vaginal. No segundo grupo, que foi submetido apenas à laparotomia, todas as ratas apresentaram citologia vaginal típica de secreção hormonal cíclica (estro), mostrando que o procedimento cirúrgico por si só não leva a alterações importantes na secreção hormonal.

A eficácia do transplante de tecido ovariano congelado, em nosso estudo, foi comprovada pela presença de 91% de ratas com ciclo estral regular e 100% de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, ao exame histológico. Em apenas 2 ratas não identificamos ciclo estral regular, mesmo com evidências de desenvolvimento folicular à histologia. Diversas hipóteses podem ser levantadas para explicar a ausência de ciclos regulares em duas ratas, levando à produção hormonal irregular: isquemia transitória do tecido durante transporte; ausência de neovascularização suficiente para suprir o tecido transplantado; reação endócrina metabólica prolongada no pós-operatório; e até mesmo o fato das ratas do grupo transplantado terem sido submetidas a dois procedimentos cirúrgicos, o que pode ter aumentado a necessidade metabólica nesse grupo devido ao stress, levando a aumento da necessidade de suprimento sanguíneo. Esses fatos podem ter ocorrido no intervalo entre o transplante e o início da coleta de material e, provavelmente, normalizado-se no período entre a coleta da citologia e o estudo histológico.

A taxa de sucesso de ciclos estrais regulares observada após o transplante de fragmentos de tecido ovariano em ratas, em nosso estudo, foi semelhante ou maior do que a observada na literatura (Sugimoto et al., 2000; Kagabu & Umezu, 2000; Yin et al., 2003).

Em humanos, Donnez et al. (2004) descreveram o primeiro relato de gravidez após reimplante de tecido ovariano descongelado sobre ovário remanescente. Em 2005, Meirrow et al. descreveram FIV e posterior gravidez após reimplante de tecido ovariano criopreservado para o ovário remanescente. Demeestere et al. e Rosendahl et al., em 2006, publicaram relatos de gravidezes espontâneas e após FIV, em mulheres submetidas a transplante autólogo de tecido ovariano criopreservado para o ovário remanescente. Anderson et al. (2007) (*in* Demeestere et al., 2007) relataram o terceiro caso de nascimento a partir de transplante ovariano autólogo e ICSI. Segundo Demeestere et al. (2007), já foram descritos mais de 25 casos de transplante ortotópico e/ou heterotópico em humanos de tecido ovariano criopreservado e apenas 4 nascimentos a partir dessa técnica, sendo duas gestações obtidas através de fertilização assistida e as outras duas a partir de ciclos naturais, sendo o quarto descrito no próprio estudo. Apesar desses relatos de gravidezes em humanos, ainda permanecem dúvidas a respeito da origem desses oócitos, já que, em todos os casos, havia ovário residual que poderia ter reassumido sua função (Oktay, 2006b).

Nosso estudo demonstrou que ovários congelados e posteriormente descongelados e transplantados para o peritônio sem anastomose vascular em ratas preservam a função endócrina. Estes achados podem auxiliar no desenvolvi-

mento de protocolos de transplante autólogo de ovários humanos para mulheres com risco aumentado de falência ovariana, incluindo aí pacientes submetidas a tratamento radio e/ou quimioterápico, cirurgias castradoras, mulheres que desejam postergar a maternidade. Além desse benefício, outras perspectivas futuras surgem para o uso do transplante ovariano. A sua utilização em substituição à terapia de reposição hormonal do climatério seria uma alternativa mais fisiológica. Com o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras cada vez mais potentes e com menos efeitos colaterais, para a prevenção da rejeição de tecidos não-autólogos e com o aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação e de crioprotetores, poderia se pensar em um banco de tecido ovariano. Entre as pacientes que se beneficiariam da existência desse tipo de banco, estão as portadoras de disgenesia gonadal, aquelas com falência ovariana precoce e até mesmo mulheres que tiveram que atrasar o projeto maternidade.

Referências

- American Cancer Society (ACS). www.cancer.org. Estimated new cancer and death for 2007 and 2008, 02/2008.
- Barros FV et al. Transplante ovariano autólogo em peritônio de ratas. *J Bras Rep Assist.* 2001; 5: 60-3.
- Cooper M. Ethics and Laboratory animals. *Vet. Rec.* 1985; 116: 594-5.
- Demeestere I et al. - Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2010-14.
- Demeestere I et al. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncol.* 2007; 12: 1437-42.
- Dissen GA. et al. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinol.* 1994; 134: 1146-54.
- Donnez J et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004; 364: 1405-10.
- Donnez J et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum. Reprod. Upd.* 2006; 12: 519-35.
- Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E and Neil JD. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. 1994; p.353-74.
- Geber S, Sales L, Sampaio MAC. Laboratory techniques for human embryos. *Reprod. Biomed. Online.* 2002; 5: 211-18.
- Jain JK. and Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril.* 2006; 86: 1037-46.
- Jemal A et al. Cancer Statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 2006; 56: 106-30.
- Kagabu S and Umezu M. Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp. Anim.* 2000; 49: 17-21.
- Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil. Steril.* 2006; 85: 1-11.
- Lobo RA. Potential options for preservation of fertility in women. *N Engl J Med.* 2005; 353: 64-73.
- Meirrow D et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Eng J Med.* 2005; 353: 18-321.
- Newton H et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1487-91.
- Oktay K et al. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol. Reprod.* 1995; 53:

295-301.

Oktaç K et al. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2006 a; 86: 70-80.

Oktaç K et al. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum. Reprod.* 2006 b; 21: 1345-8.

Rosendahl M et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2006-9.

Shaw JM. et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1668-73.

Sugimoto M et al. Development of infantile rat ovaries auto-

transplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenol.* 2000; 15: 1093-103.

Wallace WH. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 117-21.

Yin H et al. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1165-72.

Endereço para correspondência:

Luis Felipe Victor Spyer Prates

R. Maranhão 774 – Funcionários – CEP 30150-130 – Belo Horizonte/MG

Telefone: 3281-1090

lf@drloisfelipe.com.br

Marcadores de espermatogênese e fatores preditivos de biópsia testicular positiva.

