

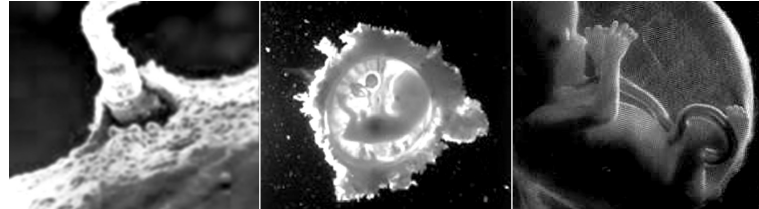
Dezembro 2005  
ISSN 1517-5693

EDIÇÃO ESPECIAL

JBRA

JORNAL BRASILEIRO DE  
**REPRODUÇÃO**  
ASSISTIDA

ÓRGÃO DA  
SOCIEDADE BRASILEIRA  
DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



# JBR JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

## CORPO EDITORIAL NACIONAL

### Editor

Maria do Carmo Borges de Souza \_ RJ

### Consultor Editorial

José Gonçalves Franco Júnior \_\_\_\_ SP

### Assistente Editorial

Christina de Albuquerque da Rocha RJ

Fernanda Freitas Oliveira Cardoso RJ

### Editores Associados

Edson Borges Junior \_\_\_\_\_ SP

João Batista Alcântara Oliveira \_\_\_\_ SP

Ricardo Baruffi \_\_\_\_\_ SP

Selmo Geber \_\_\_\_\_ MG

Weydson Barros Leal \_\_\_\_\_ PE

### Conselho Editorial

Adelino Amaral Silva \_\_\_\_\_ DF

Alessandro Schuffner \_\_\_\_\_ PR

Alvaro Petracco \_\_\_\_\_ RS

Ana Cristina Allemmand Mancebo \_\_ RJ

Ana Lúcia Mauri \_\_\_\_\_ SP

Aroldo Camargos \_\_\_\_\_ MG

Bela Zausner \_\_\_\_\_ BA

Bruno Scheffer \_\_\_\_\_ MG

Carlos André Henriques \_\_\_\_\_ RJ

Claudia G. Petersen \_\_\_\_\_ SP

Condesmar Marcondes Filho \_\_\_\_ SP

Dirceu Mendes Pereira \_\_\_\_\_ SP

Eduardo Pandolfi Passos \_\_\_\_\_ RS

Elvio Tognotti \_\_\_\_\_ SP

Humberto Ikuo Shibasaki \_\_\_\_\_ MT

João Pedro Junqueira Caetano \_\_ MG

Joaquim Roberto Lopes \_\_\_\_\_ DF

Jonathas Borges Soares \_\_\_\_\_ SP

Jorge Hallak \_\_\_\_\_ SP

Leila Montenegro Silveira Farah \_\_\_\_ SP

Lídio Jair Ribas Centa \_\_\_\_\_ PR

Luíz Fernando Dale \_\_\_\_\_ RJ

Marcos Sampaio \_\_\_\_\_ MG

Mariangela Badalotti \_\_\_\_\_ RS

Marilza Vieira Rudge \_\_\_\_\_ SP

Mario Cavagna \_\_\_\_\_ SP

Newton Eduardo Busso \_\_\_\_\_ SP

Paulo Franco Taitson \_\_\_\_\_ MG

Paulo Serafini \_\_\_\_\_ SP

Paulo Spinola \_\_\_\_\_ BA

Renzo Antonini Filho \_\_\_\_\_ MG

Ricardo Melo Marinho \_\_\_\_\_ MG

Roberta Wonchockier \_\_\_\_\_ SP

Roger Abdelmassih \_\_\_\_\_ SP

Sidney Glina \_\_\_\_\_ SP

Silvana Chedid \_\_\_\_\_ SP

## CORPO EDITORIAL INTERNACIONAL

Anne R. Greenlee \_\_\_\_\_ EUA

Claudia Borrero \_\_\_\_\_ Colômbia

Claudio Chillik \_\_\_\_\_ Argentina

Esther Pollak de Fried \_\_\_\_ Argentina

Francisco Riskey \_\_\_\_\_ Venezuela

Juan Manuel Montoya \_\_\_\_ Colombia

Karen Sermon \_\_\_\_\_ Bélgica

Iván Valencia Madera \_\_\_\_\_ Equador

Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida – EDIÇÃO ESPECIAL 2005

Jornalista Responsável: Heber Maia – MTb 31.660

Produção Editorial e Gráfica: AlamTec Tecnologia em Informação LTDA - Rua Almeida Torres, 59/59A - Aclimação - São Paulo-SP  
Tels.: (11) 3209-8802 / 3209-6431 / 3341-5383 / 3341-3403 - e-mail: alamtec@br.inter.net

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

## I – Informações Gerais

O Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA) é uma publicação oficial de comunicação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – [www.sbra.com.br](http://www.sbra.com.br)), com periodicidade **quadrimestral**, um deles com os trabalhos do Congresso Brasileiro da SBRA. Aceita trabalhos básicos e clínicos da área de Reprodução nas seguintes línguas: português, espanhol e inglês. As matérias para publicação devem ser inéditas, na forma de artigos originais, artigos de atualização, relatos de caso, opiniões.

Os textos devem vir acompanhados de carta assinada pelo autor principal, e serão encaminhados para avaliação **por membros** do Conselho Editorial, a ser designado pelo Editor. Após esta avaliação, os trabalhos são reencaminhados aos autores para possíveis correções, retornando ao avaliador para então serem aprovados ou não à publicação.

Os trabalhos devem ser enviados para:

Maria do Carmo Borges de Souza  
 Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida  
 Av. das Américas, 4666  
 Centro Médico BarraShopping salas 312/313  
 CEP 22649-900  
 Rio de Janeiro - RJ – Brasil  
 E-mail: [journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@cmb.com.br)  
 Fone: (21) 2430-9060 Fax: (21) 2430-9070  
 Home Page: <http://www.sbra.com.br>

## II – Apresentação dos Trabalhos

Os trabalhos devem ser enviados em disquete e por e-mail: [journalsbra@cmb.com.br](mailto:journalsbra@cmb.com.br), digitados em espaço simples, páginas separadas, numeradas, formatado em Word para Windows/98 com letra Times New Roman nº 12.

### Primeira Página

Título do artigo em português e inglês

Nome do(s) autor(es)

Afiliação dos autores

Nome do serviço onde foi executado o trabalho

Endereço, número do telefone, fax e internet do autor principal

Indicação de financiamentos relacionados ao trabalho

### Segunda Página

Abstracts (o resumo deve, **obrigatoriamente**, ser escrito na língua do texto e em **inglês**)

**Caso o artigo seja em inglês, fazer um resumo em português.**

Key words

### Terceira e demais páginas

Texto

Artigos originais devem obedecer a seqüência: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão ou Conclusão, Resumo com unitermos e Referências (até 12). Os artigos

originais que envolvem experimentação devem declarar aprovação prévia por Comitê de Ética.

Artigos de atualização ou de autores convidados (opiniões) poderão ter o número de referências até 12.

Relatos de caso devem obedecer a seqüência: Introdução, Descrição do caso, Discussão ou Conclusão, Resumo com unitermos e Referências: 5, no máximo.

Cartas ao leitor - o envio de cartas ao editor comentado, discutindo ou criticando os **artigos** publicados no JBRA serão bem recebidas e publicados desde que aceitas pelo Conselho Editorial. Recomenda-se tamanho máximo de uma página, incluindo referências bibliográficas. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada junto com a carta.

**Leitura recomendada aos autores - \* BIREME - [www.bireme.br](http://www.bireme.br)**

## III – Referências

As referências devem estar em ordem alfabética, com base no último sobrenome do autor principal seguido das iniciais. As citações serão identificadas no texto pelo sobrenome do autor e data (Stephoe, 1978), não mais que dois autores podem ser citados por referência (Edwards & Steptoe, 1980), no caso de mais de dois autores, usar et al. (Van Steirteghem et al., 1988).

### 1. Artigos em periódicos

Edwards R. G., Steptoe P. C., Purdy J. M. – Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown “in vitro”. Br. J. Obstet. Gynaecol., 87: 737-756, 1980.

### 2. Capítulos de Livros

Simpson J. L. – Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet H. L. and Porter I. H. Genetic Mechanisms of Sexual Development. New York: Academic Press, p.365, 1979.

### 3. Livros

Wolf D. P., Quigley M. M. (eds) – Human “in vitro” fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press, 1984.

OBS: Não fazer citações das referências através de números. Exemplo: Na pesquisa o fator imunológico (!).

## IV – Ilustrações

As tabelas, gráficos, figuras e fotografias devem ser enviadas em folhas separadas, numeradas em algarismos romanos e com legendas individualizadas, ao final do trabalho.

As fotografias devem ser em preto e branco, sendo que as despesas com eventual reprodução de fotografias coloridas devem ser discutidas. Poderão também ser enviadas via internet.

## DIRETORIA DA SBRA - 2005/2006

**Presidente:** Maria do Carmo Borges de Souza

**1º Vice-Presidente:** Eduardo P. Passos

**2º Vice-Presidente:** Ricardo Baruffi

**1º Secretário:** João Batista Alcantara Oliveira

**2ª Secretária:** Madalena Caldas

**1º Tesoureiro:** Assumpto Iaconelli Júnior

**2º Tesoureiro:** Luiz Fernando Dale

### Departamento de Publicações

**Editora:** Maria do Carmo Borges de Souza

**1ª Secretária:** Christina de Albuquerque da Rocha

**2ª Secretária:** Fernanda Freitas de Oliveira Cardoso

### Comissão de Atividades Internacionais

Marcos Sampaio

### Departamento Científico

Adelino Amaral Silva

Newton Eduardo Busso

### Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa

Bella Zauner

Lídio Jair Ribas Centa

Dirceu Henrique M. Pereira

### Comissão de Educação Continuada

Antonio Helio Oliani

Aroldo Camargos

Roberta Wonchockier

### Conselho Fiscal

Joaquim Roberto C. Lopes

Condesmar Marcondes Filho

Fabio Macedo

Luiz Eduardo Viana Diniz

### Comissão de Cadastro e Avaliação

Edson Borges

Jonathas Borges

### Conselho Consultivo

Selmo Geber

Alvaro Petracco

Edson Borges

José Gonçalves Franco Júnior

Paulo Serafini

Roger Abdelmassih

### Comissão de Comunicação

Lister de Lima Salgueiro

Lia Ferragut

Paulo Taitson

**EDITORIAL****Final de ano, tempo de "balanço"**

Maria do Carmo Borges de Souza; Christina de Albuquerque da Rocha;  
Fernanda Freitas Oliveira Cardoso\_\_\_\_\_ **06**

**ARTIGOS ORIGINAIS****Biópsia de embriões e amplificação do DNA por PCR para diagnóstico pré-implantação de doenças genéticas**

Geber S., Guimarães S.E.F., Ferreira A., Sampaio M.\_\_\_\_\_ **11**

**Realização da histeroscopia antes do uso de técnicas de reprodução assistida.**

Baru R.L.R., Coelho J., Barreto J., Bin M, Ursolino G.L., Franco Jr.J.G.\_\_\_\_ **16**

**A transferência de embriões guiada por ultra-som melhora os índices de sucesso em um programa de fertilização *in vitro*.  
Análise de 600 ciclos.**

Dias Jr. J. A., Abdelmassih V., Abdelmassih S., Balmaceda J. P., Garcia F. O., Abdelmassih R., Nagy Z. P.\_\_\_\_\_ **19**

**Extração de espermatozóide testicular (TESE) em síndrome de "somente células de sertoli"**

Mourthé-Filho A.,<sup>1,2</sup> Faria A.R.L.,<sup>1</sup> Melo U.B.,<sup>1,2</sup> Taitson RE<sup>1,2</sup>\_\_\_\_ **24**

**Comparação entre Ciclos de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) em Pacientes com Fator Ovulatório Normal e com Síndrome dos Ovários Policísticos**

Mario Cavagna, Larissa Fontes,Dirceu Mendes-Pereira, Litsuko Shimabukuro, Edir Catafesta, Moacir Netto Ladeira\_\_\_\_ **27**

**Maturação *in Vitro* de Oócitos Provenientes de Ciclos Estimulados para Tratamento com Técnica de Reprodução Assistida**

Bossi, Renata; Sales, Liana; Ventura, Bernadete; Sampaio, Marcos; Geber, Selmo\_\_\_\_\_ **31**

**ARTIGOS DE OPINIÃO****Fertilização "*In vitro*": homossexualismo feminino, doação de útero**

Souza M. C. B., Sawen R. F, Oliveira J. B. A., Henriques C. A., Couto M. F C., Almeida G. L. F, Marcondes A. C. L.\_\_\_\_\_ **36**

**O Embriologista e a Reprodução Assistida: "Admirável Mundo Novo"**

Raquel de Lima Leite Soares Alvarenga.\_\_\_\_\_ **39**

**Aspectos psíquicos x reprodução assistida  
Estudo de caso - Vínculo primitivo e interação negativa para o sucesso.**

Melamed R.M., Rossi-Ferragut L.M., Aoki T., Laconelli Jr. A., Borges Jr.E.\_\_\_\_\_ **41**

**A Rede Latino-americana de Reprodução Assistida e o Brasil**

\_\_\_\_\_ **44**

**RELATO DE CASO****Gravidez com a utilização de ovócitos vitrificados Nota prévia.**

De Martin H., White J., Peterle M., Serafini P. \_\_\_\_\_ **46**

**Nascimento de feto a termo após congelamento de oócitos.**

Azambuja R.<sup>1</sup>, Stachecki<sup>1,2</sup>, Badalotti M.<sup>1</sup>, Michelon<sup>1</sup>; Petracco A \_\_\_\_\_ **50**

**EVENTOS**

\_\_\_\_\_ **53**

## Final de ano, tempo de "balanço"

Amigos,

Nove anos são passados desde o primeiro número do Jornal da SBRA. Decidimos realizar este suplemento do nosso periódico, mostrando numa breve coletânea alguns assuntos anteriormente publicados e que permanecem tão atuais...

Para 2006, muito trabalho pela frente. A consolidação almejada é obtermos uma qualificação A do sistema Qualis da CAPES e a indexação pelo Scielo.

Não temos dúvida da pujança das pesquisas no Brasil em Reprodução Assistida e nossos congressos tem mostrado isto, seguidamente. Porém, necessitamos que os pesquisadores colaborem e enviem seus trabalhos com periodicidade.

Um Feliz Ano Novo reProdutivo para todos e mãos à obra.

*Maria do Carmo Borges de Souza*  
*Christina de Albuquerque da Rocha*  
*Fernanda Freitas Oliveira Cardoso*

# *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*

Órgão de divulgação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida

## **EDITORIAL**

### **Um jornal, uma filosofia, uma esperança...**

Em 1978, Steptoe e Edwards deram início a era da Reprodução Assistida com a obtenção de uma gestação e parto, após a aplicação da técnica de fertilização "in vitro" com transferência intra-uterina de embriões humanos. Desde essa época, inúmeros progressos ajudaram a correção da infertilidade conjugal, contudo também foram gerados problemas de natureza médica, ética, religiosa e legal.

Hoje, nasce o Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida (JBRA), com a filosofia de discutir, divulgar e achar soluções para os problemas das áreas do conhecimento relacionadas com a Reprodução Assistida. Além disso, será o órgão oficial de comunicação da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA).

A SBRA tem a esperança de tornar-se uma sociedade fundamentada na valorização da atividade científica, regras claras e pouca política.

Possuindo o mesmo pensamento, participe da SBRA!

J. G. Franco Júnior  
Editor

### *Corpo Editorial*

#### **Editor**

José Gonçalves Franco Júnior

#### **Editores Associados**

Edson Borges  
Maria do Carmo Borges  
Ricardo Baruffi  
Selmo Gerber  
Weydson Barros Leal

#### **Conselho Editorial**

Adelino Amaral Silva  
Alberto Silva Franco  
Alvaro Petracco  
Amaury Andrade  
Anaglória Pontes  
Ana Lúcia Mauri  
Aroldo Camargos

Carlos André Henriques  
Claudia G. Petersen  
Condesmar Marcondes Filho  
Dirceu Mendes Pereira  
Eduardo Pandolfi Passos  
Elsimar Coutinho  
Elvio Tognotti  
Fábio Galucci  
Francesco Antonio Viscomi  
Humberto Shibasaki  
João Batista Oliveira  
João Pedro Junqueira Caetono  
Joaquim Roberto Lopes  
Joaquim Roberto Maciel Coelho  
Jonathas Borges Soares  
Kleber de Melo Morais  
Laurival de Luca  
Lídio Jair Ribas Centa  
Lúcia Martelli  
Luiz Bahamondes  
Luiz Fernando Dale

Marcos Dias de Moura  
Marcos Sampaio  
Mariangela Badalotti  
Marilza Vieira Rudge  
Mário Cavanha  
Mauri José Piazza  
Marta Franco Finotti  
Maurício Abrão  
Nelson Antunes Junior  
Newton Eduardo Busso  
Paulo Spinola  
Reginaldo Guedes Lopes  
Ricardo Mello Marinho  
Renzo Antonini Filho  
Rosires Pereira de Andrade  
Roger Abdelmassih  
Silvana Chedid  
Sidney Glina  
Tsutomu Aoki  
Túlio Tadeu Marcolini  
Walter Prata Pacce

*Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida: ano I - n° 1. Produção editorial e gráfica: Bios Comunicação e Editora Ltda, Rua Sen. Carlos Teixeira de Carvalho, 288 cj. 03 - Cambuci - São Paulo/SP - CEP 01535-010 -Tel./Fax: (011) 277-3314. Endereço para correspondência: Rua D. Alberto Gonçalves, 1500 - Ribeirão Preto/SP - CEP 14085-100 Tel.: (016) 626-2909 / 628-1196 - Fax: (016) 626-3644 - E-mail: franco@highnet.com.br.*

# Biópsia de embriões e amplificação do DNA por PCR para diagnóstico pré-implantação de doenças genéticas

Embryos biopsy and DNA amplification to preimplantation diagnosis of the genetics diseases.

**Geber S., Guimarães S.E.F., Ferreira A., Sampaio M.**

*Clínica Origen - Centro de Tecnologia em Genética e Reprodução Humana*

*Correspondência para Selmo Gerber*

*Clínica ORIGEN - Centro de Tecnologia em Genética e Reprodução Humana.*

*R. dos Otoni 881/15 - Belo Horizonte - M.G.,*

*CEP 30 110 100 /fone: 031-2717788 | FAX 031-2717698 - E-mail: sjegeber@bhnet.com.br*

## RESUMO

## INTRODUÇÃO

O objetivo de nosso estudo foi realizar a biópsia em embriões e proceder a amplificação genética dos blastômeros pela técnica de PCR, utilizando dois tipos de seqüências para identificação do sexo, evitando-se dessa forma a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. Talvez pela primeira vez na literatura, analisou-se a capacidade de amplificação de blastômeros após 3 dias em co-cultura com os embriões após diferenciação em células do trofocotoderma.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 50 embriões normalmente fertilizados após ICSI e biopsiados no início do dia 3, foram incluídos no estudo. 25 blastômeros analisados apresentaram amplificação. A confirmação do sexo observado à análise por PCR foi realizada através da amplificação de outro blastômero proveniente do mesmo embrião.

## RESULTADOS

Em 19 casos (76%) os resultados iniciais foram confirmados. Nos 6 casos em que não houve confirmação, 3

foram por falha de amplificação e 3 por ampliações discordantes. A proporção entre os sexos dos blastômeros amplificados foi de 13 do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Em 3 casos houve falha de amplificação e em 3 casos do sexo masculino, o blastômero do mesmo embrião amplificou de maneira discordante. A confirmação da amplificação dos blastômeros do sexo feminino ocorreu em 8 dos 9 dos casos (89%), no sexo masculino, a confirmação ocorreu em 9 dos 13 blastômeros (709%). Em todos os 7 casos de células do trofocotoderma a amplificação ocorreu de forma concordante em todos os blastômeros (100% de amplificação). Nas células em que foram utilizadas a seqüência de SRY para amplificação observamos um total de 72% de falha (18/25 células), com a amelogenina, esta taxa de falha foi de 20%, isto é, 3 em 15 células analisadas.

## CONCLUSÃO

A possibilidade de biopsiar embriões humanos no dia 3 pós FIV e amplificar o DNA dos blastômeros pela técnica de PCR foi confirmada. Mais ainda, demonstra a possibilidade de amplificação de DNA em blastômeros multiplicados *in vitro* até a diferenciação em células do trofocotoderma, com elevada confiabilidade. Desta forma, poderemos aumentar o número de células disponíveis para diagnóstico genético permitindo análises variadas e maior sensibilidade.

Unitermos: embrião, pré-implantação, ICSI, PCR, determinação do sexo.

Artigo Publicado: Volume 1, nº1, 1997

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Preimplantation diagnosis has been used to detect genetically transmitted diseases in order to avoid transmission to offspring. The amplification of the blastomeres DNA can be achieved by PCR analysis. The objectives of our study is to perform cleavage stage embryo biopsy and posterior PCR analysis of the blastomeres for sex determination. We have also analysed the possibility of DNA amplification of trophoctoderm cells stage blastomeres.

### MATERIAL AND METHODS

A total of 50 embryos were biopsied on day 3 after ICSI. 25 blastomeres presented amplification and the confirmation of the result were obtained after amplification of the other blastomeres of the same embryo. Confirmation was obtained in 76%. A total of 13

blastomeres were male and 9 female. In all cases where trophoctoderm cell were analysed confirmation was found. When we used SRY sequence for amplification, we found 72% failure. When we used amelogenine sequence the failure rate was 20%.

### CONCLUSION

Our results confirm the possibility to biopsy human embryos at day 3 and to amplify the blastomeres by PCR analysis. Moreover, we show the possibility of amplification of trophoctoderm cell with high accuracy. This results demonstrate the possibility of achieving a greater number of cells available for analysis in order to improve the amplification accuracy, and transfer embryos at the blastocyst stage. Embryos can also be frozen at day 3 and non affected transferred in a later cycle.