Markers of spermatogenesis and predictive factors for successful testicular sperm

Autores: André Jafeth, Bruno Brum Scheffer, Rafaela Brum Scheffer, Juliano Brum Scheffer

Instituição: Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida - IBRRA

Resumo

A recuperação de espermatozóide testicular de pacientes azoospermicos seguido de injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI) é progresso recente no tratamento da infertilidade masculina. O hormônio anti-mulleriano (AMH) também conhecido como *Mullerian inhibiting substance or factor* é uma glicoproteína secretada pelas células de Sertoli responsável pela regressão do ducto de Muller nos embriões do sexo masculino. Entretanto a função desse hormônio em adultos permanece desconhecida. No adulto, o AMH é secretado preferencialmente através dos túbulos seminíferos. Embora sua relação com a espermatogênese requiera investigação, AMH pode representar um marcador não invasivo de alteração da espermatogênese em azoospermia não obstrutiva podendo indicar biópsia testicular positiva. O testículo é uma fonte única de inibina B que é produzido diretamente pelas células de Sertoli e parece ser um bom marcador da espermatogênese. Vários trabalhos têm mostrado que a concentração de inibina B é diretamente relacionada com a espermatogênese e a concentração sérica de inibina B foi relacionada com o sucesso da biópsia testicular em homens com azoospermia não obstrutiva. Entretanto, nenhum parâmetro único pode proporcionar uma discriminação perfeita entre grupos com sucesso ou falência da extração testicular espermática (TESE). Este estudo objetivou investigar qual parâmetro pode prever o sucesso da recuperação testicular de espermatozóide.

Palavras-chaves: hormônio anti-mulleriano, inibina B, azoospermia não obstrutiva, espermatogênese, injeção intra-citoplasmática de espermatozóide.

Abstract

Recovery of testicular spermatozoa from azoospermic patients with testicular failure followed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a recent advance in the treatment of male infertility. Anti-mullerian hormone (AMH) also known as Mullerian inhibiting substance or factor, is a Sertoli cell-secreted glycoprotein responsible in male embryos for Mullerian duct regression. However, its role in adults remains unknown. In the adult, AMH is secreted preferentially towards the seminiferous lumen. Although its relationship with spermatogenesis requires further investigation, AMH may represent a non-invasive marker of persistent hypospermatogenesis in cases of non-obstructive azoospermia which may indicate the likely success of testicular spermatozoa recovery before intracytoplasmic

sperm injection. The testis is the only source of inhibin B that is a direct product of the Sertoli cells and appears to be a good marker of spermatogenesis. Several papers have shown that inhibin B concentration is directly related to spermatogenesis, and serum inhibin B concentration was related to the success or failure of testicular sperm recovery in men with nonobstructive azoospermia. However, no single parameter can provide a perfect discrimination between the groups with successful and failed testicular sperm extraction (TESE). This study aimed at investigating which parameter may predict successful testicular sperm recovery.

Key words: anti-mullerian hormone, inhibin B, non-obstructive azoospermia, spermatogenesis, intracytoplasmic sperm injection

INTRODUÇÃO

O hormônio anti-mulleriano (AMH), também conhecido como *mullerian-inhibiting substance* (MIS) é uma glicoproteína que pertence à superfamília dos fatores β de crescimento (Cate *et al.*, 1986). Esta molécula é principalmente expressada pelas células de Sertoli no testículo fetal, onde está envolvido na diferenciação do trato reprodutor dos mamíferos - a regressão do ducto de Muller nos embriões masculinos (Lee & Donahoe, 1993) e pelas células da granulosa dos folículos ovarianos (Vigier *et al.*, 1984). A concentração sanguínea do AMH diminui drasticamente durante a puberdade (Josso *et al.*, 1990) e persiste em valores muito baixo em adultos. Entretanto, este hormônio tem sido detectado na *rete testis* de animais (Vigier *et al.*, 1983; Josso *et al.*, 1979; Cazorla *et al.*, 1998) e no plasma seminal de homens férteis (Fallat *et al.*, 1996). A função do AMH é pouco conhecido mas parece estar relacionado com a proliferação das células de Leydig e na esteroidogênese (Racine *et al.*, 1998) e na proliferação de células germinativas (Cazorla *et al.*, 1998). Recente estudo demonstra a importância da concentração seminal do AMH como marcador da espermatogênese (Fenichel *et al.*, 1999).

A inibina B é produzida pelas células de Sertoli e parece ser um bom marcador da espermatogênese. Vários trabalhos têm mostrado que a concentração de inibina B está diretamente relacionada com a espermatogênese

(Bohring *et al.*, 1999; Foresta *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 2000; Pierik *et al.*, 1998; Von Eckardstein *et al.*, 1999) e sua concentração sérica está relacionada com o sucesso da recuperação espermática com a extração testicular de espermatozóide (TESE) em homens com azoospermia não obstrutiva (Ballesca *et al.*, 2000).

A biópsia testicular é, há mais de 50 anos, um procedimento diagnóstico para distinguir azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. A extração testicular de espermatozoides para a injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI) em oócitos é utilizado a algum tempo no tratamento de homens com azoospermia não obstrutiva (Silber *et al.*, 1996). Entretanto a biópsia testicular é procedimento invasivo e pode estar associado com complicações potenciais significativos (Beierdorffer & Schirren, 1979). A extração testicular é um processo laborioso com taxa de sucesso de 30-70% nos casos de azoospermia não obstrutiva (Tournaye *et al.*, 1997). A primeira gravidez utilizando a TESE em homens com azoospermia não obstrutiva foi relatada em 1995 na Bélgica (Devroey *et al.*, 1995).

Vários métodos têm sido utilizado para análise quantitativa e semi quantitativa da espermatogênese em oligozoospermico e azoospermico (Clermont, 1963; Steinberger *et al.*, 1973; Skakkebaek & Heller, 1973; Silber & Rodriguez-Rigau, 1981). Nenhum marcador definitivo tem sido identificado para prever o resultado da TESE em homens com azoospermia não obstrutiva (Mercan *et al.*, 2000).

INIBINA B

Guthauser *et al.*, 2002, relatou um caso de gravidez e parto em uma mulher cujo parceiro apresentava a concentração sérica de inibina B < 15 pg/mL. Em 2003, um grupo francês (Bailly *et al.*, 2003) avaliou 75 TESE de homens com azoospermia não obstrutiva, sendo 42 com a concentração sérica de inibina B < 15 pg/mL e 35 \geq 15 pg/mL e 81 com azoospermia obstrutiva. Foi observado que a concentração sérica de inibina B foi 6 vezes menor nos casos de azoospermia não obstrutiva em comparação a obstrutiva ($p < 0.05$), a recuperação de espermatozoides nos casos não obstrutivos foi menor no grupo de homens com inibina B < 15 pg/mL (21% vs. 52%) ($p = 0.01$), a concentração de inibina B foi significativamente menor em homens onde a TESE falhou ($p = 0.006$) e; apesar de não significativo ($p > 0.05$), a taxa de implantação por embrião transferido foi 2 vezes menor no grupo de azoospermicos com inibina B < 15 pg/mL em comparação com homens com azoospermia obstrutiva (7.4% vs. 16%).

Kumanov *et al.*, 2005, avaliou a concentração sérica de inibina B como marcador da espermatogênese em 75 homens com problemas de infertilidade, após exclusão das causas femininas, e 12 homens com fertilidade comprovada. Os homens inférteis apresentaram uma concentração de inibina B significativamente menor (116.4 vs. 181.2 pg/mL; $p = 0.008$) que os controles. Em geral, a concentração espermática relacionou positivamente com a inibina B ($r = 0.476$, $p < 0.0001$) e esta correlacionou com o volume testicular.

Brugo-Olmedo *et al.*, 2001, estudaram 78 pacientes com azoospermia não obstrutiva, 15 com azoospermia obstrutiva e 10 homens férteis. Demonstraram que o nível sérico de inibina B foi significativamente menor em azoosper-

micos não obstrutivo e que neste grupo, os homens que tiveram espermatozoides na TESE apresentaram maior nível sérico de inibina B que os que não obtiveram espermatozoides (89.31 vs. 19.23 pg/mL) ($p < 0.05$). O valor sérico de inibina B discriminatório entre o sucesso e a falha de obtenção de espermatozóide foi de 53 pg/mL (sensibilidade 91.11% e especificidade de 75.86%).

Em 2000, Ballescá *et al.* avaliaram 17 homens com azoospermia não obstrutiva, 22 com azoospermia obstrutiva e 29 homens com parâmetros espermáticos normais. Foi demonstrado que a concentração sérica de inibina B era significativamente menor ($p < 0.001$) no grupo azoospermico não obstrutivo em comparação aos outros dois grupos. A concentração sérica de inibina B mostrou-se significativamente maior ($p < 0.001$) entre os homens com êxito na TESE quando comparado com os que obtiveram falha na TESE. De acordo com *receiver operating characteristics curve* (ROC) a melhor concentração discriminatória de inibina B entre sucesso e falha foi > 40 pg/mL (sensibilidade 90%, especificidade 100%).

Neste mesmo ano, Bohring *et al.* relacionaram a concentração sérica de FSH e inibina B com a histologia testicular observando que em homens com a *sertoli cell-only syndrome*, a maior concentração de inibina B foi de 58 pg/mL enquanto que a menor concentração de inibina B em homens considerados normais na histologia foi de 79 pg/mL. Houve diferença significativa da concentração sérica de inibina B entre os grupos estudados ($p < 0.05$). Com respeito ao sucesso da TESE, a sensibilidade e a especificidade da inibina B foi de 52.5% e 60% respectivamente.

Sathanandan *et al.*, 2005, constataram que a concentração sérica de inibina B em homens com azoospermia obstrutiva foi significativamente maior (17x) ($p < 0.001$) que em homens com azoospermia não obstrutiva e foi similar com os homens férteis.

Em contrapartida, Vernaev *et al.*, 2002 mostraram que a concentração sérica de inibina B como a combinação da concentração sérica de inibina B com a de FSH não predizem a presença de espermatozóide na TESE em homens com azoospermia não obstrutiva. Dos 185 pacientes com azoospermia não obstrutiva, a recuperação espermática ocorreu em 92 (49.7%), apresentando uma concentração média sérica de inibina B de 37.3 pg/mL e em 93 (50.3%) não se encontrou espermatozoides, apresentando uma concentração média de 44.9 pg/mL. A discriminação entre o sucesso e a falha de recuperação dos espermatozoides foi analisada utilizando a ROC, apresentando a melhor concentração discriminatória de inibina B de 13.7pg/mL (sensibilidade 44.6%, especificidade 63.4%) com ROC de 0.51.

HORMÔNIO ANTI-MULLERIANO

Fallat *et al.*, 1996, constataram que a concentração de AMH no plasma seminal de doadores férteis era maior que nos homens com parâmetros espermáticos anormais ($p < 0.0003$). Além disso, os autores observaram que quanto maior a motilidade espermática, maior a concentração seminal de AMH.

Em 1999, Fénichel *et al.* avaliaram a concentração seminal de AMH em 50 homens divididos em 3 grupos: grupo 1 com 18 homens doadores férteis; grupo 2 com 9 azoos-

pérmicos com obstrução e grupo 3 com 23 azoospermicos sem obstrução. AMH estava presente no plasma seminal na maioria dos doadores (média 153 pmol/L) e em concentração maior que no plasma sanguíneo (média 10.7 pmol/L). A concentração seminal de AMH foi indetectável em todos os homens com azoospermia obstrutiva. Em relação às não obstrutivas, a concentração seminal de AMH foi menor (média 17pmol/L) que os doadores férteis ($p < 0.003$). A concentração seminal de AMH em homens com azoospermia não obstrutiva foi significativamente maior em pacientes com espermatozoides na biópsia testicular que ausência deles ($p < 0.003$).