Key words: embryo, preimplantation, ICSI, PCR, sex determination

## INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento das técnicas de fertilização "in vitro" (FIV) (Edwards et al., 1980) e posteriormente de biópsia embrionária (Handyside et al., 1989) associada com o diagnóstico genético através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (Li et al., 1988), um novo caminho tem sido traçado no que concerne ao diagnóstico genético pré-implantação. A detecção de doenças geneticamente transmissíveis em estágio bastante precoce, como o anterior à implantação embrionária, permitem a seleção e transferência dos embriões sadios para o útero materno, permitindo que os casais com alto risco de transmissão obtenham uma gravidez sem a doença em questão. Este avanço diagnóstico oferece uma nova alternativa para os casais, evitando o dilema da necessidade da interrupção de uma gestação afetada. Mais ainda, nos casos de doença ligada ao sexo, somente metade dos fetos do sexo masculino seriam afetados, o que levaria a um novo dilema sobre a interrupção da gestação com 50% de chance de não ser afetada.

O estabelecimento das técnicas de FIV de forma rotineira permitiu avanços no conhecimento de cultura de embriões "in vitro". Após superovulação ovariana, aspiração dos óocitos e inseminação, embriões "in vitro" são cultivados rotineiramente até o dia 3, ou mesmo dia 6, quando da formação dos blastocistos. A partir daí, embriões podem ser biopsiados em 1 ou 2 células, sem que isto afete adversamente a capacidade de implantação e desenvolvimento da gestação (Hardy et al., 1990; Handyside et al., 1990).

O advento da técnica de PCR (Li et al., 1988) permite a amplificação de cadeias de DNA previamente estabelecidas, tornando possível a identificação de uma pequena quantidade de DNA, como em um único blastômero, de forma bem rápida. Desta maneira, tornou-se factível a realização de biópsia de embriões em estágio pré-implantação, amplificação do seu DNA para diag-

nóstico genético, e posterior transferência dos embriões sadios nos tempos habituais de FIV.

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) foi desenvolvida com o intuito de resolver os casos de infertilidade devido ao fator masculino (Van Steirteghem et al., 1993) com elevada taxa de fertilização. Sua utilização em associação com a biópsia embrionária poderia permitir uma maior disponibilidade de embriões para biópsia, além de evitar falsos positivos provocados por possíveis espermatozoides aderidos à zona pelúcida, quando da FIV clássica.

O objetivo de nosso estudo foi realizar a biópsia em embriões normalmente fertilizados pela técnica de ICSI e proceder a amplificação genética dos blastômeros removidos pela técnica de PCR, utilizando dois tipos de sequências para identificação do sexo. Analisamos também, talvez pela primeira vez na literatura, a capacidade de amplificação de blastômeros após 3 dias em cocultura com os embriões (dia 6 pós-inseminação) após diferenciação em células do trofocotoderma.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Indução da ovulação, ICSI e Cultura de Embriões

Os embriões estudados resultaram de técnica de ICSI. Inicialmente, as pacientes foram submetidas a superovulação utilizando análogos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e gonadotrofina da menopausa humana (hMG). A monitorização da resposta ovulatória foi realizada através da medida do estradiol sérico e da ultra-sonografia endovaginal (Tosbee-Toshiba, Japão). Uma vez que a paciente apresentasse critério ultra-sonográfico e endocrinológico induzia-se a maturação oocitária através da administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Entre 32 e 36 horas após, realizou-se a aspiração folicular guiada por ultra-som endovaginal, para retirada dos óocitos.



Após identificação, os oócitos foram colocados em 20  $\mu$ l de meio de cultura (Solução balanceada de Earle, Sigma), cobertos por óleo mineral, e cultivados na temperatura de 37°C em CO<sub>2</sub> a 5%. Após preparo pela técnica de *swim-up*, espermatozoides foram separados de forma que cada oócito em metáfase II pudesse ser submetido a ICSI, 5 horas após a aspiração.

A micromanipulação foi realizada utilizando-se microscópio invertido (Nikon, Japão) sob aumento de 400x. O microscópio era equipado com micromanipuladores hidráulicos de controle motorizado (Narishige, Japão). O procedimento constava inicialmente de identificação e aspiração de um único espermatozoide a partir de uma gota de meio de cultura contendo polivinilpirrolidina. Os oócitos foram mantidos por uma micropipeta de sustentação, enquanto a micropipeta de injeção, contendo o espermatozoide aspirado, era forçada através da zona pelúcida em direção ao citoplasma, quando um único espermatozoide era injetado após confirmada a penetração.

Os oócitos foram examinados aproximadamente 19 horas após a ICSI para confirmação da fertilização. Somente foram considerados fertilizados os oócitos que apresentavam 2 pronúcleos e o segundo corpúsculo polar. Entre 40 e 44 horas após a injeção dos espermatozoides (dia 2), os embriões normalmente fertilizados foram examinados para avaliação morfológica, o mesmo ocorrendo no dia subsequente, isto é, dia 3. Durante este intervalo de tempo, os embriões foram mantidos em meio de cultura a 37°C com CO<sub>2</sub>, a 5%. No dia 3, os embriões com 6 a 10 células foram submetidos a uma nova micromanipulação, para biópsia e remoção de 2 blastômeros.

### Biópsia embrionária e co-cultura dos embriões e blastômeros

O embrião a ser biopsiado era inicialmente transferido para a microgota contendo meio de cultura tamponado (Hepes, Sigma), e levado a microscópio invertido (Leitz, Alemanha), equipado com um par de micromanipuladores mecânicos (Leitz, Alemanha). Cada embrião era imobilizado com uma micropipeta de sustentação em um dos micromanipuladores, através de pressão negativa. Uma vez apreendido o embrião, aproximava-se a micropipeta de perfuração (10 a 20  $\mu$ m), colocada no segundo micromanipulador, contendo solução ácida de Tyrode (pH 2,4), que era delicadamente soprada sobre a zona pelúcida, até que na área de contato fosse formado um pequeno orifício. A micropipeta de perfuração era então afastada e, em seu lugar, a micropipeta de aspiração (30 a 50  $\mu$ m) era delicadamente colocada junto ao orifício na zona pelúcida. Em todos os casos, 2 blastômeros eram então removidos através de delicada sucção. Todo o procedimento era realizado sob visão microscópica. Em todos os casos biopsiados, a presença de um núcleo em interface era observado, nos blastômeros isolados, através do microscópio de dissecação. Findo o procedimento, os blastômeros removidos eram colocados em co-cultura com os embriões

biopsiados em gotas de 20  $\mu$ l de meio de cultura, a 37°C e mistura gasosa de 5% de CO<sub>2</sub>. Alguns blastômeros foram avaliados ainda no dia 3. Os demais, foram mantidos em co-cultura com os embriões até o dia 6, quando os blastômeros diferenciados em células do trofotoderma (TE) foram analisados.

Em todos os casos, a avaliação do sexo por PCR era realizada em mais de um blastômeros do mesmo embrião, de modo que houvesse a confirmação do resultado.

### Preparo dos blastômeros

Cada blastômero era transferido, através de uma micropipeta, para um tubo de Eppendorf estéril contendo 5  $\mu$ l de água ultra-pura, sob visão direta em lupa (Nikon, Japão) de forma a confirmar a expulsão do blastômero. Os blastômeros eram então mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, e posteriormente, congelados e descongelados antes do processo de amplificação.

### Amplificação do DNA por PCR

Dois pares de *primers* foram utilizados no estudo. Inicialmente, utilizamos o gene determinante testicular (SRY), presente no braço curto do cromossomo Y e amplificando a seqüência Homeobox de 222 pares de base. Posteriormente utilizamos a seqüência do gene codificador para Amelogenina para cromossomos X e Y. Todas as reações constavam das amostras e controle para falso positivo (branco). Inicialmente, o DNA era extraído com temperatura de 95°C em solução de elevado pH. À solução de PCR era acrescida do blastômero para amplificação da seqüência externa (*outer*). Posteriormente, 2  $\mu$ l eram alíquotados de cada solução e transferidos para um novo tubo contendo os reagentes para a amplificação da seqüência interna (*inner*).

O número de ciclos para amplificação inicial era de 30 e a segunda amplificação era realizada com 30 ciclos. A análise dos produtos da amplificação era realizada

através de eletroforese em mini gel de poliácridamida a 100V durante 1 hora, corados pela prata.

Nos casos em que utilizamos a seqüência do SRY, a célula era considerada como do sexo masculino quando a seqüência específica do fragmento do Y era visível. A ausência desta banda representava uma célula do sexo feminino. Quando utilizamos amelogenina, nos casos de sexo masculino, era possível observarmos a presença de duas bandas (X e Y), sendo que na presença de sexo feminino observamos apenas uma banda (X). Em todos os casos, o procedimento completo levou um tempo máximo de 12 horas.

## RESULTADOS

Um total de 50 embriões normalmente fertilizados após ICSI e biopsiados no início do dia 3, foram incluídos no estudo. Em todos os casos, 2 blastômeros foram biopsiados de cada embrião sendo que 7 foram mantidos

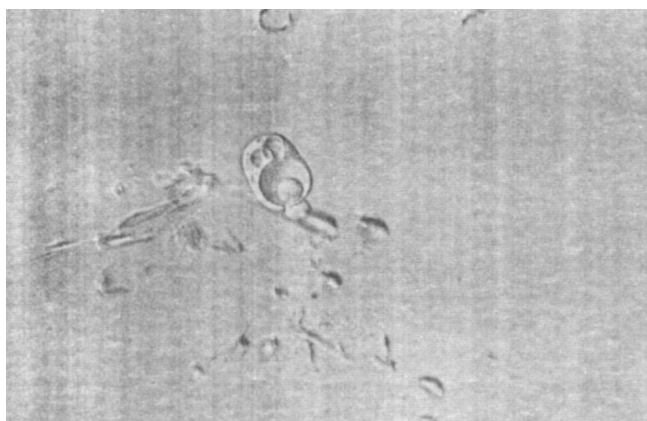


Figura 1. Blastômero diferenciado em célula de trofocotoderma 3 dias após biópsia e co-cultura *in vitro*

em co-cultura com os embriões para posterior análise no dia 6. Todos os blastômeros deste grupo apresentaram pelo menos uma divisão celular e diferenciação em célula do trofocotoderma (Fig. 1). Os demais blastômeros foram imediatamente preparados para amplificação do DNA. Lise celular, decorrente do método de biópsia, foi observada em somente 3 casos, sendo que em todos eles a amplificação ocorreu de maneira normal.

A primeira série de 10 embriões não pôde ser considerada para análise uma vez tendo apresentado contaminação no controle. Em 15 blastômeros, houve falha completa de amplificação. Os demais 25 blastômeros analisados apresentaram amplificação. A confirmação do sexo observado à análise por PCR foi realizada através da amplificação de outro blastômero proveniente do mesmo embrião, tanto biopsiado quanto multiplicado em co-cultura durante 3 dias. Em 19 casos (76%) os resultados iniciais foram confirmados. Nos 6 casos em que não houve confirmação, 3 foram por falha de amplificação e 3 por ampliações discordantes.

A proporção entre os sexos dos blastômeros amplificados foi de 13 do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Em 3 casos houve falha de amplificação e em 3 casos do sexo masculino, o blastômero do mesmo embrião amplificou de maneira discordante. A confirmação da amplificação dos blastômeros do sexo feminino ocorreu em 8 dos 9 casos (89%), no sexo masculino, a confirmação ocorreu em 9 dos 13 blastômeros (70%).

Quando comparamos os resultados obtidos com amplificação de células do trofocotoderma, que foram mantidas em cultura por mais 3 dias, com os blastômeros amplificados imediatamente, observamos que em todos os 7 casos de células do trofocotoderma a amplificação ocorreu de forma concordante em todos os blastômeros (100% de amplificação), enquanto nos 18 casos de blastômeros indiferenciados houveram 3 falhas de amplificação e 3 situações discordantes (16% de falha de amplificação e 16% de discordância).

Nas células em que foram utilizadas a seqüência de SRY para amplificação observamos um total de 72% de falha (18/25 células). Quando utilizamos a amelogenina, esta taxa de falha foi de 20%, isto é, 3 em 15 células analisadas.

## DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstra a capacidade de realizarmos diagnóstico genético por PCR em embriões humanos obtidos pela técnica de FIV. A biópsia embrionária seguida de amplificação genética por PCR realizada em um período inferior a 12 horas, permite que os embriões não afetados sejam transferidos no mesmo dia, isto é, dia 3 pós-inseminação, mantendo a rotina de FIV. Realizamos também comparação entre dois primers (específicos para cromossomos X e Y) para amplificação do DNA dos blastômeros e demonstramos, talvez pela primeira vez, a capacidade de diagnóstico genético pré-implantação utilizando células de trofocotoderma cultivadas "in vitro".

A utilização rotineira da técnica de ICSI quando da sexagem de embriões para diagnóstico pré-implantação, impede os possíveis falsos positivos devido à presença de espermatozoides presos à zona pelúcida durante o processo de FIV clássica. Permite também um aumento no número de embriões disponíveis para biópsia, uma vez que a taxa de fertilização apresenta-se superior. Estas conclusões estão de acordo com as recentes análises apresentadas por Verlinsky (1996).

Em nosso estudo, a biópsia embrionária não apresentou efeitos deletérios ao desenvolvimento embrionário estando de acordo com o demonstrado por Handyside et al (1990); Harper (1996) e Soussis et al (1996) após desenvolvimento de gestações com o nascimento de crianças saudáveis. A presença de lise celular, observada em 3 casos, não interferiu no resultado da amplificação do DNA devido ao fato de representar um dos passos iniciais do processo de PCR, além de não ter havido destruição do material nuclear. Este achado também demonstra a inocuidade do processo de biópsia embrionária para o diagnóstico pré-implantação.

A amplificação do DNA de células do trofocotoderma pela técnica de PCR; observada talvez pela primeira vez, representa um avanço considerável no diagnóstico pré implantação, uma vez que permite que se aguarde um período de 3 dias para que as células se multipliquem "in vitro", aumentando o número de células disponíveis para diagnóstico genético, permitindo que mais de um método seja realizado e diminuindo assim as taxas de erro diagnóstico (Griffin et al, 1994; Ray et al. 1996). Desta forma, embriões biopsiados poderão ser congelados e posteriormente, os não afetados serão transferidos para o útero materno. Outra possibilidade é a transferência em estágio de blastocisto no dia 6 (Bolton et al, 1991).

A presença de contaminação observada em nosso primeiro grupo de estudo, faz parte dos fatores de erro da técnica (Ray & Handyside, 1995) sendo fundamental a sua identificação de modo a impedir falhas no diagnóstico. Esta contaminação, entretanto, é facilmente identificada e corrigida conforme demonstrado pelos resultados obtidos nas séries seguintes. Com relação à falha de amplificação observada em 72% dos casos em que utilizamos o SRY pode ter sido devido ao *primer* em si, uma vez que esta taxa foi de somente 20% quando utilizamos a seqüência da Amelogenina. Outros fatores podem ser responsáveis por esta falha de amplificação como a ausência de núcleo nas células biopsiadas, falha no método de análise (gel de eletroforese), ou mesmo erros inerentes ao método, uma vez que uma maior porcentagem de falhas de amplificação se deu nas primeiras séries.

A proporção entre os sexos obtidos neste estudo apresentou-se discretamente aumentado para o sexo masculino. Provavelmente, o pequeno número de embriões estudado pode ter sido o responsável por um vício de estudo, entretanto, se eliminarmos os casos em que não houve confirmação do resultado obtido inicialmente, observamos uma proporção mais próxima do esperado, isto é, 8 casos do sexo feminino e 9 do masculino.

O fato de não termos encontrado falha de amplificação ou discordância de diagnóstico quando utilizamos células do trofotoderma demonstra uma alta confiabilidade em seu uso, principalmente se compararmos este resultado com o observado com os blastômeros recém biopsiados (100% e 68%, respectivamente). Entretanto uma avaliação estatística não pôde ser realizada uma vez que o número de células do trofotoderma estudadas foi pequeno. Outra possível explicação para esta diferença, está no fato das células que atingiram diferenciação celular após 3 dias de co-cultura *in vitro*, certamente apresentarem atividade nuclear, enquanto nos blastômeros recém biopsiados, o núcleo poderia estar ausente.

Em resumo, nosso estudo confirma a possibilidade de biopsiar embriões humanos no dia 3 pós FIV e amplificar o DNA dos blastômeros pela técnica de PCR. Mais ainda, demonstramos a possibilidade de amplificação de DNA em blastômeros multiplicados "in vitro" até a diferenciação em células do trofotoderma,

com elevada confiabilidade. Desta forma, poderemos aumentar o número de células disponíveis para diagnóstico genético permitindo análises variadas e maior sensibilidade.

## REFERÊNCIAS

- Bolton VN, Wren M.E, Parsons J.H. Pregnancies after "in vitro" fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil. Steril.*, 55: 830-832, 1991.
- Edwards R G, Steptoe P C, Purdy J M. Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 87: 737-756, 1980.
- Griffin D K, Handyside A H, Harper RJ, et al. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J. Assist. Reprod. Genetics.*, 11: 132-43, 1994.
- Handyside A.H, Pattinson J.K, Penketh R.J., Delhanty J D, Winston R M L, Tuddenham E G. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*, 1: 347-349, 1989.
- Handyside A H, Kontogianni E H, Hardy K. Winston RM L. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344: 768-770, 1990.
- Hardy K, Martin K L, Leese H J, Winston R M L, Handyside A H. Human preimplantation development "in vitro" is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum.Reprod.*, 5: 708-714, 1990.
- Harper J. Preimplantation diagnosis of inherited disease by embryo biopsy: An update of the world figures. *J. Assist. Reprod. Genetics*, 90: 95, 1996
- Li A, Gyllenstein U B, Cui X, Saiki R K, Erlich H A, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335:414-419, 1988.
- Ray P F, Handyside A H. PCR from single cells for preimplantation diagnosis. In: *Methods in Molecular Biology: Molecular Diagnosis of Genetic Disease*, 1995.
- Ray P F, Winston R M L, Handyside A H. Reduced allele dropout in single-cell analysis for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis. *J. Assist. Reprod. Genetics*13:104-106,1996.
- Soussis I, Harper J, Kontogianni E, et al. Pregnancies resulting from embryos biopsied for preimplantation diagnosis of genetic disease: Biochemical and ultrasonic studies in the first trimester of pregnancy. *J. Assist. Reprod. Genetics.*, 13:254-259, 1996.
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z.P., Joris H., Liu J., Staessen C., Smitr J., J., Wisanto A., Devroy P.: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 8: 1061-1066, 1993.
- Verfnsky Y. - Personal communication, 1996.

# Realização da histeroscopia antes do uso de técnicas de reprodução assistida.

Hysteroscopy performed prior to use of assisted reproduction techniques.

**Baruffi R.L.R., Coelho J., Barreto J., Bin M, Ursolino G.L., Franco Jr J.G.**

*Centro de Reprodução Humana e Endoscopia Pélvica da Fundação Maternidade Sinhá Junqueira.*

*Correspondência:*

*Ricardo Baruffi -R. Dom Alberto Gonçalves 1500- Ribeirão Preto - SP. CEP 14085-100 - Fax: 55-16-605-4292*

*E-mail: crh@highnet. com. br*

## RESUMO

### INTRODUÇÃO

Estudos prévios têm sugerido que anormalidades uterinas detectáveis estão presentes em aproximadamente 45% dos pacientes que foram submetidos ao programa de fertilização "in vitro". A finalidade deste estudo é avaliar o papel da histeroscopia antes do uso de técnicas de reprodução assistida e seu valor na detecção de anormalidade uterinas não diagnosticadas ou com avaliação errada.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo incluiu o total de 230 pacientes atendidas no Centro de Reprodução Humana da Fundação Maternidade Sinhá Junqueira. O exame foi realizado em base ambulatorial durante a primeira fase do ciclo menstrual, usando-se como anestesia local o bloqueio paracervical bilateral. A distensão da cavidade uterina foi executada

com CO<sub>2</sub>. A histerometria também foi executada, assim como a escolha do cateter ideal para o momento da futura transferência embrionária.

### RESULTADOS

A cavidade uterina não apresentou alterações em 152 pacientes (66%), mas algum tipo de patologia foi visualizado em 78 pacientes (34%). Alterações vasculares sugestivas de endometrites foram detectadas em 44 pacientes (19,1 %), pólipos endometriais em 17 (7,4%), sinéquias ou adesões em 10 (4, 4%), anomalias müllerianas em 4 (1,8%) e miomas submucosos em 3 (1,3%).

### CONCLUSÃO

A histeroscopia diagnóstica é exame que deveria ser rotineiramente realizado antes do uso das técnicas de reprodução assistida, facilitando a identificação de doenças que poderiam interferir com o processo de implantação embrionária, permitindo a precisa avaliação da curvatura do canal cervical e da cavidade uterina, marcas fundamentais para a transferência embrionária ideal.

Unitermos: histeroscopia, fertilização "in vitro".

**ABSTRACT****INTRODUCTION**

Previous reports have suggested that hysteroscopically detectable uterine abnormalities are present in approximately 45% of patients undergoing “in vitro fertilization”. This study is an attempt to evaluate if hysteroscopy evaluation before the use of assisted reproduction techniques is of value in detecting undiagnosed or misinterpreted uterine abnormalities.

**MATERIAL E METHODS**

Diagnostic hysteroscopy was carried out on 230 patients before the use of assisted reproduction techniques (IVF ICSI and oocyte donation). The examination was performed on an ambulatory basis during the first phase of the menstrual cycle using local anesthesia with bilateral paracervical block. Distension of uterine cavity was performed with CO<sub>2</sub>. Hysterometry was evaluated, as well as the type of ideal catheter to be used at the time of embryo transfer.

**RESULTS**

The uterine cavity did not present any changes in 152 patients (66%) but some type of pathology was visualized in 78 patients (34%). Vascular changes suggestive of endometritis were detected in 44 patients (19.1%), endometrial polyps in 17 (7.4%), synechiae or adhesions in 10 (4.4%), mullerian anomalies in 4 (1.8%), and submucosal myomas in 3 (1.3%).

**CONCLUSION**

Diagnostic hysteroscopy is an exam that should be routinely performed before the use of assisted reproduction techniques, facilitating the identification of diseases that may eventually interfere with the process of embryo implantation and also permitting an accurate evaluation of the cervical canal and uterine cavity, fundamental marks for an ideal embryo transfer

Key words: hysteroscopy, “in vitro” fertilization.

**INTRODUÇÃO**

O processo de implantação embrionária é estágio do procedimento de fertilização “in vitro” que possui elevado nível de falha, cujas razões ainda continuam desconhecidas. Anormalidades no canal cervical e na cavidade uterina podem alterar o sucesso dos programas de fertilização “In vitro” e transferência de embriões, entretanto há controvérsias sobre esses aspectos.

A visão direta da cavidade uterina obtida pela histeroscopia oferece avanço sobre outros métodos diagnósticos (histerossalpingografia, ultra-sonografia etc). Geralmente, os principais achados de anormalidades histeroscópicas correspondem às aderências intrauterinas, defeitos de fusão dos dutos de Müller, pólipos endometriais, miomas submucosos e endometrites.

Vários estudos relatam lesões detectadas por histeroscopia em aproximadamente 45% dos pacientes que foram submetidos ao programa de fertilização “In vitro” (Frydman et al., 1987; Seiner et al., 1988).

**MATERIAL E MÉTODOS**

Submeteram-se ao diagnóstico histeroscópico de rotina 230 pacientes antes de serem admitidas aos programas de reprodução assistida invasiva do Centro de Reprodução Humana da Fundação Maternidade Sinhá Junqueira. A histeroscopia foi realizada em ambulatório, com bloqueio paracervical por xilocaína a 1%, na fase proliferativa do ciclo menstrual, através do uso de histeroscópio rígido de 4 mm, com diâmetro externo de 5 mm, que permitiu visão oblíqua de 30° com o eixo ótico. O CO<sub>2</sub> foi usado como meio de distensão. O canal endocervical, a cavidade uterina, os orifícios tubários e o endométrio foram metodicamente examinados. Rotineira-

mente, a histerometria e as diversas inclinações do canal cervical foram relatadas, nessa ocasião também foi recolhido o cateter ideal para a transferência embrionária.

**RESULTADOS**

A cavidade uterina não apresentou alterações em 152 pacientes (66%), mas algum tipo de patologia foi identificado em 78 pacientes (34%). As mudanças vasculares sugestivas de endometrites foram detectadas em 44 pacientes (19,1 %), pólipos endometriais em 17 (7,4%), adesões ou sinéquias em 10 (4,4%), anomalias mullerianas em 4 (1,8%), e miomas submucosos em 3 (1,3%).

**DISCUSSÃO**

A utilidade da histeroscopia na avaliação da mulher infértil tem sido motivo de inúmeras discussões (Taylor & Hamou, 1983).

Por outro lado, as baixas taxas de implantação embrionária nos ciclos de fertilização “in vitro” estabelecem a necessidade de estudos sobre fatores uterinos, ou técnicos, durante atos de transferência embrionária que possam afetar os resultados. Fatores técnicos podem ser causa de falha na implantação, como a colocação incorreta do cateter de transferência, a injeção rápida ou excessiva de fluido no momento da expulsão dos embriões (Leeton et al., 1982). Entretanto, anormalidades intra-uterinas participariam de forma significativa nos insucessos dos ciclos de fertilização “in vitro” e transferência de embriões (Valle, 1989).

Prospectivamente, ainda não foi avaliado o impacto da patologia cervical ou intra-uterina no sucesso dos programas de fertilização “in vitro”. Em geral, acredita-se que anomalias da cavidade uterina, como pólipos

endometriais, adesões, malformações ou fibromas uterinos estão presentes em 45% dos pacientes submetidos ao processo de fertilização "in vitro". La Sala et al. (1985) referem que 35% destes pacientes apresentam achados normais após histerografia.

Nosso estudo mostrou que 34% dos pacientes apresentavam algum tipo de patologia uterina. Alterações vasculares sugestivas de endometriose foram detectadas em 44 pacientes (19,1%), pólipos endometriais em 17 (7,4%), adesões ou sinéquias em 10 (4,4%), anomalias mullerianas em 4 (1,8%) e miomas submucosos em 3 (1,3%).

Aspecto que deveria ser sempre analisado é o tratamento prévio de infertilidade que poderia, pelos diversos processos de estimulação ovariana, produzir efeitos negativos no endométrio e, conseqüentemente, no processo de implantação embrionária. Especialmente, os problemas tradicionalmente ligados com a ação estrogênica intensa, como a hiperplasia endometrial, pólipos endometriais e miomas submucosos. Além disso, fatores traumáticos, durante o processo de colocação dos embriões, causariam injúrias ao endométrio, produzindo reações inflamatórias, endometrites e possíveis adesões que dificultariam o futuro processo de implantação (Dicker et al., 1992).

Por outro lado, o tratamento da patologia uterina antes do processo de fertilização "in vitro" resultou em taxa de gestação de 8,9% no grupo de pacientes com idade até  $\geq 40$  anos, e, no grupo abaixo de 40 anos, obteve-se índice de 19,9% de gestações, subtendendo-se que todas essas pacientes falharam de uma a três vezes no programa de fertilização "in vitro" (Dicker et al., 1990).

Shamma et al. (1992) referem significativa diferença entre as taxas de gestação clínica entre pacientes com

histeroscopia normal e com achados histeroscópicos alterados (37,5% versus 8,3%;  $p = 0,04$ ).

Concluindo, o diagnóstico histeroscópico é exame que deveria ser incluído antes do uso das técnicas de reprodução assistida, facilitando a identificação de doenças que poderiam eventualmente interferir com o processo de implantação embrionária, permitindo acurada avaliação do canal cervical e da cavidade uterina, marcas fundamentais para a transferência embrionária ideal.

## REFERÊNCIAS

- Dicker D., Goldman J.A., Ashkenazi J., Feldberg D., Dekel A. - The value of hysteroscopy in elderly women prior to in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET): a comparative study. J. "In Vitro" Fert. Embryo Transfer., 7: 267-270, 1990.
- Dicker D., Ashkenazi J., Feldberg D., Farhi J., Shalev J., Ben-Rafael Z. - The value of repeat hysteroscopic evaluation in patients with failed in vitro fertilization transfer cycles. Fertil. Steril., 58: 833-835, 1992.
- Frydman R., Eibschitz I., Fernandez H., Hamon J. - Uterine evaluation by microhysteroscopy in IVF candidates. Hum. Reprod., 2: 481-485, 1987.
- La Sala G.B., Dessanti L., Sacchetti L. - Hysteroscopy and female sterility: analysis of the results from 213 patients. Acta Europ. Fert., 16: 47-49, 1985.
- Leeton J., Trounson A., Jessup D., Wood C. - The technique for human embryo transfer. Fertil. Steril., 38: 156-161, 1982.
- Seinera P., Maccario S., Visentim L., DiGregorio A. - Hysteroscopy in an IVF-ET program. Clinical experience with 360 infertile patients. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 67: 135-137, 1988.
- Shamma F.N., Lee G., Gutmann J.N., Lavy G. - The role of office hysteroscopy in in vitro fertilization. Fertil. Steril., 58: 1237-1239, 1992.
- Taylor P.G., Hamou J.E. - Hysteroscopy. J. Reprod. Med., 28: 359-364, 1983.
- Valle R.F. - Therapeutic hysteroscopy in infertility. Int. J. of Fert., 29: 143-148, 1989.

# A transferência de embriões guiada por ultra-som melhora os índices de sucesso em um programa de fertilização *in vitro*. Análise de 600 ciclos.

The use of ultrasound during the embryo transfer improves the success of an in vitro fertilization program. Analyses of 600 cycles.

**Dias Jr. J. A., Abdelmassih V.,  
Abdelmassih S., Balmaceda J. P.,  
Garcia F. O., Abdelmassih R., Nagy Z. P.**

Correspondência para:  
Clínica e Centro de Reprodução Humana Roger Abdelmassih  
Rua Maestro Elias Lobo 805 - CEP: 01433-000  
Tel. (11) 3887-1555; Fax (11) 3885-8607 São Paulo - SP - Brasil  
e-mail: clínica@dglnet.com.br

## ABSTRACT

*The effect of the ultrasound use during the embryo transfer (ET) on the pregnancy rates was evaluated by analyzing retrospectively 600 consecutive ICSI cycles. In the period between 01/01/1998 and 01/31/2000, 271 cycles were performed where ET was aided by ultrasound (Group A) which was compared to 329 cycles where ET was carried out without ultrasound (Group B). There were no statistically significant differences present in different variables such as cause of infertility, age of woman, fertilization rate and number of embryos transferred between the two groups. However, the implantation and clinical pregnancy rates were significantly higher in the group where ET was performed with the aid of ultrasound (18,5% and 45% respectively) when compared to the group where the ultrasound was not used for ET (10,2% e 27,4% respectively,  $p < 0,0001$ ). In conclusion, the use of ultrasound for embryo transfer is recommended because it improves significantly the pregnancy rate in IVF-ET cycles.*

Key words: in vitro fertilization, embryo transfer, ultrasound.

## INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é um dos últimos passos para se conseguir a gravidez em um programa de fertilização *in vitro* (FIV). Desde o nascimento do primeiro bebê de proveta (Steptoe e Edwards, 1978) muitos aspectos técnicos do procedimento apresentaram

grande desenvolvimento, mas mesmo com todas as inovações nos procedimentos de FIV, a maioria dos embriões transferidos não se implanta. As baixas taxas de implantação encontradas na literatura mundial podem ocorrer por vários fatores. Estes fatores que contribuem para que ocorra a gravidez podem ser agrupados em fatores dependentes do embrião, fatores uterinos e fatores dependentes da técnica de transferência embrionária. No que tange os fatores dependentes do embrião a literatura considera o número de células, o índice de fragmentação e dia da realização da transferência (48, 72 horas) como fatores preditivos do sucesso de um ciclo (Veeck, 1991). Quanto aos fatores uterinos é sabido que patologias que alterem a anatomia desta podem ser contribuintes das taxas de sucesso de um programa de FIV; a espessura endometrial e o ambiente hormonal (níveis de estradiol e progesterona) também tem sido relacionados como fatores prognósticos. Quanto à técnica realizada para a transferência embrionária a literatura relata que o tipo de cateter utilizado, a experiência do médico que realiza a transferência e o uso da ultra-sonografia são fatores que interferem nas taxas de sucesso (Coroleu et al., 2000 ; Wood et al., 2000).

Em 1985, o uso da ultra-sonografia para facilitar a TE foi descrito por Strickler et al. Diversos autores referem melhores resultados com a utilização desta técnica embora ainda existem controvérsias na literatura quanto aos reais benefícios da mesma (Coroleu et al., 2000).

O objetivo deste estudo retrospectivo foi avaliar se a utilização da ultra-sonografia contribuiu para a melhora das taxas de sucesso num programa de fertilização *in vitro* e transferência de embriões (FIV-ET).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Pacientes

Foram levantados retrospectivamente os dados referentes a 600 ciclos consecutivos em pacientes que foram submetidas a estimulação ovariana controlada para realização de FIV-ET no período de 01/01/98 a 31/01/2000. As pacientes foram então divididas em 2 grupos. O grupo A foi representado por 271 pacientes que tiveram suas transferências guiadas pela ultra-sonografia (USG). O grupo B foi composto por 329 pacientes que tiveram a sua transferência sem o uso da ultrasonografia. Os critérios de inclusão utilizados foram: transferência de embriões após ciclos de estimulação ovariana controlada; mulheres com idade  $\leq 40$  anos, nas quais foram transferidos pelo menos 3 embriões, transferência realizada com 72 horas após a aspiração oocitária. Os critérios de exclusão foram: transferência de blastocisto, utilização de óvulos de doadora, casais onde os espermatozoides foram obtidos por aspiração percutânea dos espermatozoides (PESA), aspiração dos espermatozoides do testículo (TESA), biópsia e extração dos espermatozoides do testículo (TESE) e presença de fator uterino.

### Hiperestimulação ovariana controlada

O esquema de hiperestimulação ovariana controlada utilizado em todas as pacientes baseou-se inicialmente num protocolo longo de *down regulation* com Acetato de Leuprolide 0,5mg/d SC; Lupron (Abbott Laboratórios do Brasil, São Paulo, Brasil) ou Reliser (Serono, São Paulo, Brasil). A estimulação ovariana foi realizada com FSH recombinante (Gonal-F, Serono, São Paulo, Brasil ou Purigon; Organon, Brasil) em esquema de *step-down* e controlada com ultrasonografia transvaginal (Acuson - *Computed Sonography* - Mod: 128XP/4) e dosagem sérica de estradiol (E2) diariamente a partir do 7º dia do estímulo até o momento da aplicação do hCG (Profasi; Serono, São Paulo, Brasil / Pregnyl; Organon, Brasil).

### Manipulação seminal oocitária e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)

Em todos os casos o sêmen era obtido por masturbação no dia da aspiração oocitária. Após a liquefação a amostra era avaliada quanto à concentração e motilidade. As amostras consideradas normais (concentração  $>20 \times 10^6$ /ml; motilidade  $>50\%$  e morfologia normal  $>14\%$  - Kruger) ou com oligozoospermia moderada (concentração de  $6$  a  $19 \times 10^6$ /ml) eram processadas utilizando centrifugação com gradiente de  $90\%$  e  $45\%$  durante 20 minutos, com rotação de 300xg. Realizada esta centrifugação a amostra era novamente lavada utilizando o meio de cultura Sperm Rinse (IVF Science Scandinavian, Gothenburg, Sweden) durante 10 minutos a 300xg. Após a centrifugação o sobrenadante era desprezado e o *pellet* ressuspenso em 1 ml de Sperm Rinse e a amostra era colocada em incubadora a  $37^\circ\text{C}$  com  $5,5\%$  de  $\text{CO}_2$  até o momento da realização da ICSI. Nos casos de oligozoospermias severas (concentração  $<5,0 \times 10^6$ /ml), as

amostras eram preparadas utilizando o volume total do ejaculado adicionado a 6 ml de Sperm Rinse e centrifugada por 10 minutos a 300xg, o sobrenadante era então desprezado e o *pellet* ressuspenso com 0,5ml de Sperm Rinse e incubado a  $37^\circ\text{C}$  com  $5,5\%$  de  $\text{CO}_2$  até o momento da ICSI.

A aspiração oocitária guiada por ultra-sonografia era realizada 34-36 horas após a aplicação do hCG. O líquido folicular era aspirado para um tubo falcon previamente aquecido à  $37^\circ\text{C}$  e enviado ao laboratório de embriologia onde os oócitos eram contados e classificados. Os oócitos eram então colocados em 1 ml de solução de hialuronidase (20UI/ml - Hyase 1 - IVF Science Scandinavian, Gothenburg, Sweden) por 30 segundos e em seguida lavados com meio de cultura IVF 50 (IVF Science Scandinavian, Gothenburg, Sweden) e mantidos em microgotas de 30 microlitros de IVF 50 durante 15 a 30 minutos até serem desnudados mecanicamente através de aspirações repetitivas com micropipeta plástica (150 micrômetros). Após este procedimento os oócitos eram colocados em cultura em meio IVF 20 a  $37^\circ\text{C}$  com  $5\%$   $\text{CO}_2$ . A ICSI era realizada após 2-3 horas da aspiração folicular e em seguida os oócitos injetados eram mantidos em meio IVF 20 em estufa como especificações anteriores (Abdelmassih et al, 1996). Os embriões obtidos eram transferidos após 72 horas da aspiração.

### Transferência de embriões e suporte da fase lútea

Após 72 horas da aspiração oocitária, os embriões eram selecionados para a transferência de acordo com critérios de número de células e índice de fragmentação (Veck, 1991). O número de embriões transferidos variou conforme a idade da paciente, o número de embriões disponíveis, a qualidade destes e o número de tentativas prévias da paciente. Normalmente transferiu-se de 3 a 5 embriões.

O preparo das pacientes para a transferência foi o mesmo em ambos os grupos: paciente em posição de litotomia e exposição do colo uterino com espéculo de Collins com posterior preparo do colo e vagina com soro fisiológico.

As transferências foram realizadas com cateteres flexíveis de modelos diferentes (Frydman e Wallace) em ambos os grupos, sem diferenças estatísticas quanto ao modelo utilizado nos dois grupos. A técnica utilizada para o preparo dos cateteres foi sempre a mesma: o cateter foi preenchido quase totalmente por meio e os embriões foram aspirados para o interior do cateter juntamente com no máximo 10 a 20 microlitros de meio e posicionados entre duas pequenas bolhas de ar. Estes cateteres conectados a seringas de insulina foram então levados ao médico que realizou a transferência.

No grupo A, tanto o posicionamento do cateter como a introdução dos embriões foi supervisionada pela ultra-sonografia pélvica transabdominal. Já no grupo B, cuja transferência foi realizada sem auxílio ultra-sonográfico,



o posicionamento do cateter e introdução dos embriões foi realizada “às cegas”, de acordo com a sensibilidade do médico responsável pela transferência.

O suporte da fase lútea foi iniciado do dia da aplicação do hCG com o uso de progesterona natural micronizada por via oral, na dose de 800mg/dia (Utrogestan, Enila, Rio de Janeiro, Brasil). A dosagem sérica do hCG foi realizada 12 dias após a transferência com valor de referência >25mUI/ml. A confirmação clínica da gestação foi obtida pela visualização de saco gestacional compatível após aproximadamente 24 dias da realização da transferência embrionária.

### Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada com o programa “SPSS for windows”, utilizando-se teste de chi-square para variáveis qualitativas e Mann-Whitney para comparar médias. O índice de significância estatística utilizado foi o de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Como pode-se observar na Tabela 1, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em variáveis como idade das pacientes, taxa de fertilização e número de embriões transferidos. A idade média das pacientes no grupo A foi de  $33,2 \pm 3,96$  e no grupo B de  $33,0 \pm 4,1$ . As taxas de fertilização nos grupos A e B foram de 81,9% e 84,3% respectivamente e a média de embriões transferidos no grupo A foi de  $4,18 \pm 0,8$ , enquanto no grupo B foram transferidos em média  $4,25 (\pm 0,8)$  embriões.

As causas de esterilidade assim como a análise do sêmen também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos. Analisando as características do sêmen encontramos a concentração média de espermatozoides no grupo A de  $8,1 \pm 8,8$  milhões de espermatozoides por mililitro, enquanto no grupo B a concentração média foi de  $6,9 \pm 5,8$  milhões.

Encontramos diferenças estatisticamente comprovadas entre os grupos quanto aos níveis de estradiol no dia da aplicação do hCG. No grupo A a concentração média de E2 foi de  $2344 \pm 1075$  pg/ml, enquanto no grupo B foi  $2546 \pm 1186$  pg/ml ( $p = 0,04$ ).

Quanto à qualidade dos embriões, no grupo A, 72,8% foram classificados como A (excelente qualidade) enquanto no grupo B, 63,5% dos embriões transferidos foram de qualidade A, estes valores mostram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Também houve diferença estatisticamente significativa quanto aos embriões do tipo B (boa qualidade), no entanto com predomínio no grupo de pacientes que fizeram transferência sem auxílio ultrasonográfico (23,3% de embriões tipo B no grupo A e 34,6% no grupo B) ( $p < 0,05$ ). Se dividíssemos os embriões em 2 grupos (A+ B) e (C) encontraríamos um predomínio estatisticamente significativo

de embriões A e B no grupo de transferência sem auxílio ultra-sonográfico (98,07%) quando comparados ao grupo de transferência com auxílio ultrasonográfico (96,11%), ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliarmos as taxas de implantação, gestação clínica e de bebê em casa encontramos valores significativamente superiores no grupo que realizou a transferência embrionária sob visualização ultra-sonográfica. As taxas de implantação foram respectivamente de 18,5% e 10,2% nos grupos A e B, diferença estatisticamente significativa. As taxas de gravidez clínica foram de 45% no grupo A e 27,35% no grupo B ( $p < 0,0001$ ); ao passo que as taxas de bebê em casa foram de 38% no grupo A e 20,6% no grupo B ( $p < 0,0001$ ).

Quanto às taxas de abortamento, encontramos nos grupos A e B respectivamente 23,1% e 28,3%, valores sem diferenças estatísticas.

## DISCUSSÃO

A transferência embrionária é uma etapa crítica em um ciclo de fertilização *in vitro* e muitos de seus aspectos foram e continuam sendo estudados por diversos autores na literatura mundial. O uso da ultra-sonografia com o objetivo de uma melhor visualização do procedimento de transferência embrionária foi inicialmente relatado em 1985 por Strickler et al. e por Leong et al. (1986). Estes autores sugeriam que existe um benefício no uso da técnica devido à facilidade de visualização do posicionamento do cateter em relação ao fundo uterino assim como a visualização de ejeção da “bolha de transferência”. Posteriormente Hurley et al. (1991) estudando um grupo de 94 pacientes que tiveram suas transferências guiadas por ultra-sonografia e comparando os resultados com um grupo controle de 246 pacientes encontraram uma tendência de melhores resultados no

	GRUPO A transferência com USG n(%)	GRUPO B transferência sem USG n(%)	p
Número de ciclos	271	329	
Idade das pacientes	$33,2 \pm 3,96$	$33,0 \pm 4,1$	ns
Oócitos injetados	$8,5 \pm 3,3$	$6,2 \pm 1,9$	< 0,05
Taxa de fertilização	81,9	84,3	ns
E2 (dia do hCG)	$2344 \pm 1075$	$2546 \pm 1186$	<0,05
Embriões transferidos	$4,18 \pm 0,8$	$4,25 \pm 0,8$	ns
-A(%)	72,8	63,5	<0,05
-B (%)	23,3	34,6	<0,05
-A+B(%)	96,11	98,07	<0,05
-C(%)	3,9	1,6	ns
bhCG+	134(49,4)	97(29,5)	<0,0001
Gravidez clínica	122(45,01)	90(27,35)	<0,0001
Taxa de implantação (%)	18,5	10,2	< 0,0001
Aborto	31(23,1)	26(28,3)	ns
Bebê em casa	103(38,0)	66(20,6)	<0,0001

grupo em que utilizou a ultra-sonografia transvaginal, no entanto sem atingir diferenças estatísticas. Este trabalho de Hurley encontrou benefícios estatisticamente comprovados apenas no subgrupo em que se transferiu apenas um embrião. Wood et al. (2000), avaliaram retrospectivamente a influência do tipo de catéter, e da utilização ou não, da ultra-sonografia durante a transferência embrionária em 518 ciclos de FIV. Relataram uma melhora estatisticamente significativa com a utilização de cateteres flexíveis em relação a cateteres rígidos (taxa de gravidez de 36% e 17% respectivamente). Neste mesmo trabalho relataram melhora significativa na taxa de gravidez (PR) com o uso da USG em relação às transferências sem o uso da USG (PR de 38,4% e 25,4%, respectivamente). Alguns trabalhos prospectivos têm apresentado resultados conflitantes, no entanto a maior parte deles tende a mostrar melhores taxas de sucesso quando se usa a USG para auxiliar a transferência embrionária. Em 1991, Al-Shawaf et al. avaliando prospectivamente os resultados de um grupo de estudo constituído por 44 pacientes que fizeram a transferência guiada por ultra-sonografia com um grupo controle (transferência sem USG) constituído por 27 mulheres, não encontraram diferenças nas taxas de gravidez (29% e 30,3% respectivamente). Kan et al. (1999) avaliando prospectivamente 187 pacientes divididas em 2 grupos (93 com USG e 94 sem USG) encontraram taxas de gravidez de 37,8% no grupo com USG e de 28,9% no grupo sem USG; estas diferenças não foram estatisticamente significativas, mas os autores enfatizam a clara tendência clínica de benefícios com o uso da USG, principalmente em pacientes cuja transferência foi considerada mais difícil. Coroleu et al. (2000) encontraram um claro benefício no uso da USG para a TE. Ao comparar os resultados de 182 pacientes em que foi utilizado a USG com 180 pacientes em que a transferência foi realizada apenas com avaliação clínica, esses autores encontraram uma taxa de gravidez de 50% no grupo com USG e de 33,7% no grupo sem USG, diferenças estatisticamente significativas.