Fujisawa *et al.*, 2002, estudaram 39 homens oligozoospermico e 10 voluntários com espermograma normal. Encontraram uma concentração seminal de AMH em homens oligozoospermicos significativamente menor (149.3 ± 254.0 pmol/L) em relação aos controles normais (249.0 ± 167.7 pmol/L) ($p = 0.03$). A concentração seminal de AMH correlacionou positivamente com a concentração espermática ($r = 0.339$, $p = 0.035$) e negativamente com a concentração sérica de LH ($r = -0.365$, $p = 0.024$)

Sathanandan *et al.*, 2005, demonstraram que a concentração sérica de AMH em homens com azoospermia não obstrutiva foi 50% menor que em homens férteis (4 ± 2.4 ng/ml vs. 9.3 ± 5.2 ng/ml, respectivamente) ($p = 0.003$). O nível de AMH em homens com azoospermia obstrutiva (6.4 ± 4.6 ng/ml) não foi significativamente alterado em relação ao grupo de homens férteis e com azoospermia não obstrutiva.

Em um estudo recente de 2007, Duvilla *et al.* estudaram 47 normospermico, 28 oligospermico e 67 com azoospermia, sendo 18 obstrutiva e 49 não obstrutiva. Tanto a concentração seminal de inibina B quanto a AMH diferiram significativamente entre os normo (± 522.66 ng/L ; ± 135.15 pmol/L, respectivamente), oligo (± 386.89 ng/L ; ± 93.33 pmol/L, respectivamente) e azoospermicos (± 72.65 ng/L ; ± 31.94 pmol/L, respectivamente) ($p < 0.001$). Mas não houve diferença significativa de inibina B e AMH entre os azoospermicos com obstrução ou sem obstrução ($p > 0.05$). Ambos os marcadores seminais foram correlacionados (AMH e inibina B). A concentração sérica de inibina B diferiu significativamente entre os homens com azoospermia não obstrutiva com biópsia testicular positiva (espermatozoide presente) e com biópsia negativa (ausência de espermatozoide) ($p = 0.0129$). Esta significância estatística não foi observado em relação à concentração seminal de inibina B ($p = 0.91$) e de AMH ($p = 0.94$).

Muttukrishna *et al.*, também em 2007, observaram que a concentração sérica de AMH foi significativamente menor em homens com azoospermia não obstrutiva (mediana 6 ng/ml) comparado com o controle (mediana 7.3 ng/ml; $p = 0.01$) e com os homens com azoospermia obstrutiva (mediana 6.4 ng/ml; $p < 0.05$). O nível sérico de inibina B foi 10x maior no grupo controle (mediana 154 pg/mL) comparada com os azoospermicos sem obstrução (mediana 10 pg/mL; $p < 0.001$). Os homens com azoospermia obstrutiva tiveram uma concentração sérica de inibina B significativamente maior (mediana 124 pg/mL) em comparação aos sem obstrução ($p < 0.01$) e similar ao controle. Houve uma significativa correlação positiva entre o AMH e inibina B ($r = 0.43$, $p < 0.001$).

DISCUSSÃO

A ICSI com espermatozoides recuperados na biópsia testicular representa uma modalidade terapêutica para homens com azoospermia. Porém a biópsia testicular é invasiva e acarreta conseqüências financeiras e emocional ao casal infértil que não devem ser esquecidas, além dos efeitos colaterais desse procedimento médico.

Entre os pacientes com desordens na espermatogênese, pacientes com azoospermia obstrutiva e não obstrutiva são rotineiramente identificados através da concentração de FSH (Martin-Du-Pan & Bishop, 1995). Entretanto o nível elevado de FSH nem sempre confirma a ausência de espermatozoides (Chen *et al.*, 1996; Novero *et al.*, 1997; Ezeh *et al.*, 1998) nos testículos, sendo confirmado através da biópsia testicular.

Muito marcadores têm sido propostos como a transferrina (Barthelemy *et al.*, 1988), lactato de desidrogenase (Orlando *et al.*, 1988), fator de crescimento insulina like (IGF) e alfa 2 macroglobulina (Glander *et al.*, 1996) e a histologia (Tournaye *et al.*, 1996). Entretanto, nenhum deles apareceu ser um marcador testicular conveniente para o diagnóstico e prognóstico.

A concentração de inibina B, plasmática ou seminal, parece ser um marcador sensível da espermatogênese, uma vez que é produzida diretamente e exclusivamente nos testículos e não é influenciado pela regulação hipotalâmica como o caso do FSH. Vários autores reportaram que em homens castrados ou com síndrome de Klinefelter apresentam inibina B indetectável, confirmando o fato que o nível sérico de inibina B reflete a função testicular e mais precisamente a função da célula de Sertoli (Anawalt *et al.*, 1996).

O AMH pode representar um marcador não invasivo da espermatogênese. A infertilidade masculina com falência testicular ainda é pobremente compreendida. A azoospermia pode ser obstrutiva ou não obstrutiva. Em muitos casos, a ausência completa ou parcial de espermatozoide está associada com redução do volume testicular e elevado FSH sérico.

Alta concentração de AMH de origem testicular é detectável no fluido seminal de homens férteis, sugerindo que alta concentração de AMH também está presente no fluido dos túbulos seminíferos. Comparando a concentração sanguínea e seminal de AMH, pode-se pensar que depois da puberdade o AMH é preferencialmente secretado pelo polo apical das células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos, graças à barreira testicular, funcional depois da puberdade. Logo, a diminuição da concentração de AMH, seja seminal ou plasmática, pode refletir uma alteração primária na função das células de Sertoli, acarretando desordens na espermatogênese. Maymon *et al.*, 2002, sugerem a análise combinada do nível do AMH no fluido seminal com a análise imunohistoquímica da expressão do AMH nas biópsias testiculares.

O nível sérico de AMH pode ser um parâmetro somatório para discriminar os azoospermicos em obstrutivos ou não. Apresentando de uma forma geral na literatura científica uma correlação negativa com o nível sérico de FSH e uma correlação positiva com inibina B, conclui-se indiretamente que o AMH é produzido pelas células de Sertoli.

Classicamente utiliza-se a dosagem sérica de FSH para identificar os homens com azoospermia com obstrução ou

não e confirma-se a presença de espermatozoides através da biópsia testicular. Os trabalhos demonstram que o AMH e a inibina B, ao nível sérico ou seminal, agregam informações importantes na conduta médica nos casos de alteração espermática, sendo bons marcadores de azoospermia não obstrutiva e alteração da espermatogênese. Trabalhos reportam que a recuperação de espermatozói-de pela biópsia testicular pode ser possível em > 50% dos casos de homens com azoospermia não obstrutiva sugerido pelos parâmetros clínicos como o tamanho dos testículos e a concentração plasmática de FSH (Tournaye *et al.*, 1997), podendo então, ser complementado a esses parâmetros outros marcadores preditivos. Logo, os marcadores AMH e inibina B devem ser ferramentas adicionais na avaliação do processo da espermatogênese e prováveis parâmetros preditivos de biópsias testiculares positivas. Assim, aconselhamentos mais objetivos utilizando esses marcadores podem oferecer expectativas mais realistas. Estudos prospectivos, com biópsia testicular são necessários para confirmar o valor preditivo do AMH e inibina B em discriminar os azoospermicos obstrutivos e sem obstrução e averiguar se o AMH pode ser um parâmetro específico em identificar pacientes com biópsia testicular positiva ou negativa e alteração na espermatogênese.

Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*1996; 81: 3341-45.

Bailly M, Guthauser B, Bergere M., Wainer R., Lombroso R., Ville Y., Selva J. Effects of low concentrations of inhibin B on the outcomes of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*2003;79: 905-8.

Ballescá JL, Balasch J, Calafell JM, Alvarez R, Fábregues F, de Osaba MJ., Ascaso C, Vanrell JA. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.*2000; 15: 1734-38.

Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, Lecomte P, Bardos P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J. Reprod. Fertil.*1988; 82: 113-18.

Beierdörffer H, Schirren C. Peculiarities and side effects of testicular biopsy *Andrologia.*1979;11: 311-19.

Bohring C, Krause W. Serum level of inhibin B in men with different causes of spermatogenic failure. *Andrologia.*1999; 31: 137-41.

Bohring C, Schroeder-Printzen I, Weidner W, Krause W. Serum levels of inhibin B and follicle-stimulating hormone may predict successful sperm retrieval in men with azoospermia who are undergoing testicular sperm extraction. *Fertil. Steril.*2002; 78: 1195-8.

Brugo-Olmedo S, De Vincentis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*2001;76: 1124-9.

Cazorla O, Seck M, Pisselet C, Perreau C, Saumande J, Fontaine J, de Reviens M, Hochereau-de Reviens MT. Anti-Müllerian hormone (AMH) secretion in prepubertal and adult rams. *J. Reprod. Fertil.*1998; 112: 259-66.

Cate RL, Mattaliano RJ., Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, et al. Isolation of the

bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell.*1986; 45: 685-98.

Chen CS., Chu SH., Lai YM., Wang ML., Chan PR. Reconsideration of testicular biopsy and follicle-stimulating hormone measurement in the era of intracytoplasmic sperm injection for non-obstructive azoospermia? *Hum. Reprod.*1996;11: 2176-9.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J. Anat.*1963; 112: 35-51.

Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, Van Steirteghem A, Silber S. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*1995; 10: 1457-60.

Duvilla E, Lejeune H, Trombert-Paviot B, Gentil-Perret A, Tostain J, Levy R. Significance of inhibin B and anti-Müllerian hormone in seminal plasma: a preliminary study. *Fertil. Steril.*2007; Aug 4.

Ezeh UI, Moore HD., Cooke ID. Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum. Reprod.*1998; 13: 3066-74.

Fallat ME., Siow Y, Belker AM, Boyd JK, Yoffe S, MacLaughlin DT. The presence of müllerian inhibiting substance in human seminal plasma. *Hum. Reprod.*1996; 11: 2165-9.

Fénichel P, Rey R, Poggioli S, Donzeau M, Chevallier D, Pointis G. Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*1999; 14: 2020-24.

Foresta C, Galeazzi C, Bettella A, Marin P, Rossato M, Garolla A, Ferlin A. Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *J. Clin Endocrinol Metab.*1999;10: 3807-10.

Fujisawa M, Yamasaki T, Okada H., Kamidono S. The significant of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Hum Reprod.* 2002;17: 968 –70.

Glander HJ., Kratzsch J, Weisbrich C, Birkenmeier G. Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Hum Reprod.*1996; 11: 2454-60.

Guthauser B, Bailly M, Bergere M, Wainer R, Ville Y, Selva J. Successful pregnancy and delivery after testicular sperm extraction despite an undetectable concentration of serum inhibin B in a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil. Steril.*2002; 77: 1077-8.

Jensen TK., Andersson AM., Hjollund NH., Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, et al. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle stimulating hormone levels. A study of 349 Danish men. *J Clin Endocrinol Metab.*1997;82: 4059 –63.

Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *JClin Endocrinol Metab.*1990;70 : 23-7.

Kolb BA., Stanczyk FZ., Sokol RZ. Serum inhibin B level in males with gonadal dysfunction. *Fertil. Steril.*2000; 74: 234-8.

Kumanov P, Nandipati KC., Tomova A, Robeva R, Agarwal A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed. Online.*2005, 10: 786-812.

Lee MM., Donahoe PK., Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D, MacLaughlin DT. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin. Endocrinol Metab.*1996; 81: 571-6.

Martin-du-Pan RC, Bischof P. Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium? *Hum. Reprod.*1995; 10: 1940-5.