Nossos resultados mostram melhoras significativas nas taxas de implantação, de gravidez clínica e de bebê em casa no grupo em que foi utilizado a USG durante a TE, a mesma tendência encontrada na literatura (Hurley et al., 1991; Al-Shawaf et al. 1991; Coroleu et al., 2000). Em nosso estudo, as características de cada grupo são semelhantes (idade, taxa de fertilização, número de embriões transferidos, tipo de cateter utilizado). Todas as transferências foram realizadas 72 horas após a aspiração oocitária, no entanto algumas variáveis apresentaram diferenças que poderiam contribuir para os melhores resultados encontrados no grupo em que a transferência foi realizada com USG. É o que acontece com o número de embriões A, que é maior no grupo em que foi feita transferência com auxílio ultra-sonográfico e teoricamente este predomínio de embriões do tipo A influenciaria nas diferenças entre as taxas de sucesso. Apesar da diferença estatística ressaltamos que em termos de

números absolutos, foram transferido em média  $3,04 \pm 1,4$  embriões tipo A no grupo de transferência com auxílio do USG, ao passo que no grupo B foram transferidos em média  $2,7 \pm 1,4$  embriões de excelente qualidade, números bastante similares, além disso ressaltamos que apesar de não estatisticamente significativo, há um maior número de embriões transferidos no grupo B ( $4,25 \pm 0,8$ ) em relação ao grupo A ( $4,18 \pm 0,8$ ). Estas diferenças, em nossa opinião, não seriam tão expressivas em relação às taxas de sucesso.

As possíveis causas da melhora nas taxas de gravidez e de implantação quando se realiza a transferência embrionária com auxílio ultra-sonográfico permanecem um assunto controverso. Esses resultados possivelmente são decorrentes da possibilidade de visualização do local onde os embriões serão colocados, assim como a menor chance de lesões endometriais quando se faz a transferência guiada pela USG. Woolcott et al. (1997) avaliaram 121 transferências consecutivas em que o posicionamento do cateter foi feito inicialmente sem o uso da USG. Posteriormente, checaram com USG transvaginal, relatando que a impressão do posicionamento do cateter é irreal, podendo este estar localizado em contato com o fundo uterino, dentro da tuba ou mesmo subendometrial.

Um estudo prospectivo com um número grande de pacientes seria ideal. No entanto, com os diversos estudos encontrados na literatura mostrando os melhores resultados com a utilização da USG para auxiliar as transferências, associado aos resultados encontrados neste estudo que apesar de retrospectivo abrangeu um grande número de ciclos (600), nos permitem afirmar os reais benefícios da utilização desta técnica para facilitar as transferências embrionárias.

Portanto, graças às mais altas taxas de implantação e de gravidez encontradas no grupo em que se utilizou a USG, associadas à facilidade e inocuidade da técnica, sugerimos o uso rotineiro do USG durante a transferência embrionária.

## RESUMO

Os efeitos do uso da ultra-sonografia (USG) durante a transferência embrionária (TE) sobre as taxas de gravidez foram avaliados através de um levantamento retrospectivo de 600 ciclos consecutivos de ICSI. No período de 01/01/1998 a 31/01/2000, 271 ciclos foram realizados com TE assistida por USG (grupo A) e comparados a 329 ciclos cuja TE foi realizada sem auxílio ultra-sonográfico (grupo B). Não houve diferenças estatisticamente significativas em variáveis como idade, causa da esterilidade, taxa de fertilização e número de embriões transferidos. Entretanto as taxas de implantação e de gravidez clínica foram significativamente maiores no grupo A (18,5% e 45% respectivamente) quando comparadas com as encontradas no grupo B (10,2% e 27,4% respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). Portanto o uso da ultra-sonografia durante a transferência embrionária é reco-

mendado pois melhora as taxas de implantação e de gravidez num programa de fertilização *in vitro*.

**Unitermos:** fertilização *in vitro*, transferência de embriões, ultrasonografia

### REFERÊNCIAS

Abdelmassih R., Solfa S., Moretto M., Acosta A. A. - Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injections. *Fertil. Steril.*, 65:573-577, 1996.

Al-Shawaf T., Dave R., Harper J. - Transfer of embryos into the uterus: how much do technical factors affect pregnancy rates? *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10: 31-36, 1991.

Coroleu B., Carreras O., Veiga A., Mantell A., Martinez F., Belil I., Hereter L. & Barri P. N. - Embryo Transfer under ultrasound improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 12: 616-620, 2000.

Hurley V. A., Osborns J. C., Leoni M. A. & Leeton J. - Ultrasound guided embryo transfer: a controlled trial. *Fertil. Steril.*, 55: 1259-1261, 1991.

Kan A. K. S., Abdalla H. I., Gaffar A. H., et al. - Embryo transfer: ultrasound guided versus clinical touch. *Hum. Reprod.*, 14: 1259-1261, 1999.

Leong ., Leung C., Tucker M. - Ultrasound-assisted embryo transfer. *J.Int.In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 3: 383-385, 1986.

Palermo G., Jorris H., Devroy P & Van Steinghem A. V. M. - Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340: 17-18, 1992.

Steptoe P & Edwards R. - Birth after the implantation of a human embryo. *Lancet*, 7: 336,1978.

Strickler R. C., Christianson C., Crane J. P. - Ultrasound guidance for liuman embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 43: 54-61, 1985.

Veeck L. L. - Atlas of the human oocyte and early conceptus. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991.

Wood E. G., Batzer F. R., Go K. J., Gutmann N. & Corson S. L. - Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*,15:107112, 2000.

Woolcott R., Stranger J. - Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 12: 963-966, 1997.

# Extração de espermatozóide testicular (TESE) em síndrome de "somente células de sertoli"

## Testicular sperm extraction on sertoli cell only

**Mourthé-Filho A.,<sup>1,2</sup> Faria A.R.L.,<sup>1</sup>  
Melo U.B.,<sup>1,2</sup> Taitson RE<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup> I.R.H. - Instituto de Reprodução Humana de BH/MG  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da PUC/MG*

*Correspondência para:*

*Antônio Mourthé Filho  
Rua dos Otoni 705/203 - Belo Horizonte - Minas Gerais  
CEP 30.150-270 - Brasil  
E-mail: uroandrologia@bol.com.br*

### ABSTRACT

*Testicular sperm extraction (TESE) has been reinvestigated in 42 cases with a view to offering patients who had Sertoli Cell Only further chances of collection of gametes.*

**Key Words:** TESE, Sertoli cell only, Testis/anatomy, sperm banking.

### INTRODUÇÃO

Casos de azoospermia, estão presentes na ordem de 1% a 2% da população masculina, sendo observada em torno de 15% a 20% em homens inférteis. Sua etiologia é variada, estando o caráter não obstrutivo presente em boa parte dos casos. O estabelecimento desta condição é determinada pela ausência de espermatozóides no ejaculado e integridade da via espermática. Fatores congênitos e adquiridos representam importante parcela neste contexto (Mourthé-Filho et al., 1999). Com o advento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), ocorreu uma mudança considerável na definição do quadro de infertilidade masculina. A viabilidade de espermatozóides imóveis, a utilização de espermátides alongadas e redondas, redefiniram a necessidade de maior investigação do ambiente testicular. Por outro lado, a utilização do hormônio folículo estimulante (FSH) como indicador ou não da espermatogênese tem sido hoje questionada. (RonEl et al., 1997).

A técnica de extração de espermatozóides do testículo (TESE) e ICSI foi introduzida em nosso meio no ano de 1993 em paciente com azoospermia obstrutiva (Schoysman et al., 1993).

Mais tarde, acreditou-se todavia, em melhor indicação para pacientes com azoospermia não-obstrutiva (Devroey et al., 1995). Em 60% dos casos relatados, indivíduos submetidos a técnica de TESE com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva apresentavam espermatozóides ou mesmo espermátides (Silber et al., 1997).

A síndrome de "somente células de Sertoli" é um achado não usual, com incidência de destaque entre as azoospermias não obstrutivas. O seu diagnóstico é determinado através de biópsia testicular e estudo anatomopatológico circunstanciado (Schulze, 1984). Sua descrição é restrita para casos onde biópsias de testículo apresentam células de Sertoli somente. Os túbulos são preenchidos por estreitas células de Sertoli de aparência, muitas vezes, uniforme. Seu núcleo é mais alongado que o usual, mas são quase normalmente lobulados. São visualizadas condensações de cromatina e nucléolo de tamanho alterado. Como existe ausência de células germinativas, o citoplasma apical das células adjacentes mostra intensa interdigitações (Castillo et al., 1947).

O objetivo do trabalho é demonstrar a necessidade de se investigar através da técnica de TESE, a presença de espermatozóides em indivíduos submetidos a biópsia testicular com diagnóstico de síndrome de "somente células de Sertoli" e FSH elevado.

## MATERIAL E MÉTODO

Quarenta e dois pacientes com idade de 30-52 anos apresentando história progressiva da síndrome de “somente células de Sertoli” e nível de (FSH) acima dos níveis normais foram submetidos a técnica de TESE no período de 1998 a 2000. A propedêutica masculina mostrou testículos levemente reduzidos na maioria dos casos. A análise seminal realizada de acordo com os critérios da OMS, indicou azoospermia no ejaculado. Assim, os indivíduos realizaram biópsia testicular (Mullhall et al., 1997) para avaliação anatomopatológica e estudo do fragmento no laboratório de criobiologia/espermatologia do I.R.H. - Instituto de Reprodução Humana de Belo Horizonte. Para tal, a cirurgia a céu aberto foi realizada em instância ambulatorial, com bloqueio anestésico local, utilizando xilocaína 1% sem vasoconstrictor. Uma vez realizada a incisão, de 1 a 2 cm em plano transversal na pele até a túnica vaginal, valorizou-se as características morfológicas dos envoltórios testiculares evitando traumas e manipulações indesejadas. A retirada do fragmento foi realizada de forma cautelosa no intuito de minimizar os efeitos adversos que podem ocorrer, como hematomas e inflamação tecidual (Schlegel et al., 1996). Seis fragmentos (três de cada testículo) foram obtidos. Um fragmento de cada lado foi fixado em solução de Bouin e corado em hematoxilina e eosina (Sigma, Br) para estudo anatomopatológico. Usualmente são analisados 20 túbulos seminíferos em cada secção. Todas as etapas da espermatogênese, quando presentes, são contadas desde espermatogônias tronco até espermatozoides (Taitson, 2000). Os quatro fragmentos restantes foram incubados em meio de cultura (HTF, Irvine Scientific, USA) visando rastreamento de células da linhagem espermatogênica. Assim, os fragmentos foram submetidos a processo de estiramento tubular em estereomicroscópio ao aumento de 40x (D.F Vasconcelos, BR) tomando-se o cuidado de manter o fragmento sempre irrigado com meio de cultura. A análise microscópica foi realizada ao aumento de 400x (Nikon Microscope, Japan). Na ausência de espermatozoides e/ou espermátides progrediu-se mais interiormente a retirada do tecido em direção ao mediastino testicular. Finalizando o procedimento, a albugínea e os demais envoltórios do testículo foram suturados com categate 4-0 simples agulhado.

## RESULTADOS

Os resultados são mostrados na Tabela I. Em 06 pacientes (14,2%) dos 42 foram observados espermatozoides e/ou espermátides. O relato anatomopatológico indicou padrão histológico semelhante na maioria dos fragmentos estudados: túbulos seminíferos com diâmetro variado e heterogeneidade do parênquima, revestidos somente por células de Sertoli. O interstício e as células de Leydig não apresentavam alterações.

**Tabela I.** Parâmetros encontrados em TESE positiva em paciente com síndrome de “somente células de Sertoli”.

n	número de espermatozoides (média±d.p)	número de espermátides (média±d.p)	FSH (U/L)
6	8,16±4,4	7,6±4,7	1,6±15,1

n= número de casos positivos.

## DISCUSSÃO

A busca de técnicas para obtenção de células da linhagem espermatogênica com o intuito de fertilizar óvulos não é recente (Takahara, 1998). Assim sendo, paciente com relatos de ausência de espermatozoides no ejaculado podem, às vezes, apresentar espermatogênese em pequenas áreas do testículo, o que possibilita a utilização destas células na injeção intracitoplasmática de espermatozoides (Craft et al., 1993).

O diagnóstico de azoospermia não-obstrutiva envolve exame físico, onde se enfatiza o conteúdo palpável da bolsa testicular e volume do testículo, pelo menos dois espermogramas com intervalo de 15 dias, e dosagens hormonais como o nível de FSH. Após a constatação da azoospermia no ejaculado, deve-se esclarecer ao paciente a necessidade de realização de técnicas invasivas na bolsa testicular, como a aspiração percutânea de espermatozoides no testículo (TESA) e/ou mesmo TESE (Harrington et al., 1996).

Em 1995, Tournaye e colaboradores, dividiram a azoospermia em dois subgrupos, absoluta e virtual. A azoospermia absoluta é definida pela ausência de espermatozoides em todo o ejaculado estudado, incluindo o *pellet* após centrifugação. No caso da azoospermia virtual o ejaculado, ocasionalmente, apresenta poucos espermatozoides. Neste caso, os espermatozoides, muitas vezes, não são encontrados quando efetivamente requisitados, ou seja, no dia da fertilização assistida.

Observou-se correlação negativa entre TESE e FSH elevado. O nível FSH acima do normal não indica ausência de espermatozoides e/ou espermátides no testículo. A correlação entre morfologia da célula de Sertoli e FSH elevado é difícil e incerta (De Kretser et al., 1981). Durante a avaliação anatomopatológica do fragmento, são notadas diferenças entre as amostras dos testículos direito e esquerdo em todos os pacientes. Desta forma, acreditamos que um único fragmento isolado para estudo, ou mesmo para diagnóstico, não representa a distribuição exata da morfologia de todo o testículo já que o parênquima testicular não é uniforme (Clermont, 1972; Helber & Clermont, 1964).

A ausência de espermatogênese em alguns pacientes desta natureza, suporta o diagnóstico de Síndrome de “somente células de Sertoli”. O típico critério de prognóstico ruim da produção espermática, baseado no nível de FSH elevado e volume testicular reduzido tem

sido questionado. De outra forma, um único fragmento de testículo é inadequado para detectar a ausência de espermatozóides em relatos de azoospermia não-obstrutiva (Nistal et al., 1990).

Um paciente com síndrome de “somente células de Sertoli”, pode algumas vezes como descrito neste trabalho, apresentar espermatogênese em uma pequena área focal, mesmo com o FSH elevado. A aparente ausência de espermatogênese na maioria destas áreas focais pode ser por um defeito parcial ou incompleto da fisiologia testicular (Silber et al., 1997). Estas áreas focais de produção espermática estão claramente presentes em alguns homens com azoospermia não-obstrutiva, propiciando indicações de TESE e (ICSI) injeção intracitoplasmática de espermatozóides (Schlegel et al., 1997). A intervenção bilateral é válida, porque nem sempre o padrão histológico de um lado reflete o padrão do outro lado (Ostad et al., 1998.) A habilidade de se encontrar espermatozóides está dependente do nível de produção espermática do paciente submetido a TESE e a rotina do especialista que promove rastreamento em busca das células da linhagem espermatogênica (Novero et al., 1997).

Os autores concluem que a técnica de TESE visando o recrutamento de gametas, deve se pautar pela exaustão na avaliação do fragmento obtido, pois, mesmo com a definição do quadro acima, é possível encontrar células da linhagem espermatogênica. Por outro lado, em muitos destes casos, deve-se discutir com o casal a possibilidade de utilização do banco de sêmen como salvo conduto ao ICSI indicado.

### RESUMO

A técnica de extração de espermatozóides do testículo (TESE) é reinvestigada em 42 pacientes com nova visão para pacientes que têm síndrome de “somente células de Sertoli possibilitando novas chances de coleta de gametas.

**Unitermos:** TESE, síndrome de “somente células de Sertoli.

### REFERÊNCIAS

Schulze C.. - Sertoli cells and Leydig cells in man. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 88: 1-104, 1984.

Castillo E. B., Tralencco A., Balze, F. A. - Syndrome produced by absence of the germinal epithelium without impairment of the Sertoli or Leydig cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 7: 493-502, 1947.

Clermont Y.. - Kinetics of spermatogenesis in mammals; seminiferous epithelium cycles and spermatogonial renewal. *Phys. Ver.*, 52: 198-236, 1972.

Craft L, Bennett V., Nicholson N., Goossens A., Tournaye H., Camus M.. - Fertilizing ability of testicular spermatozoa. [letter] *Lancet*, 342: 864, 1993.

De Kretser D. M., Kerr J. B. Paulsen C. A.. - Evaluation of the

ultrastructural changes in the human Sertoli cell in testicular disorders and the relationship of the changes to the levels of serum FSH. *Int. J. Androl.*, 4: 129-144, 1981.

Silber S. J., Nagy Z., Devroey P., Tournaye E. H., Van Steirteghem A. C.. - Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure. *Human Reprod.*, 12: 2422-2428, 1997.

Schoyman R., Vanderzwalmen P., Nijs M. et al.. - Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*, 342: 1237, 1993.

Taitson P. E. - Criopreservação de espermatozóides. - Aspectos técnicos. II Simpósio Pró-criar/ Mater Dei de Reprodução Assistida. Belo Horizonte: Hospital Mater Dei, 2000.

Takahara H.. - The treatment of obstructive azoospermia in male infertility - past, present, and future. *Urology*. 51 (5A suppl): 150-155, 1998.

Devroey P., Liu J., Nagy Z., et al.. - Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in nonobstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 10: 1457-1460, 1995.

Tournaye H., Camus M., Goossens A.. - Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 10(suppl. 1): 115-119, 1995.

Harrington T. G., Schauer D., Gilbert B. R.. - Percutaneous testis biopsy: An alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J. Urol.*, 156: 1647-1651, 1996.

Helber C. G., Clermont Y - Kinetics of the germinal epithelium in man. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 20: 545-575, 1964.

Mourthé-Filho A., Faria A. R. L., Melo U. B., Taitson P. E. - Extração de espermatozóide testicular (TESE) em azoospermia não-obstrutiva: Aspectos urológico e anatômico. *Rev. Med. Minas Gerais*, 9:66-69, 1999.

Mulhall J. P., Burgess C. M., Cunningham D., Carson R., Harris D., Oates R. D.. - Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: Prevalence and predictive factors. *Urology*. 49: 91-96, 1997.

Nistal M., Jimenez F., Paniagua R.. - Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology. *Histopathol.*, 16: 173-180, 1990.

Novero V., Camus M., Tournaye H., Smitz J., Verheyen G., Joris H.. - Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12: 59-63, 1997.

Ostad M., Liotta D., Ye Z., Schlegel P. N.. - Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia. Results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion. *Urology*. 52 692-696, 1998.

Ron-El R., Strasburger D., Friedler S., Komarovski D., Bern O., Soffer Y., Raziel A.. - Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 12: 1222-1226, 1997.

Schlegel P. N.. - Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Hum. Reprod.*, 11 (Abstr. Book 1): 74, Abstr. 159, 1996.

Schlegel P. N., Palermo G. D., Goldstein M., Menendez S., Zaninovic N., Veeck L. L., Rosenwaks Z.. - Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for nonobstructive azoospermia. *Urology*. 49: 435-440, 1997.

# Comparação entre Ciclos de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) em Pacientes com Fator Ovulatório Normal e com Síndrome dos Ovários Policísticos

## Comparison of ICSI Cycles in Normo-ovulatory Patients and in Polycystic Ovarian Syndrome Patients

**Mario Cavagna, Larissa Fontes, Dirceu Mendes-Pereira, Litsuko Shimabukuro, Edir Catafesta, Moacir Netto Ladeira**

*Divisão de Reprodução Humana, Hospital Pérola Byington e PROFERT – Programa de Reprodução Assistida, São Paulo. Correspondência para: Mario Cavagna, Rua Viradouro, 58/111, 04538-110 – São Paulo/SP – Brasil*

### ABSTRACT

#### OBJECTIVE

*The aim of this study was to compare the treatment outcome in patients with and without polycystic ovary syndrome undergoing ICSI cycles.*

#### PATIENTS AND METHODS

*We studied retrospectively 33 controlled ovarian stimulation cycles for ICSI in 19 normo-ovulatory women and 25 cycles in 13 women with PCOS. The main outcome measures evaluated were: cancellation of the cycles, number of aspirated follicles and percentage of oocyte recovery, oocyte maturity, fertilization rate, pregnancy and implantation rates, and clinical abortion rate. Fischer's test was used for differences between normo-ovulatory and PCOS patients and the limit of significance was set at  $p < 0.05$ .*

#### RESULTS

PCOS patients showed a higher cancellation rate of controlled ovarian stimulation cycles (20.0% versus 9.0%,  $p = 0.21$ ). The mean number of follicles was

higher in patients with PCOS (16.5 versus 10.2), but these patients showed a lower oocyte recovery percentage (55.9% versus 71.8%,  $p < 0.001$ ) when compared to normo-ovulatory patients undergoing ICSI. Oocyte maturity (group A: 85.9%; group B: 83.7%), fertilization rate (group A: 88.8%; group B: 86.4%), pregnancy and implantation rates (group A: 27.2% and 14.8%; group B: 20.0% and 11.8%) did not differ significantly in the two groups. In group A there was one miscarriage in 9 clinical pregnancies (11.1%) and in group B there were 2 miscarriages in 5 clinical pregnancies (40.0%) ( $p = 0.27$ ).