- Maymon BB, Yogev L, Paz G, Kleiman SE, Schreiber L, Botchan A, Hauser R, Yavetz H. Sertoli cell maturation in men with azoospermia of different etiologies. *Fertil. Steril.*2002; 77: 904-9.
- Mercan R, Urman B, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A, Isiklar A, Balaban B. Outcome of testicular sperm retrieval procedures in non-obstructive azoospermia: percutaneous aspiration versus open biopsy. *Hum. Reprod.*2000; 15: 1548-51.
- Muttukrishna S, Yusoff H, Naidu M., Barua J, Arambage K, Suharjono H., Sathanandan M. Serum anti-Müllerian hormone and inhibin B in disorders of spermatogenesis. *Fertil. Steril.*2007; 88: 516-18.
- Novero V, Camus M, Tournaye H, Smits J, Verheyen G, Joris H, Derde MP, Van Steirteghem AC., Devroey P. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*1997; 12: 59-63.
- Orlando C, Casano R, Caldini AL, Forti G, Barni T, Bonfanti L, Serio M. Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *J. Androl.*1988; 9:220-23.
- Pierik FH., Vreeburg JT., Stijnen T, De Jong FH, Weber RF. Serum inhibin B as a marker of spermatogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*1998; 83: 3110-14.
- Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I, Jossen N, di Clemente N. Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 594-9.
- Sathanandan M., Youfes H, Muttukrishna S. Anti Müllerian Hormone and Inhibin B: Discriminatory Markers of Azoospermia? *Fertil. Steril.*2005; 84 page S76, 2005.
- Silber SJ., Rodriguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. *Fertil. Steril.*1981;36: 480-5.
- Silber SJ, van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Tournaye H, Devroey P. - Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.*1996;66: 110-7, 1996.
- Skakkebaek NE., Heller CG. Quantification of human seminiferous epithelium. I. Histological studies in twenty-one fertile men with normal chromosome complements. *J. Reprod. Fertil.*1973;32: 379-89.
- Steinberger E, Root A, Ficher M, Smith KD. The role of androgens in the initiation of spermatogenesis in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*1973; 37: 746-51.
- Tournaye H., Liu J., Nagy P.Z., Camus M., Goossens A., Silber S., Van Steirteghem A.C., Devroey P. - Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 11: 127-132, 1996.
- Tournaye H., Staessen C, Camus M, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. No evidence for a decreased fertilizing potential after in-vitro fertilization using spermatozoa from polyzoospermic men. *Hum. Reprod.*1997; 12: 2183-5.
- Tournaye H, Verheyen G, Nagy P, Ubaldi F, Goossens A, Silber S, Van Steirteghem AC, Devroey P. Are there any predictive factors for successful testicular sperm recovery in azoospermic patients? *Hum. Reprod.*1997; 12: 80-6.
- Vernaev V, Tournaye H, Schiettecatte J, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. Serum inhibin B cannot predict testicular sperm retrieval in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* 2002; 17: 971-6.
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai D., Jossen N. -Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology.*1984; 114: 1315-20.
- von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*199; 84: 2496-501.

Correspondência: Rogéria Teixeira |Coelho
Rua Monsenhor Magaldi 415/ 104 Rio de Janeiro, RJ
Email: rogeriacoeelho@profertil.com.br

Gravidez com a técnica de Vitriificação de embriões pelo método Cryotop® em Programa de Ovodoação.

Pregnancy obtained with embryo Vitrification by Cryotop method in a Oocyte Donation Program.

Autores: Bruno Brum Scheffer, Rafaela Brum Scheffer, Juliano Brum Scheffer

Instituição: Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida – IBRRA
Belo Horizonte / Minas Gerais

Resumo

Por várias razões, mulheres, especialmente em países desenvolvidos, desejam torna-se grávidas em idade avançada. Desde a primeira gravidez obtida em humano com oócito congelado, o método de congelamento lento tem sido aplicado com sucessos variados. Recentes avanços na criopreservação de oócitos e embriões têm sido relatados com a utilização da vitriificação, originalmente aplicada na embriologia por Rall & Fahy, 1985 com embriões de rato. A variedade desta técnica pode ser encontrada na literatura e tem sido aplicada com variados graus de sucesso em mamíferos, incluindo os humanos. A última técnica com mínimo volume de vitriificação é o Cryotop® que foi desenvolvido por M. Kuwayama. Neste relato de caso, aplicamos o método Cryotop para vitriificação em nosso programa de doação de oócitos, avaliando o desenvolvimento dos embriões vitriificados, com gestação em curso.

Palavras-chave: Criopreservação de embriões, vitriificação, desenvolvimento dos embriões.

Abstract

For many reasons women, specially in developed countries, wish to delay the age at which they become pregnant. Since the very first pregnancy was achieved in humans from previously frozen oocytes, the slow cooling method has been applied with varying success. Recent advances in oocyte and embryo cryopreservation have been reported by use of vitrification, which was originally applied in embryology by Rall & Fahy, 1985 to mouse embryos. Several methods have been devised in which very small volumes of sample to be vitrified are used. A variety of these techniques can be found in the literature and have been applied with varying degrees of success in several species of mammals, including humans. The latest approach to minimum volume vitrification is the Cryotop® device that was designed by M. Kuwayama. In our current study, we have applied the Cryotop method for vitrification from a oocyte-donation donation program, assessing development of vitrified embryos. There is one on-going pregnancy.

Keywords: Embryo cryopreservation, vitrification, embryo development

INTRODUÇÃO

Por muitas razões, as mulheres estão postergando a gravidez para uma idade avançada. Infelizmente, quando procuram assistência médica, a reserva ovariana já está prejudicada, necessitando de tratamentos médicos de maior complexidade, como o caso da doação de óvulos.

Com os avanços científicos, novas técnicas em Reprodução Assistida estão melhorando o prognóstico das pacientes. Dentre esses avanços, está a técnica de congelamento rápido denominada de Vitriificação. Trabalhos recentes demonstram resultados promissores e concretos da sobrevida e qualidade dos pré-embriões e gametas após o congelamento rápido e descongelamento (Kuwayama *et al.*, 2005, Ruvalcaba *et al.*, 2005, Antinori *et al.*, 2007, Katayama *et al.*, 2003).

Até o presente, a melhor metodologia de criopreservar oócitos e pré-embriões humanos ainda permanece em discussão (Martino *et al.*, 1996, Liebermann *et al.*, 2002, Lane & Gardner, 2001, Matsumoto *et al.*, 2001 Papis *et al.*, 2000, Vajta *et al.*, 1998). Alguns serviços já utilizam esta técnica em seus laboratórios com sucesso significativo.