#### CONCLUSIONS

The findings of this study suggest that pregnancy and implantation rates are not different in normo-ovulatory women and PCOS patients undergoing ICSI, but the higher clinical abortion rate gives evidence that deleterious factors not connected to oocyte morphology may be present in PCOS patients.

**Key words:** Polycystic ovary syndrome, ICSI, ovulation induction

#### INTRODUÇÃO

*A síndrome dos ovários policísticos (SOP) é a endocrinopatia mais comum entre as mulheres, caracterizada clinicamente por anovulação crônica e hiperandrogenis-*

mo; essa anomalia afeta de 6 a 10% das mulheres em idade reprodutiva (Knochenhauer et al., 1998). Atualmente, sabe-se que a morfologia policística dos ovários pode estar presente em mulheres que possuem ciclos menstruais regulares e não apresentam sinais de hiperandrogenismo (Michelmores et al., 1999). De acordo com Adams et al. (1986), a morfologia dos ovários policísticos, observada à ultra-sonografia, é caracterizada por 10 ou mais folículos  $\geq$  10 mm na periferia dos ovários, com estroma aumentado e hiperecogênico. Essa morfologia, quando associada a alterações menstruais, como a oligomenorréia, e/ou sinais e sintomas clínicos de hiperandrogenismo, define a SOP (Grigorescu, 1998; Belosi et al., 2004).

O presente trabalho tem como objetivo comparar os resultados de ciclos de estimulação ovariana controlada para ICSI em pacientes com função ovulatória normal e com SOP.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudadas, retrospectivamente, 32 pacientes submetidas a ciclos de fertilização assistida com ICSI, por fator masculino, na Clínica Profert – Programa de Reprodução Assistida, em São Paulo. As pacientes foram divididas em dois grupos: 19 delas, que apresentavam fator ovulatório normal, caracterizado por ciclos eumenorréicos e dosagens basais de FSH dentro dos limites da normalidade, foram alocadas no grupo A; 13 pacientes com diagnóstico de síndrome dos ovários policísticos constituíram o grupo B. As características necessárias para inclusão no grupo B foram a textura policística dos ovários observada por ultra-sonografia transvaginal, associada a irregularidade no ciclo menstrual, como espaniomenorréia ou amenorréia. Foram avaliados 33 e 25 ciclos de fertilização assistida, nos grupos A e B, respectivamente. A idade das pacientes do grupo A variou de 28 a 39 anos (média: 34,8), e do grupo B de 27 a 37 anos (média: 32,3). Em todos os casos, a estimulação ovariana controlada foi realizada com o esquema longo, utilizando-se um análogo agonista do GnRH, o acetato de leuprolida, na fase lútea do ciclo precedente e iniciando-se a estimulação, após o bloqueio, com 300 UI de FSH recombinante (Gonal-F®, Serono, Brasil), reduzindo-se a dosagem do agonista pela metade. A partir do quinto dia de estímulo, substituiu-se o FSH recombinante por hMG (Menogon®, Ferring, Brasil) e a dosagem foi ajustada de acordo com a resposta observada à ultra-sonografia. Administraram-se 10.000 UI de hCG (Profasi®, Serono, Brasil), com a visualização ecográfica de folículos com diâmetro  $\geq$  18mm, sendo a coleta oocitária programada para 35-36 horas depois. A suplementação da fase lútea foi realizada através da administração diária, por via intravaginal, de 600 mg de progesterona micronizada (Utrogestan®, Enila, Brasil).

Os dois grupos foram comparados através dos seguintes parâmetros:

1. Taxa de cancelamento dos ciclos;
2. Número de folículos punccionados;
3. Taxa de recuperação oocitária;
4. Maturidade oocitária (oócitos em metáfase II);
5. Taxa de fertilização;
6. Taxas de gravidez e implantação;
7. Taxa de abortamento.

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente através dos testes exato de Fischer e do qui quadrado, e o limite de significância atribuído foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

No grupo A três ciclos foram cancelados (9,09%), e no grupo B houve o cancelamento de cinco ciclos (20%) ( $p = 0,21$ ). A média de folículos aspirados foi maior no grupo B (16,5 por ciclo) do que no A (10,2 por ciclo), mas a taxa de recuperação oocitária foi maior no grupo A (71,8 contra 55,9%), o que constitui diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os dois grupos no que se refere a maturidade dos oócitos (grupo A: 85,9%; grupo B: 83,7%), taxa de fertilização (grupo A: 88,8%; grupo B: 86,47%) e taxas de gravidez e implantação (grupo A: 27,2 e 14,8%; grupo B: 20,0 e 11,8%). No grupo A verificou-se um abortamento em nove gestações clínicas (11,1%), e no grupo B houve dois abortamentos em cinco gestações clínicas (40,0%) ( $p = 0,27$ ).

Os resultados obtidos encontram-se sintetizados na Tabela I.

## DISCUSSÃO

O processo de estimulação ovariana controlada em mulheres com SOP pode apresentar dificuldades, havendo uma maior taxa de cancelamento de ciclos devida à iminência ou ocorrência de síndrome do hiperestímulo ovariano (Dale et al., 1991; MacDougall et al., 1993; Buyalos & Lee, 1996). Alguns estudos mostram que o número de folículos desenvolvidos e de oócitos obtidos por ciclo de indução é maior em pacientes com SOP do que em pacientes com infertilidade de causa tubária, e que a taxa de fertilização é menor no primeiro grupo; porém, as taxas de gravidez por transferência embrionária não parecem ser diferentes (Urman et al., 1992; Homburg et al., 1993; MacDougall et al., 1993). Kodama et al. (1995) relataram alta incidência de cancelamento de transferência de embriões, devido a falha tanto na recuperação oocitária quanto na fertilização em pacientes com SOP, sugerindo que esse fenômeno possa ser devido à baixa qualidade dos gametas dessas mulheres; outras referências, porém, não mostram diferenças na incidência de anomalias cromossômicas ou imaturidade oocitária, comparando-se oócitos não fertilizados de pacientes com SOP e com ovários normais (Sengoku et al., 1997).



Em nosso estudo, a maior taxa de cancelamento nos ciclos de EOC em mulheres com SOP deveu-se, predominantemente, ao risco da síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO). Nas mulheres normo-ovulatórias, os três ciclos cancelados foram por má resposta ovariana, enquanto nas mulheres com SOP, dos cinco ciclos cancelados apenas um foi por má resposta e quatro por risco de SHO, determinado por desenvolvimento de excessivo número de folículos e concentrações de estradiol superiores a 4.000 pg/ml. As pacientes com SOP são de risco elevado para SHO, fazendo que a indução ovulatória nessas pacientes requeira cuidados especiais. Apesar de haver desenvolvimento de maior número de folículos em pacientes com SOP, a recuperação de oócitos por folículo aspirado é melhor nas pacientes normo-ovulatórias, sugerindo uma foliculogênese alterada nas mulheres com SOP.

Em nossa investigação, a taxa de gravidez aponta para uma tendência de melhores resultados em pacientes normo-ovulatórias, embora a diferença não tenha mostrado significância estatística, o que deveria acontecer em uma amostragem mais ampla. Nossos resultados apresentam uma maior taxa de abortamento em pacientes com SOP; ainda aqui, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, ela o é clinicamente; o resultado do teste estatístico é consequência da pequena amostra avaliada.

Esses achados concordam com outros relatos, que mostram maior incidência de abortamento após tratamento com técnicas de reprodução assistida (TRA) em

pacientes com SOP (Balen et al., 1993; Tarlatzis et al., 1995; Grochowski et al., 1997). Wang et al. (2001) relatam que esse fato pode ser devido à obesidade que freqüentemente acompanha as mulheres com SOP. Atualmente, há uma tendência na utilização de agentes sensibilizadores da insulina, como a metformina, no tratamento das mulheres com SOP (Nestler et al., 2000; Tau-chert et al., 2003). Devem ser avaliados os resultados de ciclos de TRA em pacientes com SOP em terapia com tais agentes, para que se verifique se as taxas de abortamento tendem a se aproximar daquelas das mulheres normo-ovulatórias.

Em nosso grupo de pacientes, a taxa de abortamento espontâneo faz que o resultado final (“bebê em casa”) seja significativamente mais pobre em mulheres com SOP. Ao levarmos em consideração os abortamentos, temos um percentual de 24,2% de “bebê em casa” nas mulheres normo-ovulatórias; nas pacientes com SOP, essa taxa cai para 12%. Embora a morfologia e a maturidade oocitárias não sejam diferentes entre os dois grupos, possivelmente haja fatores deletérios nos oócitos das mulheres com SOP não relacionados aos aspectos puramente morfológicos.

A SOP ainda permanece uma endocrinopatia sobre a qual pairam muitas controvérsias. Quando as portadoras da síndrome são submetidas a TRA, como observamos em nossa casuística com indicação para ICSI por fator masculino, os resultados podem não ser tão satisfatórios como em mulheres normo-ovulatórias, principalmente pela ocorrência de maiores taxas de cancelamento dos

Tabela I  
Comparação entre os Grupos A e B

Grupo	A	B
Nº de pacientes	19	14
Nº de ciclos	33	25
Ciclos cancelados	3 (9,09%)	5 (25%) (ns)
Folículos aspirados	306	363
Média de folículos por ciclo	10,2	16,5 (s)
Oócitos obtidos	220	203
Recuperação oocitária	71,8%	55,9% (s)
Oócitos em MII	189 (85,9%)	170 (83,7%) (ns)
Taxa de fertilização	168/189 (88,8%)	147/170 (86,4%) (ns)
Embriões transferidos	94 (2,84 por ciclo)	59 (2,36 por ciclo)
Taxa de gravidez	9/33 (27,2%)	5/25 (20,0%) (ns)
Taxa de implantação	14/94 (14,8%)	7/59 (11,8%) (ns)
Abortamento	1 (11,1%)	2 (40,0%) (ns)

(s): diferença estatisticamente significativa.  
(ns): diferença não estatisticamente significativa.

*ciclos de estimulação ovariana e de abortamento; tais fatos se refletem em um menor percentual de mulheres que levam uma gestação ao termo após tratamento com TRA. A maior taxa de abortamento em pacientes com SOP pode refletir anomalias oocitárias não relacionadas a aspectos puramente morfológicos.*

## RESUMO

### OBJETIVO

*Comparar os resultados obtidos em pacientes com função ovulatória normal e com SOP submetidas a ciclos de ICSI.*

### MATERIAL E MÉTODOS

*Foram estudados, respectivamente, 33 e 25 ciclos de estimulação ovariana controlada para ICSI em pacientes com função ovulatória normal e com SOP, avaliando-se recuperação oocitária, maturidade dos oócitos e taxas de fertilização, gravidez e abortamento. As diferenças foram avaliadas pelo teste exato de Fischer, e o limite de significância atribuído foi  $p < 0,05$ .*

### RESULTADOS

*No grupo A, três ciclos foram cancelados (9,09%) e no grupo B houve o cancelamento de cinco ciclos (20%) ( $p = 0,21$ ). A média de folículos aspirados foi de 16,5 no grupo B e 10,2 no grupo A; entretanto, a taxa de recuperação oocitária foi maior no grupo A (71,8%, contra 55,9%,  $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os dois grupos no que se refere a maturidade dos oócitos (grupo A: 85,9%; grupo B: 83,7%), taxa de fertilização (grupo A: 88,8%; grupo B: 86,47%) e taxas de gravidez e implantação (grupo A: 27,2 e 14,8%; grupo B: 20,0 e 11,8%). No grupo A, verificou-se um abortamento em nove gestações clínicas (11,1%), e no grupo B houve dois abortamentos em cinco gestações clínicas (40,0%) ( $p = 0,27$ ).*

### CONCLUSÕES

*Os ciclos de estimulação ovariana para ICSI, em termos de taxas de gravidez e implantação, não parecem ser mais eficientes em mulheres normo-ovulatórias, mas a maior taxa de abortamento em pacientes com SOP pode refletir anomalias oocitárias não relacionadas a aspectos puramente morfológicos.*

**Unitermos:** Síndrome dos ovários policísticos, ICSI, indução da ovulação

### REFERÊNCIAS

1. Adams J., Polson D. W., Franks S. – Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br. Med. J.*, 193:355-359, 1986.
2. Balen A. H., Tan S. L., MacDougall J., Jacobs H. S. – Miscarriage rates following in vitro-fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization

- with buserelin. *Hum. Reprod.*, 8:959-964, 1993.
3. Belosi G., Giuliani M., Suriano R. *et al.* – Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.*, 56:7-13, 2004.
4. Buyalos R. P., Lee C. T. – Polycystic ovary syndrome: pathophysiology and outcome with in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 65:1-10, 1996.
5. Dale P. O., Tanbo T., Abyholm T. – In-vitro fertilization in infertile women with the polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.*, 6:238-41, 1991.
6. Grigorescu A. – PCO: What is it? How is it diagnosed? In: *Proceedings of the XVI Congress on Fertility and Sterility*. Amsterdam: Elsevier Science, 283-292, 1998.
7. Grochowski D., Kulikowski M., Wolczynski S., Kuczynski W., Szamatowicz M. – The outcome of an in vitro fertilization program in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.*, 11:259-262, 1997.
8. Homburg R., Berkowitz D., Levy T., Feldberg D., Ashkenazi J., Ben-Rafael Z. – In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, 60:858-63, 1993.
9. Knochenhauer E. S., Key T. J., Kahsar-Miller M. *et al.* – Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 3078-3082, 1998.
10. Kodama H., Fukuda J., Karube H., Matsui T., Shimizu Y., Tanaka T. – High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.*, 10:1962-7, 1995.
11. MacDougall M. J., Tan S. L., Balen A., Jacobs H. S. – A controlled study comparing patients with and without polycystic ovaries undergoing in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 8:233-237, 1993.
12. Michelmore K. F., Balen A. H., Dunger D. B., Vessey M. P. – Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. *Clin. Endocrinol.*, 51:779-786, 1999.
13. Nestler J. E., Jakubowicz D. J., Luorno M. J. – Role of inositol phosphoglycan mediators of insulin action in the polycystic ovary syndrome. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 13:1295-1298, 2000.
14. Sengoku K., Tamate K., Takuma N. *et al.* – The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.*, 12:474-477, 1997.
15. Tarlatzis B. C., Grimbizis G., Pournaropoulos F. *et al.* – The prognostic value of basal luteinizing hormone: follicle-stimulating hormone ratio in the treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by assisted reproduction techniques. *Hum. Reprod.*, 10:2545-2549, 1995.
16. Tauchert S., Schroder A. K., Ortmann S. *et al.* – The use of oral antidiabetic drugs in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Zentralbl. Gynakol.*, 125:507-514, 2003.
17. Urman B., Fluker M. R., Yuen B. H., Fleige-Zahradka B. G., Zouves C. G., Moon Y. S. – The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil. Steril.*, 57:1269-73, 1992.
18. Wang X. W., Davies M. J., Norman R. J. – Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment. *Hum. Reprod.*, 16:2606-2609, 2001.

# Maturação *in Vitro* de Oócitos Provenientes de Ciclos Estimulados para Tratamento com Técnica de Reprodução Assistida

## In Vitro Maturation of Oocytes Retrieved After Superovulation in Assisted Reproduction Treatment Cycles

**Bossi, Renata; Sales, Liana; Ventura, Bernadete; Sampaio, Marcos; Geber, Selmo**

ORIGEN – Centro de Medicina Reprodutiva  
Belo Horizonte – Minas Gerais – Brasil

Correspondência para:  
Av. Contorno, 7747 - Lourdes  
CEP 30010-020 - Belo Horizonte/MG  
Tel: (31) 3292-6363  
E-mail: [origen@origen.com.br](mailto:origen@origen.com.br)

### ABSTRACT

Although superovulation protocols have been used in assisted reproduction treatment for many years many oocytes are still being retrieved at GV stage and therefore are not suitable to use for insemination purposes. The possibility to mature the GV oocytes *in vitro* offers the opportunity to increase the number of oocytes suitable to be inseminated and consequently might increase the number of embryos to be transferred or frozen. Also, it might reduce the treatment cost. The aim of our study was to evaluate the incidence of *in vitro* maturation of oocytes in a culture medium without hormonal supplementation, within 24 and 48 hours after retrieval.

A total of 44 patients submitted to IVF that donated their immature oocytes for research were included in the study. All patients had the same superovulation protocol. Once the follicles reach the size of 17 mm, 10.000 IU of hCG was administered to induce maturation. Oocyte retrieval was performed ~ 34hs later. The GV stage oocytes were placed in 20 µL droplets of hormone free culture media. After 24 hours, oocytes were analyzed and those who presented polar body were considered mature. The remainders were placed in fresh droplets of

the same culture media. After more 24 hours oocytes were reanalyzed.

A total of 134 GV stage oocytes were included in our study. After 24 hours, 57.5% of the oocytes were at metaphase II and after 48 hours 63.4% of all GV stage oocytes did reach metaphase II stage. The comparison between the two periods of time did not show statistical significance ( $p = 0.16$ ), demonstrating that the further 24 hours culture did not increase the maturation rate.

Our study demonstrates that *in vitro* oocyte maturation in a hormone free culture media is a feasible procedure. Also, we did observe that extending the maturation time does not increase the maturation rate.

**Key words:** oocyte maturation/culture medium/germinal vesicle.

### INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (TRA) vêm sendo utilizadas como uma excelente alternativa para o tratamento da infertilidade conjugal há mais de 25 anos (Edwards, 2003). Um dos mais importantes passos é obter oócitos em estágio de metáfase II (MII), de forma a se poder utilizá-los para a fertilização assistida e, pos-

teriormente, obter os embriões a serem transferidos para o útero materno. Mais ainda, quanto maior o aproveitamento, maior a quantidade de embriões disponíveis para a transferência.

Para que este objetivo seja alcançado, administra-se a gonadotrofina coriônica humana (hCG) aproximadamente 36 horas antes da aspiração folicular, de modo a induzir a retomada da meiose oocitária (Valle et al., 2002). Apesar do uso rotineiro, nem sempre o efeito observado sobre os oócitos é o mesmo. Segundo Trounson et al., (2001), 5 a 7% dos oócitos aspirados de mulheres com a superovulação para FIV são imaturos, isto é, em estágio de vesícula germinal (VG). Cha e Chian (1998) observaram que 10 a 15% dos oócitos encontravam-se no estágio de vesícula germinal após aspiração folicular.

O real motivo pelo qual estes oócitos não completam a maturação nuclear ainda não é completamente conhecido, mas especula-se que os respectivos folículos podem ser resistentes ou menos suscetíveis à estimulação hormonal (Farhi et al., 1997), podem ser atrésicos (Goud et al., 1998) ou podem estar no estágio inicial de desenvolvimento (Kim et al., 2000).

A possibilidade de que a maturação oocitária seja completada *in vitro* após a aspiração vem sendo aventada nas últimas décadas, com o objetivo de se tentar otimizar ainda mais o tratamento pela técnica de reprodução assistida, uma vez que se poderia aproveitar o maior número de oócitos. O primeiro estudo em gametas femininos foi realizado por Pincus & Enzmann (1935), que avaliaram a maturação de oócitos *in vitro*. Neste trabalho, os autores observaram que oócitos de coelhos obtidos de ciclos não-estimulados, ao serem retirados dos folículos maduros, continuaram o processo de meiose. (Salha et al., 1998).

Foi somente três décadas depois que Robert Edwards demonstrou que oócitos humanos imaturos retirados do folículo pré-ovulatório, obtidos de fragmentos de ovário e colocados em meio de cultura apropriado passavam espontaneamente do estágio de vesícula germinal para metáfase II *in vitro* (Edwards, 1965).

A primeira FIV com oócitos humanos maturados *in vitro* realizada com êxito foi reportada por Edwards (1969). Somente depois da descrição do primeiro nascimento após uso da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) é que novos estudos foram realizados para maturar oócitos *in vitro* (Steptoe & Edwards, 1978).

A possibilidade de se proceder a maturação de oócitos em estágio de vesícula germinal *in vitro* pode oferecer a vantagem de aumentar o número de oócitos disponíveis para a inseminação *in vitro*, incrementando o aproveitamento dos mesmos após o estímulo e, em vários casos, podendo até mesmo elevar as chances de ocorrer uma gestação. A maturação *in vitro* pode, ainda, proporcionar diminuição do estímulo ovariano, o que diminui o risco de síndrome de hiperestímulo. Além disso, pode-se reduzir o custo do tratamento de infer-

tilidade, tornando-o mais acessível à população. A maturação *in vitro* de oócitos auxilia, também, o entendimento dos eventos moleculares e celulares envolvidos no processo (Salha et al., 1998).

Diversas alternativas têm sido propostas para aprimorar o processo de maturação *in vitro*, e para cada uma delas diversos resultados têm sido obtidos. Veeck et al. (1983) incubaram oócitos imaturos durante 35 horas em meio Ham's F-10 suplementado com 7,5% de soro humano do cordão umbilical. Prins et al. (1987) verificaram que as taxas de maturação poderiam ser aumentadas se gonadotrofinas fossem adicionadas ao meio de cultivo. Dandekar et al. (1991) testaram cultivar oócitos imaturos utilizando células da granulosa de folículos pré-ovulatórios. Gómez et al. (1993) cultivaram oócitos imaturos com as células do cumulus, obtidos de ciclos estimulados com FSH, hMG e hCG, estimulados com FSH e hMG somente ou não-estimulados, em meio B2 (Ménézo). Janssenswillen et al. (1995) verificaram a eficácia da co-cultura de oócitos imaturos sem cumulus com células Vero. Farhi et al. (1997) testaram o cultivo dos oócitos imaturos juntamente com espermatozoides e células do cumulus. Goud et al. (1998) investigaram o efeito da suplementação do meio de cultivo M-199 com EGF na maturação de oócitos *in vitro*. Kim et al. (2000) cultivaram as vesículas germinais no meio Tyrode's modificado, suplementado com 10% de líquido folicular inativado com ou sem cumulus. Cekleniak et al. (2001) compararam as taxas de maturação *in vitro* de oócitos no meio P1 sem glicose e no meio TC199. Hardy et al. (2002) cultivaram os oócitos imaturos em minimal essential media (MEM) e no TCM199 suplementados com 0,4% de albumina sérica humana.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de maturação de oócitos humanos no estágio de vesícula germinal, *in vitro*, e comparar seu efeito 24 e 48 horas após a aspiração folicular, em meio de cultura sem suplementação hormonal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Indução da superovulação

Foram incluídas neste estudo as pacientes submetidas a tratamento de infertilidade conjugal pela técnica de reprodução assistida, no período de novembro de 2002 a outubro de 2003, na Clínica ORIGEN – Belo Horizonte.

Todas as pacientes incluídas no estudo foram submetidas à indução da superovulação. O tratamento iniciava com a administração do análogo do GnRH para dessensibilização da hipófise (Geber et al., 2002). Após a confirmação através de ultra-sonografia endovaginal e da dosagem do estradiol sérico, iniciava-se a indução da superovulação com gonadotrofinas. A dose era adequada de acordo com a resposta individual, monitorada através da ultra-sonografia seriada e da dosagem de estradiol. Quando os folículos alcançavam diâmetro

médio de 17 mm e os níveis de estradiol encontraram-se compatíveis, administrava-se hCG, na dose de 10.000 UI, por via intramuscular. A punção folicular era realizada aproximadamente 34 horas após.

## FERTILIZAÇÃO IN VITRO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS

Os oócitos foram desnudados enzimática e mecanicamente, e o estágio de maturação era confirmado em microscópio invertido (Nikon – Japão), utilizando aumento de 400 X. Eram classificados como imaturos ou vesícula germinal se possuísssem núcleo contendo um nucléolo; maturidade intermediária ou metáfase I (MI) se não possuísssem corpúsculo polar e núcleo com nucléolo; maduros ou metáfase II (MII) se possuísssem corpúsculo polar no espaço perivitelinico.

Os oócitos em estágio MII foram inseminados pela técnica de FIV clássica ou por ICSI, de acordo com a indicação. Os oócitos em estágio VG, doados para o estudo, foram então incubados para análise da maturação in vitro. Inicialmente, os VG foram colocados em placas de cultivo de 60 mm X 15 mm (Corning – EUA) contendo gotas de 20  $\mu$ l de meio de cultura Earle (Sigma – EUA) suplementado com 10% de substituto sintético do soro (SSS) (Irvine Scientific – EUA) e 0,47 mM de piruvato (Sigma – EUA), cobertas com óleo mineral (Sigma – EUA) pré-filtrado e incubados durante 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37° C (Geber et al., 2002).

Passado este período, os oócitos foram avaliados para verificar o estágio de maturação. Os oócitos que não se encontravam no estágio MII foram mantidos em cultura por mais 24 horas, e posteriormente avaliados com relação ao grau de maturação. Os resultados obtidos nas 24 horas foram então comparados com o observado em 48 horas.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de student para amostras pareadas e análise de correlação para avaliação do efeito da idade sobre a incidência de oócitos em estágio de VG. Foi considerado  $p < 0,05$  como nível de significância estatística.

## RESULTADOS

Um total de 326 mulheres submetidas a tratamento de infertilidade conjugal pelas técnicas de reprodução assistida foi avaliado, no período de 4 de novembro de 2002 a 15 de outubro de 2003. A idade variou de 15 a 44 anos, com média de  $34,7 \pm 5,08$  anos.

Foram obtidos 4.320 oócitos das 326 pacientes, dos quais 3.425 (79%) eram metáfase II, 554 (13%) eram metáfase I e 341 (8%) eram VG. O total de oócitos obtidos por paciente variou de 1 a 48, com média de  $13,25 \pm 9,15$ .

Quando estudamos os efeitos da idade da paciente sobre a proporção de VG, não identificamos qualquer

efeito significativo ( $p = 0,358$ ), o que demonstra que o número de VG não foi influenciado pela idade (**Figura 1**).

Cento e oitenta e nove pacientes (58%) não apresentaram oócitos em estágio VG, sendo assim excluídas da avaliação. No grupo de 137 mulheres que apresentaram pelo menos um VG, o número total de oócitos obtidos foi 2.254, sendo 341 (15,12%) em estágio VG, com média de  $2,5 \pm 2,3$ , tendo sido encontrado um máximo de 15. Quando avaliamos a porcentagem de VG por paciente, encontramos uma variação de 2,5 a 82% (mediana = 12,5%).

Para análise da maturação in vitro, foram incluídos os oócitos em estágio VG de 44 pacientes (idade média de  $36 \pm 3,2$ ; variação de 27 a 43 anos). O número total de oócitos obtidos foi de 678, com média de  $15,4 \pm 8,8$  (variação de 3 a 39) por paciente. Destes, 134 (21,7%) encontravam-se em estágio VG. A média de oócitos em estágio VG, por paciente, na amostra foi de  $3 \pm 3,0$ , variando de 1 a 15. A porcentagem de VG por paciente neste grupo variou de 4,2 a 75%.

Do total de 134 VG estudados, 77 (57,5%) apresentaram maturação in vitro nas primeiras 24 horas de cultura, sendo que 21 (15,7%) atingiram o estágio MI e 56 (41,8%) atingiram o estágio MII (**Tabela I**). Dois oócitos (1,5%) apresentaram divisão celular (partenogênese).

Os oócitos foram observados após mais 24 horas, e dos 55 VG que não haviam sofrido processo de maturação inicialmente, oito (14,5%) apresentaram maturação in vitro, sendo três para MI e cinco para MII (Tabela I). Observamos também que dois oócitos (3,6%) apresentaram fenômeno de partenogênese. Ao final do período de 48 horas, 45 oócitos (33,6%) permaneceram em estágio VG, 85 (63,4%) passaram pelo processo de maturação in vitro e quatro apresentaram divisão celular sem que tivéssemos identificado a maturação celular. A partenogênese foi observada também em quatro oócitos que haviam amadurecido nas primeiras 24 horas, perfazendo um total de oito embriões partenogenéticos no final do estudo.

Quando comparamos a incidência de maturação in vitro nas primeiras 24 horas com o obtido no período total, isto é, somados os dois períodos (Tabela I), observamos que não houve uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,16$ ).

## DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou a possibilidade de maturar oócitos em estágio VG expostos ao efeito do hCG, in vivo, em meio de cultura sem a adição de hormônios.

Do total de oócitos obtidos, 341 (8%) encontravam-se em estágio VG, o que está em acordo com o encontrado por Cha & Chian (1998), que identificaram 10 a 15% de imaturidade, e com Trounson et al. (2001), que observaram 5 a 7% de imaturidade. Estes resultados foram inferiores ao encontrado por Veeck et al.

(1983), Prins et al. (1987), Goud et al. (1993), Janssenswillen et al. (1995), Farhi et al. (1997) e Hardy et al. (2002), que descreveram uma incidência de imaturidade superior a 15%. O único estudo em que foi encontrada frequência menor que 5% foi o de Avrech et al. (1997), que observaram 4,4% de imaturos de um total de 3.520 oócitos.

Quando as pacientes que não apresentaram oócitos imaturos foram excluídas do estudo, a frequência passou a ser de 15,12% (341 VG de 2.254 oócitos). Ainda assim, a frequência se manteve semelhante à observada na maioria dos estudos. Uma possível explicação para esta variação observada na literatura seria a seleção do grupo de estudo, pois, como visto nos resultados do presente trabalho, quando são incluídas todas as pacientes a frequência é de 8%.

Com relação à idade das pacientes, não se observou correlação entre o envelhecimento e a incidência de oócitos imaturos, ou seja, a idade da mulher não influenciou o número de vesículas germinais. Uma revisão da literatura mostrou a carência de estudos que enfatizassem esta possível correlação. De todo modo, a ausência desta parece ser um bom sinal, principalmente para as mulheres com idade avançada que necessitam submeter-se a tratamento de FIV.

No presente estudo foi obtida uma média de 2,5 oócitos em VG por paciente, sendo semelhante à média de VG obtida por Janssenswillen et al. (1995), que foi de 2,4 por paciente, e inferior à observada por Nogueira et al. (2000), que observaram uma média de 4,1.

Os resultados demonstraram uma taxa de maturação in vitro de 63,4% no período de 48 horas pós-aspiração, com os oócitos mantidos em meio de cultura sem suplementação hormonal. Estes achados são semelhantes aos observados na literatura para os estudos que também não suplementaram o meio de cultura com hormônios. Comparando-se as taxas de maturação de VG cultivadas em meio sem adição de hormônios, sem co-cultivo e sem espermatozoides com as obtidas no presente estudo após 24 horas, nossos resultados foram superiores aos demais (57,5%). Para alguns estudos, as taxas do presente estudo apresentaram-se superiores, mesmo quando os oócitos imaturos foram cultivados em meio com hormônios, em co-cultivo e com espermatozoides.

Dentre os estudos que utilizaram suplementação hormonal, o de Prins et al. (1987) apresentou taxas de maturação superiores às por nós observadas; entretanto, os autores utilizaram número muito reduzido de oócitos. Mais recentemente, Goud et al. (1998) também observaram maior taxa de maturação in vitro, mas, da mesma forma, o número estudado de oócitos imaturos foi reduzido, pois subgrupos foram criados, podendo induzir a algum viés na conclusão. No trabalho realizado por Cekleniak et al. (2001), as taxas obtidas foram inferiores às obtidas no presente estudo. Conseqüentemente podemos sugerir, através destas comparações, que não

existe diferença entre cultivar os oócitos em meio de cultura com ou sem suplementação hormonal.

Por fim, ao analisarmos os nossos resultados, que compararam as taxas de maturação nas primeiras 24 horas com as obtidas após 48 horas acumuladas, não observamos diferenças significativas. Este resultado demonstra que não se justifica aguardar um período mais prolongado para obter maior número de oócitos maduros.

Podemos concluir, com este estudo, que a maturação de oócitos in vitro pode ocorrer com sucesso quando estes são obtidos de ciclos estimulados e cultivados em meio sem a necessidade de suplementação hormonal.

A maturação de oócitos in vitro vem se mostrando uma técnica bastante promissora, porém deve ser realizada com cautela até que mais estudos comprovem sua real eficiência em proporcionar gestação normal e que, a partir daí, possa ser utilizada de forma rotineira quando do uso de técnicas de reprodução assistida.

## RESUMO

Os estudos sobre maturação de oócitos in vitro iniciaram-se em 1935, com Pincus e Enzmann, e após o nascimento da primeira criança por FIV, grandes avanços foram observados nas técnicas de reprodução humana assistida. O presente estudo avaliou 326 pacientes submetidas a superovulação para realização de FIV. Observou-se que 8% dos oócitos destas pacientes eram imaturos. Uma amostra de 44 pacientes foi estudada objetivando-se verificar a taxa de maturação in vitro de oócitos em vesícula germinal, após 24 e 48 horas de cultivo. Destas, obteve-se um total de 134 oócitos imaturos, que foram incubados em meio de cultura sem suplementação de hormônios. Após este tempo, se fosse observada a presença de corpúsculo polar, esses oócitos eram considerados maduros ou em metáfase II. Caso não houvesse corpúsculo polar e vesícula germinal, os oócitos eram considerados em metáfase I. Esses e os que ainda possuíam vesícula germinal voltaram para estufa por mais 24 horas, quando foram observados novamente. A taxa de maturação ao final de 24 horas foi de 57,5 e de 63,4% ao final de 48 horas. Podemos concluir, com este estudo, que a maturação de oócitos in vitro pode ocorrer com sucesso quando estes são obtidos de ciclos estimulados e cultivados em meio sem a necessidade de suplementação hormonal. Mais ainda, a manutenção do processo por mais 24 horas não aumenta a taxa de maturação.

**Unitermos:** maturação in vitro, vesícula germinal, oócitos imaturos

## REFERÊNCIAS

1. Avrech O. M., Goldman G. A., Rufas O., Stein A., Amit S., Yoles I., Pinkas H., Fisch B. – Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J. Assist. Reprod. Gen.*, v. 14, n. 6, 337-342, 1997.

2. Cekleniak N. A., Combelles C. M. H., Ganz D. A., Fung J., Albertini D. F., Racowsky C. – A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil. Steril.*, v. 75, n. 6, 1185-1193, 2001.
3. Cha K., Chian R. – Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Repr. Update*, v. 4, n. 2, 103-120, 1998.
4. Dandekar P. V., Martin M. C., Glass R. H. – Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil. Steril.*, v. 55, n. 1, 95-99, 1991.
5. Edwards R. G. – Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet*, v. 2, 926-929, 1965.
6. Edwards R. G. – Introducción: los comienzos de la fertilización in vitro y sus derivados. In: Risquez F., Edwards R. *Reproducción asistida moderna*. Buenos Aires: Reproductive Health Care, Cap. 1, 19-34, 2003.
7. Farhi J., Nahum H., Zakut H., Levran D. – Incubation with sperm enhances in vitro maturation of the oocyte from the germinal vesicle to the metaphase II stage. *Fertil. Steril.*, v. 68, n. 2, 318-322, 1997.
8. Geber S., Sales L., Sampaio M. A. C. – Laboratory techniques for human embryos. *Reprod. Biomed. Online* 5 (2):211-218, 2002.
9. Geber S., Sales L., Sampaio M. A. C. – Comparison between a single dose of goserelin and multiple daily doses of leuprolide acetate for pituitary suppression in IVF treatment: a clinical endocrinological study of the ovarian response. *Journal of Assist. Reprod. Genetics*, 19 (7):293-298, 2002.
10. Gómez E., Tarín J. J., Pellicer A. – Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil. Steril.*, v. 60, n. 1, 40-46, 1993.
11. Goud P. T., Goud A. P., Qian C., Laverge H., Van der Elst J., De Sutter P., Dhont M. – In vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cell and epidermal growth factor in the culture medium. *Human Reprod.*, v. 13, n. 6, 1638-1644, 1998.
12. Hardy K., Franks S., Roberts R. – Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Human Reprod.*, v. 17, n. 11, 2950-2956, 2002.
13. Janssenswillen C., Nagy P., Van Steirteghem, A. – Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. *Human Reprod.*, v. 10, n. 2, 375-378, 1995.
14. Kim B., Lee S., Kim K., Han C., Kim J. – In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil. Steril.*, v. 74, n. 6, 1153-1158, 2000.
15. Nogueira D., Staessen C., Van de Velde H., Van Steirteghem A. – Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Fertil. Steril.*, v. 74, n. 2, 295-298, 2000.
16. Prins G. S., Wagner C., Weidel L., Gianfortoni J., Marut E. L., Scommegna A. – Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil. Steril.*, v. 47, n. 6, 1035-1037, 1987.
17. Salha O., Abusheika N., Sharma V. – Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Human Reprod. Update*, v. 4, n. 6, 816-832, 1998.
18. Trounson A., Anderiesz C., Jones G. – Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, v. 1, n. 121, 51-75, 2001.
19. Valle M., Sampaio M. A. C., Lemgruber M., Geber S. – Comparison between the effect of 10.000 IU and 5.000 IU of hCG, on the incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil. Steril.*, 76 (3S):89, 2002.
20. Veeck L. L., Wortham Jr. E., Witmyer J., Sandow B. A., Acosta A. A., Garcia J. E., Jones G. S., Jones Jr. H. W. – Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, v. 39, n. 5, 594-602, 1983.

# Fertilização “In vitro”: homossexualismo feminino, doação de útero

**Souza M. C. B., Sawen R. F, Oliveira J. B. A., Henriques C. A., Couto M. F C., Almeida G. L. F, Marcondes A. C. L.**

*Correspondência para:*  
 Maria do Carmo Borges de Souza  
 Avenida das Américas, 4666 salas 312-313 Rio de Janeiro- RJ  
 CEP: 22649 - 900 Fone: (21) 430-9060 Fax: 21 430-9070  
 E-mail: g&obarra@cmb.com.br

## RESUMO

Os autores discutem a proposta de realização de procedimento de doação de útero em caso de homossexualismo feminino.

## INTRODUÇÃO

Casal, com idades de 32 e 29 anos de idade, ia adotar criança e resolveu optar por procedimento de fertilização assistida.

A questão não está sobre a oportuidade de atender o desejo das duas clientes, que constituem um par homossexual feminino, de gerar e gestar um filho, utilizando sêmen de um doador.

Agente complicador que as clientes colocam a Clínica é o desejo da utilização de óvulos de uma delas para fertilização sendo, posteriormente, gestado pela outra cliente formadora do par. Ressalte-se, por oportuno, a estabilidade do par, unido há oito anos.

As técnicas biomédicas utilizadas nas diferentes possibilidades de fertilização assistida tem levantado, em todo o mundo, uma variedade de interrogações filosóficas e éticas fundamentais.

Não existe ajuda para se elaborar respostas éticas quando os fatos se tornam complexos. Entretanto, por instinto, sabemos todos que, entre o que é e o que deve ser, entre o possível e o aceitável, existe uma distância onde se instalam os julgamentos de valor, as escolhas e as decisões. Nem tudo é tecnicamente possível é eticamente válido.

Ter um filho é exercer a “liberdade das liberdades”, mas não existe liberdade nem direito sem limite. Portanto, torna-se indispensável traçar algumas fronteiras para que não se passe do desejo ao filho a determinadas maneiras de gerar um filho.

Ainda que não exista uma jurisprudência brasileira, não cabe dúvida que a responsabilidade médica conduzirá os médicos ou os biólogos (as equipes) a serem responsáveis pelas consequências de seus atos profissionais.

Até agora, a prática da procriação assistida não tem ultrapassado as estruturas essenciais da família e está limitada a reforçar mais ou menos as regras dentro de um sistema geral, ao qual se pede somente que se adapte a nova realidade e proteja, o máximo possível, os filhos nascidos das modernas técnicas.

Assim sendo, propusemo-nos a discutir amplamente estas possibilidades trazidas pelas clientes, e a trazer as reflexões ao conhecimento da população médica.



## DISCUSSÃO

Inicialmente, nossa consultora em bioética considera que seja em função das necessidades e dos valores dominantes de uma dada sociedade que se determinem os papéis respectivos do pai, da mãe e do filho. Faz-se claro, então, que a reprodução escapa, pelo menos em parte, ao aspecto biológico puro e simples.

O direito, onde a liberdade individual de procriar se exerce, segue normas complexas e de diversas naturezas, combinando mais ou menos harmonicamente regras de costume, leis sociológicas dos grupos e regras de direito, fruto de uma racionalização e de uma estruturação dos liames sociais.

Se passarmos para o aspecto da procriação assistida, observar-se-á que ela evoca, muitas vezes, a idéia de direito ao filho, sugerindo uma passagem obrigatória do desejo ao direito.

Ficam, então, os sistemas jurídicos enquanto ordenados e reguladores das relações humanas, colocados diante de uma grande dificuldade: por um lado a procriação escapa ao direito, que não pode impor a alguns algo em nome do desejo dos outros; por outro, a reprodução humana não pode se efetuar e se fundar, humana e socialmente, fora do direito.

Quando se trata da procriação natural, o direito civil se limita a regular, de maneira mais ou menos imperativa, o *status* de filho nascido ou concebido; fixando leis de genealogia e de parentesco, o direito intervém posteriormente.

Na procriação assistida, a ausência de regras reinstalou, num contexto diferente, uma pátria potestas, um direito sobre o filho a critério do indivíduo.

Pretende-se, então, um verdadeiro poder jurídico do homem sobre o homem, cujo limite, pelo menos até o momento, se constitui numa tentativa de regular os direitos do filho para enquadrar o limite do direito ao filho.

Se caminhamos do interesse ao direito, verifica-se que a condição de uma criança quanto ‘a sua filiação e a seus direitos familiares é função das condições de sua concepção, quer dizer depende sempre da situação de seus ascendentes.

Determinados casos, entretanto, poderão fazer com que tenhamos que retomar ao julgamento de Salomão. Ou, quem sabe, a Brecht em sua peça “O Círculo de Giz Caucasião”? Quem resolverá quem é a mãe em determinadas situações?

O direito de família possui uma função simbólica e referencial para concretizar a dimensão social e pessoal do indivíduo, o qual não se pode reduzir nem a seu aspecto biológico, nem a subjetividade de suas afeições ou de seus desejos.

Qualquer que seja a divisão da filiação, existe a necessidade de assegurar, no interesse geral, a coerência de regras, e de assegurar a prudência onde a imagina-

ção conduzirá a transformações dificilmente suportáveis tanto para o filho como para a sociedade, já que para esta tudo está organizado em compartimentos. Porque as mentalidades não caminham no mesmo ritmo que a ciência. Pasolini dizia que estamos vivendo numa sociedade permissiva e não em uma sociedade liberada, ou seja, a sociedade permite que se vá um pouquinho mais adiante para que possa, dali para frente, proibir melhor.

Com maior razão, ainda quando se fala em maternidade, porque a quase totalidade dos direitos ocidentais fundamenta a maternidade sobre o fato biológico da gestação e do parto. Se, por ventura, pretender-se definir a maternidade pela genética, resultará numa troca das estruturas do direito de filiação. Existem aspectos da estrutura do direito de filiação que a vontade individual não pode impunemente transgredir.

O direito, em resumo, é um artifício, reflete a especialista. Assim, obteve-se que a filiação é uma criação do direito e não da natureza. Artifício contra artifício, qual se privilegiará? Quais influências recíprocas exercerão um sobre outro?

No caso de conflitos, o direito fixa os limites, diz quem é o pai, quem é a mãe, fixa o parentesco, regulando a matéria precisa e imperativamente.