A equipe do Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida –IBRRA- relata caso de doação de gametas com vitriificação embrionária pelo método Cryotop®, seguida de gravidez em evolução na receptora, portadora de falência ovariana.

DESCRIÇÃO DO CASO

Programa de doação de gameta e estimulação ovariana controlada

O Programa de doação de gameta segue as normativas da Resolução CFM Nº 1.358 e da RDC Nº 33. A doação teve caráter altruísta, não lucrativa, não comercial e anônima. A doadora apresentava semelhança fenotípica e imunológica com a receptora, tendo assinado termo de consentimento livre e esclarecido sobre o programa de doação de gametas. Ela foi avaliada através de exames clínicos e laboratoriais, incluindo os testes para as doenças infecto-contagiosas, que foram repetidos após 6 meses da data

da coleta dos oócitos, avaliação de doenças genéticas familiares ou próprias, descartando história de doenças cromossômicas e hereditárias. A doadora era fértil, 26 anos, não tabagista, não etilista, ciclos menstruais regulares com intervalos de 28 dias, ambos ovários presentes e desprovidos de anormalidade morfológica, sem patologias endócrinas, índice de massa corporal 22 Kg/m², sem endometriose, cariótipo normal. A avaliação da reserva ovariana no 3º dia do ciclo menstrual demonstrou FSH 3,4mUI/mL LH 4,5mUI/mL, E2 36pg/mL, AMH 3,4ng/mL, número de folículos antrais (AFC) em ambos ovários de 16 pelo ultra-sonografia transvaginal (USTV).

No ciclo menstrual anterior à estimulação ovariana, utilizou contraceptivo oral (ACO) Gestodeno + Etinilestradiol (Allestra® /Aché) e no 21º dia do ciclo menstrual, iniciou 20 unidades/dia de agonista de GnRH (Acetato de Leuprolida - Lupron® SC - 2,8ml / Abbott) até o 1º dia da menstruação. Após a confirmação da dessensibilização pituitária (E2<30pg/mL e ausência de folículos de tamanho superior a 6mm, espessura endometrial<5mm), a paciente reduziu para a metade a dose do agonista de GnRH e iniciou a estimulação com FSH recombinante (Gonal F® SC / Merck Serono) na dose de 225UI/dia + hMG altamente purificado (Menopur® SC //Ferring) na dose de 75UI/dia nos 3 primeiros dias. A dose foi então ajustada de acordo com a dosagem hormonal de E2 e USTV, revista em intervalos de 2 dias. A duração do estímulo ovariano foi de 7 dias e a administração do hCG recombinante (Ovidrel® SC /Merck Serono) ocorreu quando de >5 folículos acima de 16mm de diâmetro, E2= 2200pg/mL, P4<1,4ng/mL, LH< 5 mUI/mL. A punção ovariana ocorreu 36 horas após o Ovidrel guiada por USTV. Foram coletados 12 oócitos, sendo 9 metáfase II. A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) foi, então, realizada e 7 pré-embriões tipo A e B sofreram o processo de congelamento rápido - vitrificação para utilização posterior.

PREPARO ENDOMETRIAL DA RECEPTORA E TRANSFERÊNCIA PRÉ-EMBRIONÁRIA

A receptora recebeu e assinou termo de consentimento livre e esclarecido para a recepção de gametas. Ela apresentava 47 anos de idade, ciclos irregulares e infertilidade secundária, com passado de aborto espontânea e curetagem uterina. Foi avaliada através de exames clínicos e laboratoriais, sendo as dosagens hormonais de 3º dia do ciclo de FSH 10,9mUI/mL, E2 21pg/mL, AMH 0,26ng/mL e Inibina B=15pg/mL. Na avaliação ultra-sonográfica e histeroscópica, não haviam alterações uterina e ovariana. A paciente iniciou ACO- Ciproterona + Etinilestradiol (Diane 35® /Schering) no mês anterior à preparação endometrial e no 21º dia do ciclo menstrual, aplicou 1 ampola de agonista de GnRH (Triptorelina IM - NeoDecapeptyl® 3,75mg /Aché). No 1º dia da menstruação o repouso ovariano foi confirmado através do USTV, com dosagem de E2<30pg/mL e ausência de folículos de tamanho superior a 6mm e espessura endometrial<5mm.

A preparação endometrial foi realizada através de estrogênios transdérmicos (Estradott®, estradiol 100,0 mcg / Novartis) iniciando com um adesivo a cada 2 dias e aumentando a dose de acordo com a linha endometrial e as dosagem hormonal realizada em intervalos de 3-4

dias.. Ao mesmo tempo, utilizou ácido acetil-salicílico VO (AAS®, 100mg / Sanofi-Synthelabo) diário até o teste de gravidez. Quando a linha endometrial apresentava aspecto trilaminar e espessura>7mm e E2>1000pg/mL, foi iniciada a suplementação com progesterona micronizada 800mg/dia intravaginal (Utrogestan® 200mg / FQM) e após 2 dias, realizado o descongelamento dos pré-embriões.

A transferência pré-embriônica de 3 pré-embriões Tipo A e B foi realizada através do cateter Wallace (18mm). A paciente manteve os adesivos transdérmicos de estrogênios (300mcg a cada 48h), a progesterona micronizada intravaginal (800mg/dia), o ácido acetilsalicílico oral (100mg/dia) e iniciou a utilização de nifedipina (Adalat Retard® - Bayer 30mg/dia) até o teste de gravidez, 12 dias após a transferência.

Em 15 dias o USTV realizado evidenciou saco gestacional único e com batimentos cardiofetais presentes. No momento a paciente se encontra no quinto mês de gravidez, pré-natal sem intercorrências, desenvolvimento fetal normal.