Se desestabilizamos a paternidade, a maternidade e os

sistemas jurídicos que, bem ou mal, se esforçam por conciliar ou por combinar os aspectos biológicos, afetivos e institucionais, quem dirá como os sujeitos assim diferenciados nas suas referências humanas essenciais viverão a ambivalência de sua origem ?

Se a vontade puramente individual pode fazer nascer direitos subjetivos no âmbito dos contratos, portanto sobre as coisas, não institui só por ela relações interpessoais tão fundamentais quanto as relações de filiação.

A adoção, filiação pela vontade, está sujeita a regras próprias de ordem pública

A procriação assistida pode, as vezes, gerar idéias confusas e contraditórias. Por um lado, ela deixa crer através dum “direito à geração” que existe um direito a filiação, concebido como uma apropriação do filho objeto do desejo e da vontade, muito mais que sujeito de uma relação na qual o estabelecimento e os efeitos escapam, em parte, à vontade.

Mesmo para nós médicos fica claro que está em causa aqui, também, uma questão obscura de poder; quem tem o poder e de fazer que um procrie e que será denegado ? Da mesma forma o poder de, médicos, executamos os procedimentos que levem àquele fim. Será o direito, em princípio, por suas regras e seus interditos fundadores, depois pelo poder que ele delega aqueles que ele institui como responsáveis pela decisão lá onde a regra geral não é suficiente, que poderá nortear os rumos, acredita especialista em Bioética. Não se pode fundamentar a filiação sobre a vontade, e admitir depois a vontade de privar o filho de seus direitos de filiação.

Creemos ser desnecessárias muitas considerações a respeito do direito da Clínica a livremente escolher os métodos de atuação, desde que consagradas pelo saber atual e utilizados em benefício unicamente das clientes. Ao médico sempre caberá alegar cláusula de consciência, e, em nossas discussões, alguns deixaram claro que teriam dificuldades pessoais em atender determinadas situações, preferindo encaminhar os casos 'aqueles que o façam sem as mesmas restrições, dentro do grupo.

O profissional liberal somente é assim considerado se tiver como pressuposto indispensável a total, ampla e irrestrita liberdade no que respeita ao exercício de sua profissão. A procriação sendo um fato humano, resultado de atos humanos, abarca, também, a responsabilidade dos homens. Individual ou coletiva, esta responsabilidade nos remete à moral, a uma ordem de valores, a uma ética de fins e meios pelas quais se procura o sentido do destino humano.

As pessoas implicadas na procriação, homem e mulher ou mulher e mulher, e hoje biólogos e médicos, mas também a consideração do filho futuro, geram deveres suscetíveis de concretizar a idéia de responsabilidade. Responsabilidade esta que é dupla. Primeiro, uma responsabilidade individual correspondente aos deveres dos sujeitos que concorrem para a procriação. Segundo, uma responsabilidade coletiva que coloca em questão os deveres da sociedade em conjunto.

É sobre os deveres da sociedade em conjunto que se pergunta como se resolverá o problema da filiação desta criança, já que nosso direito, ao contrário do que ocorre no direito anglo-saxão, seguidor da vertente da "common law", não faz um direito casuístico onde a decisão do juiz cria direito novo servindo de precedente a casos análogos.

Nosso direito filia-se ao civil "law" de tradição romana, portanto, é positivo, formal e político.

Como pessoa física, o filho assim gerado ingressará no mundo jurídico, tendo como mãe qual das duas clientes se dividem esta maternidade?

a mãe genética, ou a mãe uterina?

Nosso sistema jurídico foi construído sobre o adágio *mater semper certa est*, logo, mãe é a mulher que pariu a criança. Como poderemos dividir esta maternidade, na condição solicitada, implicando numa forma de cessão de útero, sendo que este não está consagrado no nosso direito e, embora esteja regulado pelo Conselho Federal de Medicina, somente é permitido no mais próximo grau de parentesco? A clínica acata as normas do conselho; é uma das maneiras de assegurar 'as suas clientes um atendimento deontologicamente correto. É uma segurança do cliente.

A clínica não terá como fugir à responsabilidade por contrariar a Resolução do CFM, principalmente na pos-

sibilidade, e sempre existe a possibilidade em qualquer casamento, união, sociedade, não importa a denominação ou o *status* jurídico, de uma separação.

É difícil pensar em separação quando se pensa em dar a vida, momento máximo de erotismo, *latissimo sensu*, mas elas existem, trazendo consigo a disputa pelos filhos, a briga pela sua guarda. É uma situação delicada entre pai e mãe. Entre duas mães, teríamos que recorrer, talvez, a uma escola teológica judia antiga que diz que a solução da questão "quem é a mãe?" não poderia ser resolvida senão por Deus.

Outro problema importante é a quem pertencerão os embriões excedentes (e quase sempre há na procriação assistida) que resultarão da fertilização?

Quem se responsabilizará por eles? Quem decidirá seu destino? No caso, não é possível, somos todos humanos e passíveis de falha, de a criança, apesar de toda a prevenção da Clínica, nascer defeituosa, física ou mentalmente, e for rejeitada pelas duas mães, qual será realmente responsável nesta espécie de "conflito negativo de mães" ?

Já aconteceu, pelo menos em outros países, em situação de doação de útero.

Por estes questionamentos e pela responsabilidade sobre o que poderá advir deste procedimento, pela observação de que a vida é sempre mais rica do que a nossa imaginação, achamos que seria válida uma atitude de prudência, considerando uma ética de responsabilidade.

## CONCLUSÃO

Finalmente concluímos que:

Sem abrigo jurídico ou ético, o referido procedimento, como solicitado, iria ferir a regulação do Conselho Federal de Medicina referente a procriação assistida. Consideramos que a clínica, sob nenhuma hipótese, deve se submeter ao desejo destas clientes em dividir a maternidade de uma criança.

A persistir nessa atitude, incidiria a Clínica em falta ética por praticar uma forma de doação de útero, interdita pela instituição de classe.

## REFERÊNCIAS

- Conselho Federal de Medicina - Resolução 1358/92. D.O.U., 19/11/92, sec 1 pag 16053
- Sawen R.R, Hryniewicz, S. - O direito "in vitro". Da bioética ao biodireito. Rio de Janeiro. Lumen Juris, 1997.
- Souza M.C.B. et al. - Doação de oócitos: reflexões e normas em um programa de fertilização assistida. *Femina*, 24: 113-116, 1996.
- Souza M.C.B. et al.-Maternidade substituta. *Femina*, 24: 153-155,1996.
- Souza M.C.B. et al. - Cessão temporária de útero: comunicado do primeiro nascimento brasileiro. RBGO. Anais 47º Congresso Brasileiro GO, 1997.

# O Embriologista e a Reprodução Assistida: "Admirável Mundo Novo"

## Raquel de Lima Leite Soares Alvarenga

Pronúcleo-Núcleo Brasileiro de Embriologistas em Medicina Reprodutiva

Rua Benjamin Flores 105/501

Belo Horizonte - MG - <http://pronucleo.cjb.net>

Louise Brown nasceu três minutos antes da meia-noite de 25 de julho de 1978, num pequeno hospital situado em Oldham, no norte industrial da Inglaterra. Seu nascimento foi resultado da fusão do conhecimento de Patrick Steptoe, ginecologista, pioneiro em laparoscopia, e Robert Edwards, cientista que pesquisava a fertilização e desenvolvimento de óvulos e embriões *in vitro* em Cambridge. Após quase dez anos de muito esforço, repetidos fracassos, críticas da comunidade científica e leiga e pouco dinheiro, eles criaram o bebê do século e os alicerces da Reprodução Assistida (Steptoe & Edwards, 1978). Vinte e três anos é muito tempo para a ciência, principalmente no campo da Reprodução. Mais de duas décadas depois do primeiro bebê de proveta ser concebido com êxito *in vitro*, o avanço desta disciplina especializada tem sido mais que espetacular.

Em 1992 a comunidade científica recebeu, entusiasmada, os primeiros resultados de ICSI: a fertilização normal conseguida através da injeção de um único espermatozóide no citoplasma do óvulo. Quase dez anos depois, esta técnica já é utilizada em praticamente todos os casos de infertilidade devido a fator masculino, e muitos mais, nos quatro cantos do mundo (Palermo *et al*, 1992).

O PGD (Diagnóstico Pré-implantação) já pode ser oferecido a casais portadores de doenças genéticas sérias, devolvendo-lhes a chance de gerar crianças saudáveis (Handyside *et al*, 1990).

O congelamento de óvulos e tecido ovariano vem oferecer uma chance para mulheres jovens portadoras de neoplasias ter filhos no futuro, assim como a criopreservação de sêmen e tecido gonadal no caso dos homens (Chen, 1986; Newton *et al*, 1996; Avarbock *et al*, 1996; Brook *et al*, 2001).

A clonagem e a transferência nuclear poderá permitir que casais sem gametas possam gerar filhos portando sua carga genética (Campbell *et al*, 1996; Wilmut *et al*, 1997).

Há setenta anos atrás, Aldous Huxley, em "Admirável Mundo Novo", descreveu determinados profissionais, aos quais chamou "Fecundadores".

"Quando o diretor de Incubação e Condicionamento entrou na sala, trezentos Fecundadores, curvados sobre os instrumentos, estavam mergulhados no silêncio em que mal se ouviam as respirações, naquele desligamento, murmúrio ou zumbido da mais absorta concentração... Os sobretudo dos trabalhadores eram brancos, e tinham nas mãos luvas de borracha de palidez cadavérica. A luz era gelada, morta, fantástica. Só nos tubos amarelos do microscópio é que encontrou uma substância rica e viva..

- Esta- disse o Diretor ao abrir a porta, - é a Sala da Fecundação.

Artigo Publicado: Volume 5, nº2, 2001

*Estas, mostrou com um movimento do braço, são as incubadoras. Abrindo uma porta de separação mostrou-lhes pranchas e prateleiras de tubos de ensaio numerados. O suprimento de óvulos para a semana. Mantidos à temperatura do sangue; explicou, enquanto os gametas masculinos, e então abriu outra porta, devem ser conservados a trinta e cinco graus em vez de trinta e sete...*

*Ainda apoiado contra as incubadoras, forneceu-lhes uma breve descrição do moderno processo da fecundação; naturalmente falou-lhes primeiro de sua introdução cirúrgica ... continuou com uma técnica de preservação do ovário seccionado em vida e em pleno desenvolvimento; passou a considerar as condições ótimas de temperatura, salinidade, viscosidade, referiu-se ao líquido no qual se conservam os óvulos desprendidos e maduros, e, levando os alunos às mesas de trabalho, mostrou-lhes claramente como esse líquido era retirado dos tubos de ensaio, como era derrubado gota a gota nas lâminas especialmente aquecidas dos microscópios; como os ovos que continha eram inspecionados contra anormalidades, contados e transferidos para um receptáculo poroso; como ( e então ele os levou a observar essa operação ) esse receptáculo era imerso num caldo morno contendo espermatozóides que aí nadavam livremente- "numa concentração mínima de cem mil por centímetro cúbico", insistiu; e como, passados dez minutos, o frasco era retirado e seu conteúdo examinado de novo; como era imerso outra vez se algum dos óvulos não fosse fecundado e, se necessário, ainda outra vez; como os óvulos fertilizados voltavam às incubadoras...*

*Um ovo, um embrião, um adulto- normalidade.... Progresso. "(Aldous Huxley - Admirável Mundo Novo, 1931)*

Como se tivesse entrada numa máquina do tempo, Huxley vislumbrou o futuro - nosso presente.

A embriologia clínica é a área da biologia que se dedica a realizar *in vitro* a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial para fins terapêuticos e diagnósticos. O embriologista clínico (o "Fecundador" de Huxley) é o profissional de saúde que realiza estes procedimentos, independente de sua formação.

No Brasil ainda não há instituição universitária superior específica para a formação nesta área, existindo uma carência de profissionais especializados. Na maioria das vezes o treinamento é realizado informalmente, com protocolos de outras instituições sendo copiados mecanicamente.

O Pronúcleo - Núcleo Brasileiro de Embriologistas em Reprodução Assistida é a primeira sociedade brasileira

e latinoamericana a congregar estes profissionais e estabelecer objetivos para promover seu fortalecimento ético e científico, visando criar um patamar superior de qualidade na área.

Tão proféticos os textos de "Admirável Mundo Novo"! Há limite para o futuro desta área? E qual nosso exato papel nele? Podemos fazer? Devemos fazer?

O Dr. José Gonçalves Franco Jr., editor do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida, e o Dr. Edson Borges Jr., atual presidente da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida, ambos Sócios Beneméritos do Pronúcleo, gentilmente cederam algumas páginas deste periódico para o Pronúcleo. Vamos utilizar este espaço tão importante para publicar nossos trabalhos, divulgar protocolos e técnicas, compartilhar dúvidas e fracassos, mas também nossos sucessos...

Agradecemos à SBRA e a todos aqueles que possibilitaram ao Pronúcleo chegar até aqui. Temos confiança que ainda muitos mais irão nos ajudar a chegar até muito além do que agora podemos imaginar...

"Fecundadores" do Brasil, aguardo-vos neste jornal e em nosso web site : <http://pronucleo.cjb.net> Até mais!

## REFERÊNCIAS

- Avarbock M. R., Brinster C.J., Brinster R. L.- Reconstitution of spermatogenesis froco frozen spermatogonial stem cells. *Nature Med*, 2: 693-6, 1996.
- Brook P. F., Radford J.A., Shalet S. M., Joyce A.D., Gosden R. G.. - Isolation of geriu cells froco human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, v. 75, n. 2, Feb 2001.
- Chen, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1: 884-886, 1986.
- Handyside A. H., Kontogianni E. H., Hardy K., Winston R. M. L.. - Pregnancies froco biopsied human pre-implantation embryos sexed by y-specific DNA amplification. *Nature (London)* 344, 768-770, 1990.
- Huxley A. - Admirável Mundo Novo (Brave New World). Cia. Brasileira de Divulgação do livro BRADIL, Rio de Janeiro, 1969.
- Newton H., Aubard Y., Rutherford A., Sharma V., Gosden R. G..- Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod li*: 1487-1491, 1996.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Stehteghetn A. C.. - Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17, 1992.
- Septoe P. C., Edwards R. G.. - Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366, 1978.

# Aspectos psíquicos x reprodução assistida Estudo de caso - Vínculo primitivo e interação negativa para o sucesso.

Psychic aspects x assisted reproduction

**MELAMED R.M., ROSSI-FERRAGUT  
L.M., AOKI T., LACONELLI JR. A.,  
BORGES JR. E.**

*Correspondência para: Lia Mara Rossi-Ferragut Fertility -  
Centro de Fertilização Assistida e Vídeo-endoscopia Pélvica  
Avenida Brigadeiro Luís Antonio, 4258-São Paulo [http://  
www.fertility.com.br](http://www.fertility.com.br) e-mail: [fertility@fertility.com.br](mailto:fertility@fertility.com.br)*

## ABSTRACT

The aim of this study was to think about emotional questions related with couple infertility and the negative interaction impairing the success of IVF treatment. Our clinic experiente lias been showed some usual psychic aspects in affective life in these women who has looking for assisted reproduction and has no showed success in terms of implantation and pregnancy. Our purpose is emphasize these problems and suggest some solutions, through better comprehension of internal and external mechanisms in this situation.

“... somos tecidos de símbolos de um lado a outro, nossos átomos, nossas células, nossos fins ideais. Esses símbolos carregam consigo sua história, o sentido de sua gênese. Eles constituem uma unidade, mas com face dupla: o que eles permitem que apareça esconde o que não são mais. Mas é apenas o que eles não são mais que revela o que eles realmente são.” (Abraham & Torok, 1995)

O trabalho psicológico no processo de reprodução assistida tem por objetivo tratar o que não se vê, ou seja, a causa não aparente, que dificulta o sucesso nos procedimentos, ou na busca do que é revelado como desejo.

Os aspectos psíquicos transcendem o que podemos ver e aparentemente controlar. Mudamos os rumos de nossas vidas, de nossa história e da história social.

Há tempos, a mulher vem transformando seu papel no núcleo familiar possibilitando mudanças que acarretam na elaboração de algumas novas questões. Ser mãe e mulher na sociedade atual exige uma mobilidade interna e externa que é muitas vezes dificultada por conflitos de ordem prática e emocional, impedindo assim a conciliação entre essas várias funções e os interesses da mulher.

Pretendemos enfocar estes conflitos e explicar possíveis saídas, através de uma melhor compreensão dos mecanismos internos (individuais e familiares) e externos (sociais e profissionais) que integram esta situação.

Fadada a carregar a culpa e/ou a responsabilidade por seus atos e possíveis conseqüências referentes à sua vida reprodutiva, a mulher, quando opta em procriar cedo, acredita estar obrigada a abandonar sua profissão para ser boa mãe. Ao optar pela gestação mais tardia, após o estabelecimento emocional e profissional, enfrenta os dilemas da gestação na idade mais avançada.

Assim sendo, dentre as sensações geradas na mulher encontraremos o falso sentimento de culpa, fonte de depressão e falta de confiança em si e na vida, descrito da seguinte forma “a verdadeira culpabilidade é ou deveria ser um momento em que desenvolvem-se novas forças de ação” (Dolto, 1988). Muito

Artigo Publicado: Volume 5, nº1, 2001

embora este procedimento nem sempre seja perceptível, o falso sentimento de culpa mobiliza energia do sujeito de forma a mantê-lo diante do sofrimento e da dor.

A experiência clínica tem nos levado a alguns aspectos em comum na vida afetiva das mulheres que buscam os processos de reprodução assistida e apresentam dificuldades em fixar os embriões e levar adiante a gestação.

Ao falarmos da vida afetiva de um pessoa, é necessário entendermos sua história que inicia-se muito antes do momento atual. Esse é um dos principais motivos pelos quais acreditamos ser importante acrescentar neste texto um pequeno recorte onde enfocaremos tal aspecto, aceitando que o filho biológico nasce depois do filho psicológico.

Ainda quando crianças brincamos com nosso futuro, planejamos nosso estar ao mundo, o poder aquisitivo, a profissão e também a família, os filhos, seus nomes, suas funções... “o desejo é encarnado juntamente com as primeiras células do feto, e as relações pré-simbólicas com a mãe e com o pai existem na vida intra-uterina” (Dolto, 1999). Assim sendo criamos uma condição diante da qual a criança terá algumas metas a cumprir. Este processo ocorreu igualmente com nossos pais que tiveram o seu início inscrito na vida dos nossos avós e assim sucessivamente.

Percebemos, portanto, que de alguma maneira existe um papel a ser cumprido e nem sempre diante de tal *script* o filho é possível.

Estudos psicanalíticos revelam que “no desenvolvimento emocional individual, o precursor do espelho é o rosto da mãe... Gradativamente a separação entre o não-eu e o eu se efetua, e o ritmo dela varia de acordo com o bebê e o meio ambiente”. Estamos aqui falando da formação do eu, a partir de um processo de identificação primária com a mãe ou seu substituto. A mãe reflete em seu rosto aquilo que sente e vê em relação ao seu bebê e este pode encontrar-se no olhar materno (Safra, 1995).

Ao atentarmos ao processo de desenvolvimento emocional e da sexualidade da menina perceberemos alguns pontos que posteriormente interferirão em sua possibilidade de vir a ser, inclusive, mãe. Muito embora acreditamos que a criação de uma criança deveria estar baseada não somente nos livros mas, fundamentada nas suas necessidades potenciais e na sua capacidade, é nos livros que encontramos alguns tópicos importantes. O pai da psicanálise nos deixou a mensagem de que “a menina necessita passar por dois processos de mutação: primeiro o desenvolvimento da sexualidade feminina se vê complicado pela necessidade de renunciar a zona genital originalmente dominante, quer dizer o clitóris, em favor de uma nova zona a genital; a segunda é a troca do primitivo objeto materno para o pai”.

Para a criança, adultos são todos poderosos com a palavra como lei. Assim sendo: “os vínculos da família atual (interjogos e sua economia afetiva), inspira-se freqüentemente nos vínculos vividos e fantasiados pelos pais na relação

com os medos das famílias de origem” (Eiguer, 1995).

Os medos estão associados à três possibilidades - uma delas é um resíduo do passado (do sujeito ou do grupo ao qual pertence - um segredo ou um fantasma que permeia a vida da pessoa), ou outra possibilidade está relacionada ao presente (às instabilidades e incertezas) e por fim o medo do fracasso e de conseqüências negativas no futuro, (diante do medo de não engravidar ou engravidar, além de deixar de cumprir sua função social, poderemos ter também o medo diante das mudanças que a criança trará à sua vida pessoal, ao relacionamento com o marido, com seus pais e com os pais do marido). Qualquer mudança, por vezes, requer grande mobilização de energias, reconhecimento e um suposto enfrentamento dos medos, podendo gerar instabilidade nas relações existentes, principalmente se em suas relações iniciais o sujeito não encontrou no objeto, continência. Autores sugerem que a “função de continência, a capacidade de Reverie, o que poderia permitir o estabelecimento do conteúdo do sujeito com a sua própria realidade psíquica” (Safra, 1995; França, 1997).

Caso este processo deixe de ocorrer poderemos encontrar mulheres que fiquem detidas no vínculo primitivo com a mãe, sem alcançar jamais uma genuína re-orientação frente ao homem e pior, frente a si mesma e seus supostos desejos.

No atendimento psicoterapêutico com casais que buscam na reprodução assistida a possibilidade de realização do desejo de ter filhos, deparamo-nos em alguns casos, com aspectos anteriormente apontados que poderiam ser entendidos como impeditivos ou dificultadores de se obter um resultado satisfatório se não trabalhados.

Tal fato, foi por nós vivenciado concretamente e será relatado a seguir.

Após o segundo procedimento de ICSI sem sucesso, um casal busca o atendimento psicológico. Percebe-se que o marido tenta pedir socorro, pois todo seu poder de convencimento e sedução estavam esgotados. Para ele ainda era possível dar continuidade ao tratamento. No entanto, a esposa via esta possibilidade como remota.

De origem oriental, filha mais velha, a esposa mantinha-se calada a maior parte do tempo: “ela não tem que ficar assim, não deu certo, bola prá frente ! Vamos tentar novamente”, dizia o marido sem dar-se conta do quão prejudicial poderia ser o fato de impedir a expressão dos sentimentos dela.