LABORATÓRIO DE FECUNDAÇÃO *IN-VITRO* (ICSI)

Todos os oócitos coletados foram doados à mesma receptora. Após a punção oocitária, os oócitos foram mantidos no meio "*human tubal fluid*" (HTF / Irvine) suplementado a 10% de albumina (Irvine) por 4 horas. Em seguida, foram desnudados para avaliar o grau de maturidade. Dos 12 oócitos coletados, 9 eram metáfase II sendo realizada a ICSI. Ocorreu fecundação em 7 dos 9 oócitos e com bom desenvolvimento em dia 2, embriões foram criopreservados pelo método *Cryotop*.

Os pré-embriões foram equilibrados em 7.5% (v/v) *ethylene glycol* (EG) + 7.5% *dimethylsulfoxide* (DMSO) em TCM199 *medium* +20% *synthetic serum substitute* (SSS), referido como "solução ES" à temperatura ambiente por 10 minutos. Após este tempo, foram então colocados na "*vitrification solution-VS*" parecida com a solução ES exceto pela concentração de 15% EG + 15% DMSO + 0.5 M *sucrose*. Depois de um minuto nesta solução, os pré-embriões foram colocados no *Cryotop strip* (Kuwayama *et al.*, 2005) e imediatamente submersos em nitrogênio líquido (Air Líquido). Após período de congelamento de 6 meses, foi programada a desvitrificação. Os *Cryotops* foram retirados um a um do nitrogênio líquido e instantaneamente colocados em 1.0M *sucrose* em TCM199+20%SSS a 37° C. Depois de um minuto os pré-embriões foram colocados em 0.5M *sucrose* em TCM199+20%SSS a temperatura ambiente por 3 minutos. Finalmente, duas lavagem de 5 minutos foram feitas com TCM199+20%SSS à temperatura ambiente antes de incubar os pré-embriões em HTF (Irvine) suplementado a 10% de albumina (Irvine). Todo o material e soluções necessários para a vitrificação e desvitrificação foram obtidos de Kitazato (Tóquio, Japão).

Após o descongelamento, todos os 7 pré-embriões sobreviveram e foram mantidos em cultura por 2 horas, reavaliada sua classificação e então, após a assinatura do consentimento livre e esclarecido do número de pré-embriões a transferir, foi realizada a transferência pré-embriônica de um pré-embrião do tipo A e dois do tipo B.

A qualidade pré-embriônica foi avaliada nos estágios precoces (clivagem precoce) e dia 2. O tipo A apresentava de 2 a 5 células e <10% de fragmentação tipo I e ausência de multinucleação. O tipo B corresponde a embrião de 2 a 5 células, entre 10 a 15% de fragmentação tipo I-II e ausência de multinucleação. Considerado fragmentação tipo I quando tinha volume mínimo e tipicamente associado a somente um blastômero; fragmentação tipo II localizado e ocupava predominantemente o espaço perivitelino.

DISCUSSÃO

O método de congelamento rápido, vitrificação, apresenta algumas vantagens, principalmente evitando a formação de gelo e a injúria celular ocorrido no congelamento lento entre +15 a -5 graus Celsius (Watson & Morris, 1987). Esses eventos lesam essencialmente o citoesqueleto e as membranas celulares (Pickering *et al.*, 1990, Ghetler *et al.*, 2005), evitadas pelo congelamento rápido.

Em contrapartida, na vitrificação utiliza-se alta concentração de crioprotetores que são tóxicos para as células. Buscando minimizar esta toxicidade, várias combinações de alguns agentes durante o processo de vitrificação são estudadas e pesquisadas, especificamente o EG, DMSO e a *sucrose*. Por este motivo, a metodologia ideal de vitrificação ainda está em discussão (Arav, 1992, Yoon *et al.*, 2000).

O método descrito por Kuwayama *et al.*, 2005 utiliza um pequeno volume de solução para o congelamento rápido, evitando a injúria celular. Apresenta uma redução de 30% na concentração de crioprotetores, atenuando a toxicidade celular.

Trabalhos recentes (Ruvalcaba *et al.*, 2005, Lucena *et al.*, 2006, Katayama *et al.*, 2003, Antinori *et al.*, 2007) reportam taxa de sobrevivência de óocitos variando de 89 a 99%, taxa de clivagem entre 89 a 91%, taxa de blastocisto por volta de 50% e taxa de gravidez variando entre 32,5 a 45% pelo método *Cryotop*.

Neste caso clínico, pode-se observar uma taxa de sobrevivência pré-embriônica elevada e uma ausência ou discreta queda na qualidade pré-embriônica em alguns pré-embriões.

Nossas observações clínicas e laboratoriais exemplificadas neste caso clínico demonstram que o método *Cryotop*® descrito por Kuwayama *et al.* foi eficiente e viável para pré-embriões.

Referências

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:72-9.

Arav A. Vitrification of oocyte and embryos. England: Portland

Press; 1992. p.255-64.

Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod*. 2005;20:3385-9

Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Kato O, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril*. 2003;80:223-4.

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

Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev*. 2001;58:342-7.

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

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

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 1996;54:1059-69.

Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*. 2001;42:139-44.

Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 2000;54:651-8.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 1990;54:102-8.

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

Ruvalcaba L, Marinez R, Cuneo S, Chanona J, Beltran M, Bermudez A. Improving donor programs with an oocyte bank using vitrification. *Fertil Steril*. 2005;84:S70.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51:53-8.

Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*. 2000;74:180-1.

Watson PF, Morris GJ. Cold shock injury in animal cells. *Symp Soc Exp Biol*. 1987;41:311-40.

Correspondência: Juliano Brum Scheffer, Instituto Brasileiro de Reprodução Assistida-IBRRA, Rua Desembargador Jorge Fontana 408 10º andar, Belvedere, CEP: 30320-670, telefax: 55 31 32868171, Belo Horizonte, Minas Gerais. Email: juliano.scheffer@ibrara.com.br

AGENDA DE EVENTOS PARA 2008

SETEMBRO

7/09 a 10/09 - VII Congresso Brasileiro da SBDST/ III Congresso Brasileiro de AIDS. Local: Centro de Convenções de Goiânia. <http://www.dst2008.com.br>

NOVEMBRO

08/11 a 12/11 - 64th Annual Meeting American Society for Reproductive Medicine. Local: San Francisco. www.asrm.org/Professionals/Meetings/annualmeeting.html