Com um pedido de socorro no olhar, a esposa angustiada tentava conter as lágrimas. O luto não podia ser vivido?! A submissão é freqüente no comportamento das mulheres orientais em relação aos maridos. A função masculina é bastante valorizada e cabe a mulher o papel de servir. O filho varão de preferência, o primogênito, deverá assumir a família de origem na ausência do progenitor, passando então a “herdar” seus bens e os cuidados de todos como o pai o faria. A mulher deverá ser um bom ventre e dar ao homem o filho que carregará seu nome.

De acordo com o marido, ela mantinha-se muito ligada ao núcleo familiar, sendo sobrecarregada de responsabilidades e obrigações, porém constantemente sendo tratada como incompetente principalmente pela figura materna.

Cada sujeito da díade, lidava com a angústia de formas diferentes - ele ria e não parava de falar, ela chorava e com a voz embargada depois de algum tempo conseguiu dizer: "Tenho medo de decepcionar novamente".

De qual momento de sua vida esta mulher falava?

Na verdade, do momento atual impossibilitada de realizar o desejo do marido, pois não fixou em seu útero o embrião transferido, deixando de levar à diante a gestação e/ou do seu próprio nascimento onde era supostamente esperado um menino.

Retorne-mos à psicanálise. "Por trás do encadeamento das associações livres (conteúdos manifestos), o analista busca a atitude afetiva que rege esse encadeamento e que é por assim dizer, sua lei de inteligibilidade" (Abraham & Torok, 1995).

Diante da condição atual em que encontrava-se esta mulher o filho não era viável, visto que seria necessário refazer os vínculos familiares e seus fantasmas.

Dando ao marido o filho homem, estaria colocando em risco o "amor" da mãe; deixando de fazê-lo, o papel de incompetente seria mantido. Este papel, apesar de doloroso era um lugar já conhecido.

Os laços de família, projetados para cada sujeito, de alguma forma determina seu futuro. Após algumas sessões de psicoterapia, a esposa passou a apropriar-se do "direito de ser" - utilizando a palavra para expressar seus sentimentos inclusive apontando semelhanças com seu marido e seus pais, que com frequência, reportavam-na à condição de incompetente decidindo inclusive o que ela deveria sentir.

Incomodado com as atitudes da esposa, o marido sugeriu interromper as sessões de análise, sem se dar conta que a possibilidade do vir a ser estava começando a surgir. A história desta mulher estava sendo reformulada através do processo analítico. Durante o tratamento, transferiu e encontrou continência para seus medos, necessidades, desejos e fantasias donde o filho psicológico então nascera e certamente o biológico poderia passar a existir.

Alguns laços afetivos tornam-se nós efetivos, que impedem a fluidez do que supostamente desejamos ser.

A condição do suposto desejo é ressaltada, pois encontramos casais que conscientemente desejam o filho, porém ao longo do processo psicoterapêutico per-

cebe-se que este mobiliza muitas angústias, medos, fantasmas e fantasias. Percebemos então, que a suposta natureza é bloqueada e nem sempre a ajuda da ciência por si só favorece a condição de gestar e dar a luz; fazemos pois, parte de um todo e funcionamos constantemente como um Corpo Gestante.

Corpo gestante

Escultura mutante

Transformando o grão em duna,

Conforme o movimento da natureza.

O próprio movimento faz crer que

Há vida.

Conforme o movimento da natureza

O lugar ocupado será esvaziado

E o novo grão repousado

Dará vida a uma nova Escultura esculpida.

## RESUMO

A proposta deste trabalho é pensar as questões emocionais relacionadas a infertilidade e a interação negativa para o sucesso na reprodução assistida. A experiência clínica tem nos levado a alguns aspectos em comum na vida afetiva das mulheres que buscam os processos de reprodução assistida e apresentam dificuldades em fixar os embriões e levar adiante a gestação. Pretendemos enfocar estes conflitos e levantar possíveis saídas, através de uma melhor compreensão dos mecanismos internos e externos que integram esta situação.

## REFERÊNCIAS

- Abraham N. & Torok, M. - A casca e o núcleo - Escuta - São Paulo; Tradução: Coracim, Maria José R. Faria, 1995.
- Dolto F. - Dificuldade de Viver psicanálise e prevenção das neuroses / Artes médicas- Porto Alegre, 1988.
- Dolto, F. - As etapas decisivas da infância - Martins Fontes - São Paulo, 1999.
- Eiguer A. - O parentesco fantasmático - Transferência e contra transferência em terapia familiar psicanalítica - Casa do Psicólogo - São Paulo, 1995
- França M. A. - Bion em São Paulo: Ressonâncias - Coordenação: Sociedade Brasileira de Psicanálise de São Paulo - SP / Imprensa Oficial do Estado, 1997.
- Safra G. - Momentos Mutativos em psicanálise - Uma visão Winnicottiana - Casa do Psicólogo, 1995.

## A Rede Latino-americana de Reprodução Assistida e o Brasil

No dia 28 março de 2003 o Brasil assumiu a Direção Executiva da Rede Latino-americana (REDE). A REDE é uma instituição científica e educacional que agrupa mais de 90% dos centros que realizam as técnicas de reprodução assistida na América Latina. A REDE foi estabelecida em 1995 com 50 centros, e conta hoje com um total de 104.

Assim sendo, com o intuito de promover especialização à comunidade científica, a REDE oferece instrumentos de educação continuada, como congressos regionais anuais (total de cinco eventos, realizados todos os anos em diferentes regiões da América Latina) e o Programa de Educação Continuada Online (“PEC Online”), composto por cursos de atualização online sobre Medicina Reprodutiva seguidos de atividades práticas em centros selecionados.

Além disso, a REDE oferece anualmente para a comunidade científica da América Latina o Registro de Dados sobre as técnicas de reprodução assistida. Em 2001, essa publicação estudou os resultados obtidos em 102 centros de reprodução humana, completando uma tradição de 12 anos de atividades ininterruptas.

Habitualmente, os dados coletados são fontes de análises, não só para a quantificação desses procedimentos na América Latina, mas também para nortear mudanças de conduta médica, implementar programas educacionais ou compreender a evolução dessas tecnologias em função das peculiaridades do nosso meio.

Assim sendo, observou-se um crescimento de 12,9%, na América Latina, das aspirações ovarianas para coleta de óvulos, quando se comparou o registro de 2000 (12.374 aspirações) com o atual (13.971 aspirações).

Esse parâmetro teve aumento significativo tendo-se em conta as tremendas dificuldades econômicas que acometem os países da América Latina.

Entretanto, quando se observa o número de ciclos iniciados por habitantes, este é extremamente inferior ao observado em diversos países europeus. O Registro Europeu<sup>1</sup> de 1999 revelou que naquele ano foram realizados 258.460 ciclos em 22 países filiados, sendo na Dinamarca 8.793 ciclos para uma população de 5,3 milhões (1.659 ciclos/1 milhão de habitantes); na Finlândia, 7.320 ciclos para uma população de 5,2 milhões (1.407 ciclos/1 milhão de habitantes); na França, 51.868 ciclos para uma população de 58,8 milhões (882 ciclos/1 milhão de habitantes); na Holanda, 14.378 ciclos para uma população de 15,7 milhões (915 ciclos/1 milhão de habitantes); e na Suécia, 8.660 ciclos para uma população de 8,9 milhões (973 ciclos/1 milhão de habitantes).

Estimando-se a América Latina como o somatório das populações dos países que enviaram dados para o sistema de registro da REDE, teríamos um total de aproximadamente 460 milhões de habitantes e 18.598 ciclos iniciados para aplicação de técnicas de reprodução assistida, ou seja, aproximadamente 40 ciclos iniciados por milhão de habitantes. Tal dado é, no mínimo, 20 vezes inferior aos encontrados na Europa, mesmo levando-se em conta que nem todos os centros enviam seus dados para o Registro da REDE, assim como para o Registro Europeu.

Além disso, a análise individual dos ciclos iniciados por milhão de habitantes nos países que relatam seus dados para a REDE seria a seguinte: Uruguai – 110 ciclos por milhão de habitantes (371/3,36 milhões); Argentina – 97 ciclos por milhão de habitantes (3.688/37,8 milhões); Chile – 61 ciclos por milhão de habitantes (880/14,3 milhões); Brasil – 52,2 ciclos por milhão de habi-



tantes (9.160/175,3 milhões); Venezuela – 49 ciclos por milhão de habitantes (1.133/23 milhões); Colômbia – 21 ciclos por milhão de habitantes (908/43 milhões); México – 17,4 ciclos por milhão de habitantes (1.799/103 milhões); Peru – 16 ciclos por milhão de habitantes (458/27,5 milhões); Equador – 9,3 ciclos por milhão de habitantes (113/12,1 milhões); Bolívia – 7,4 ciclos por milhão de habitantes (61/8,2 milhões); Guatemala – 2,26 ciclos por milhão de habitantes (27/11,9 milhões).

Diversas hipóteses podem ser levantadas para explicar esse número reduzido de ciclos quando comparado à Europa, mas as condições sócio-econômicas da população da América Latina teriam influência fundamental.

Por outro lado, desde que as técnicas de reprodução assistida tiveram início foram surgindo preocupações sobre o bem-estar das crianças nascidas por esses procedimentos. Recentes estudos<sup>2,3</sup> têm sugerido (mas ainda não comprovaram) aumento das más-formações major em crianças nascidas por FIV e/ou ICSI.

Em 2001, os dados do Registro relatam um total de 2,5% de más-formações major em crianças nascidas por técnicas de reprodução assistida (1.419 crianças avaliadas); apesar dos diversos “bias” que podem acompanhar esse tipo de avaliação, os valores entre 2-3% assemelham-se aos obtidos na população geral. As dúvidas permanecem quanto à segurança das técnicas de FIV/ICSI, e somente poderão ser esclarecidas quando um número elevado de crianças for analisado, versus controles ideais. Essas duas discussões abrangendo diferentes pontos do Registro ilustram sua importância como fonte fundamental para um melhor conhecimento da realidade sobre as técnicas de reprodução assistida na América Latina.

Também com o objetivo de promover especialização para médicos, biólogos e profissionais relacionados à área da reprodução assistida, e intercâmbio de informações entre os centros, a REDE lançou, em agosto de 2003, o “PEC Online”. Este programa educacional é composto, no momento, por dois cursos: clínico e embriologia clínica. O “PEC Online” está voltado para atender às principais necessidades relacionadas ao aprendizado das técnicas de reprodução assistida, e sua programação teórica online complementada por aulas práticas certamente propiciarão aprimoramento profissional adequado. O “PEC Online” é destinado aos membros da REDE e demais profissionais relacionados à área.

O conjunto de todas estas atividades caracteriza a REDE como uma verdadeira escola de Biologia e Medicina Reprodutiva. Ao Brasil caberá a administração desta entidade durante os próximos quatro anos, assim como a realização de um congresso geral, marcado para a cidade de Campinas, de 7 a 10 de abril de 2005.

J.G. Franco Junior

Diretor Executivo

## REFERÊNCIAS

1. Nygren K. G., Andersen A. N. – Assisted reproductive technology in Europe, 1999.
2. Results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod, 2002; 3260-3274.
3. Hansen M., Kurinczuk J., Bower C., Webb S. – The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. N Engl J Med 2002, 346:725-730.
4. Ludwig M., Katalinic A. – Malformation rate in fetuses and children conceived after intracytoplasmic sperm injection: results of a prospective cohort study. Reprod Biomed Online 2002;5:171-178.

# Gravidez com a utilização de ovócitos vitrificados Nota prévia.

## Pregnancy Following Oocyte Cryopreservation by Vitrification: Case report

**De Martin H., White J., Peterle M., Serafini P.**

Correspondência para: Hamilton De Martin Huntington - Centro de Medicina Reprodutiva Vitória, Espírito Santo. Avenida Vitória 3175, Bairro Bento Ferreira, Vitória, Espírito Santo. Telefone (27) 325-3390, FAX-(27) 325-9564. E-mail: [huntingt@escelsa.com.br](mailto:huntingt@escelsa.com.br)

### ABSTRACT

The purpose of this paper is to report a successful pregnancy stabilishment on a ICSI program, using oocytes cryopreserved by vitrification.

**Key Words:** oocyte cryopreservation, vitrification.

### INTRODUÇÃO

O congelamento de ovócitos humanos tem sido uma meta perseguida por muitos pesquisadores pois representa a solução para uma série de problemas éticos decorrentes do congelamento de embriões, como também uma alternativa para pacientes que desejam postergar a gravidez, seja por razões profissionais ou de relacionamento, seja por problemas de saúde.

A simples adaptação dos protocolos de congelamento lento utilizados para embriões mostrou-se ineficiente no caso de ovócitos. Porcu *et al.* (1998) relatou o nascimento de seis bebês resultantes de 709 ovócitos descongelados (0.85%). Tucker *et al.* (1998), utilizando uma técnica similar conseguiu um resultado positivo em 1-2% dos mais de 400 ovócitos descongelados.

Em 1998, a equipe do Dr. Kwang Y. Cha apresentou no congresso mundial em San Francisco uma nova técnica de congelamento de ovócitos humanos, baseada

no trabalho de Martino *et al.* (1996) desenvolvido com ovócitos bovinos (Hong *et al.*, 1999). A técnica consistia no congelamento por vitrificação, utilizando como recipientes minúsculas telas de cobre (copper grids) usadas em microscopia eletrônica. Esta técnica apesar de muito eficiente apresenta elevado custo e é de difícil execução, portanto inadequada à prática diária dos centros de reprodução assistida. No mesmo ano Vajta *et al.* (1998), trabalhando com bovinos, lança a técnica OPS (open pulled straw, pipeta filamentar aberta), muito mais barata e prática que apresentou resultados satisfatórios.

No presente trabalho, relatamos uma gravidez obtida com a utilização de ovócitos congelados por vitrificação, utilizando uma adaptação da técnica de Vajta *et al.* (1998).

### DESCRIÇÃO DO CASO

#### Estimulação ovariana

Paciente com 37 anos, casada há dois anos procurou nosso serviço, em setembro de 1998, com desejo de congelar seus ovócitos devido a condições particulares e profissionais.

A estimulação ovariana consistiu na utilização de um protocolo longo com administração diária subcutânea de acetato de leuprolide (Lupron; TAP Pharmaceutical, Abbot Laboratories, North Chicago, USA) na dose de 0.5mg a partir do vigésimo terceiro dia do ciclo menstrual e continuando até o início da menstruação seguin-

te. No terceiro dia de sangramento foi realizada ultrasonografia endovaginal, dosagem sérica de estradiol e progesterona quando foi constatado a dessensibilização da hipófise acompanhada pela ausência de cistos ovarianos. O uso do Lupron foi interrompido e foi iniciado a estimulação folicular com FSH purificado (Metrodin; Laboratórios Serono, São Paulo, Brasil). Quando três folículos co-dominantes alcançaram diâmetro médio superior a 18 mm, 10.000 UI de hCG (Profasi; Laboratórios Serono, São Paulo, Brasil) foi administrado. A coleta dos ovócitos foi realizada por via transvaginal sob controle ultrasonográfico e sedação-analgésia endovenosa 35 h após a administração do hCG. Os ovócitos foram identificados e incubados em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por três horas.

## RESULTADOS

### Criopreservação dos ovócitos

Três horas após a coleta dos ovócitos, as células do cumulus e corona foram removidas por incubação durante um período de 30 a 60 segundos em HTF-Hepes (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) suplementado com 15% (v/v) de SSS (Synthetic Serum Substitute- Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) e 80 UI de hyaluronidase (Tipo VIII; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, n° H-3757), seguida por remoção mecânica com a utilização de pipetas de vidro afiladas ao fogo.

O protocolo de congelamento seguiu uma adaptação dos métodos descritos por Vajta *et al.* (1998) e Hong *et al.* (1999). Onze ovócitos maduros foram vitrificados com adição de crioprotetores em 3 etapas. A solução base era composta de HTF-Hepes suplementado com 20% de SSS. As soluções de vitrificação I, II e III eram compostas pela solução base mais a adição de 10, 20 e 40% (v/v) de etileno glicol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; E-9129), respectivamente. A solução III foi adicionalmente suplementada com 1M de sacarose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; S-9378). Primeiramente os ovócitos foram transferidos para a solução base e permaneceram por um período de 5 minutos. Em seguida, eles foram transferidos para as soluções I e II permanecendo nestas soluções por 5 e 2 minutos, respectivamente. Após esta etapa, os ovócitos foram transferidos para a solução III, aspirados para o cateter de congelamento e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido a -196° C. Ao invés de usar o OPS desenvolvido por Vajta *et al.* (1998), nós utilizamos o cateter Tom Cat (Sherwood Medical, St Louis, MO, USA) como recipiente. A etapa III, incluindo o carregamento do cateter durou no máximo 60 segundos. Toda a fase de adição de crioprotetores se processou à temperatura ambiente.

### Descongelamento e Fertilização

Em março de 2001 (30 meses após), os 11 ovócitos foram descongelados segundo o método de Hong *et al.* (1999). O conteúdo dos cateteres contendo os ovócitos vitrificados foi transferido para soluções com concentrações decrescentes de sacarose (1 M, 0.5M, 0.25M e

0.125M), mantidas aquecidas a 37°C, em intervalos de 2.5 minutos. Em seguida, os ovócitos foram lavados em três placas adicionais contendo o meio base. Após isto, os ovócitos foram transferidos para placas de cultivo contendo HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) suplementado com 15% de SSS, até o momento da fertilização. Utilizou-se a técnica da injeção única de espermatozóide no citoplasma oocitário (ICSI) convencional com o corpúsculo polar posicionado às 12 horas.

## CULTIVO

Após a injeção dos espermatozóides, os ovócitos foram cultivados em HTF suplementado com 15% de SSS a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> quando os pré-embriões foram transferidos para a paciente no estágio de 4 células.

De 11 ovócitos vitrificados, 5 resistiram ao descongelamento (45.5%), ou seja, apresentavam zona pelúcida intacta, citoplasma claro e translúcido. Estes 5 ovócitos foram submetidos à ICSI e 4 apresentaram dois pró-núcleos de aspecto normal após 18 horas de desenvolvimento *in vitro* (80%). Quatro pré-embriões, no estágio de 4 células, foram transferidos para o útero da paciente, o que resultou no desenvolvimento de um feto aparentemente normal, no presente momento no estágio de 12 semanas, com translucência nucal normal (1.8 mm).

## DISCUSSÃO

A criopreservação de ovócitos humanos ainda representa um desafio, apesar dos esforços dos pesquisadores desde o primeiro relato de Chen *et al.* (1986). Os ovócitos são mais sensíveis ao processo de congelamento do que os embriões. Todos os ovócitos maduros são vulneráveis à crio-injúria porque o fuso que mantém os cromossomos na placa metafásica despolimeriza com a diminuição da temperatura (Eroglu *et al.*, 1998). Os protocolos de congelamento lento podem ser prejudiciais aos ovócitos por proporcionarem longos períodos de exposição à baixas temperaturas. Sendo assim, procedimentos que utilizam o congelamento ultra-rápido poderiam ser uma boa alternativa (Shaw *et al.*, 2000).

As primeiras tentativas de vitrificação de ovócitos humanos não obtiveram resultados satisfatórios, possivelmente devido aos efeitos tóxicos das altas concentrações de crioprotetores (Hunter *et al.*, 1995). Mesmo a utilização de crioprotetores menos tóxicos e a diminuição do tempo de exposição aos mesmos, não foram suficientes para viabilizarem a vitrificação em palhetas (straws) (Chen *et al.*, 2000).

Martino *et al.* (1996) propôs que a diminuição do volume de solução vitrificada e o concomitante aumento da taxa de resfriamento ajudariam os ovócitos a ultrapassarem a temperatura mais crítica, que seria entre +15°C e -15°C. Estratégias para a redução do volume, tais como o uso das telas de cobre (Hong *et al.*, 1999) ou fio de nylon em laço (cryoloop) (Lane *et al.*, 1999), apesar de efetivas são caras e de difícil execução. A técnica OPS,

por utilizar um recipiente barato e de fácil manuseio, mostrou-se prática e efetiva, tanto no congelamento de ovócitos bovinos (Martino *et al.*, 1996), como no congelamento de ovócitos humanos (Kuleshova *et al.*, 1999). No presente trabalho relatamos uma gravidez decorrente da utilização de ovócitos vitrificados através de uma adaptação da técnica OPS. As taxas de sobrevivência (45,5%), fertilização (80%) e clivagem (100%) se aproximam das apresentadas por Kuleshova *et al.* (1999), de 65%, 66,7% e 50%, respectivamente. Este relato confirma o potencial do uso da vitrificação de ovócitos para pacientes de programas de FIV; seja antes dos tratamentos de radioterapia ou quimioterapia, ou no caso de pacientes que desejam retardar a gravidez por outras razões, como por exemplo para fins de doação quando o desenvolvimento endometrial da receptora não foi sincronizado ao desenvolvimento folicular da doadora.

### RESUMO

O propósito deste trabalho é relatar a ocorrência de uma gravidez de feto único em programa de ICSI com a utilização de ovócitos criopreservados pelo método de vitrificação.

**Unitermos:** congelamento de ovócitos, vitrificação.

### REFERÊNCIAS

- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, i, 884-886, 1986.
- Chen S., Lien Y., Chao K. *et al.* - Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification in straws. *Fertil. Steril.* 74: 804-808, 2000.
- Eroglu A., Toth T. L., Toner M. *et al.* - Alteration of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil. Steril.*, 69: 944-957, 1998.
- Hong S. W., Chung H. M., Lim, J. M. *et al.* - Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of of thawing methods. *Fertil. Steril.* 72: 141-146, 1999.
- Hunter J. E., Fuller B. J., Bernard A. *et al.* - Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum. Reprod.*, 10: 1184-1188, 1995.
- Lane M., Schoolcraft, W. B. and Gardner D. K. - Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril.*, 72, 1073-1078, 1999.
- Kuleshova L., Gianaroli L. Magli C., *et al.* - Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case Report. *Hum Reprod.*, 14: 3077-3079, 1999.
- Martino A., Songasen N., Leibo S. P. - Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod.*, 54: 1059-1069, 1996.
- Porcu E., Fabri R., Seracchioli R., *et al.* - Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Hum. Reprod.*, 13: 124, 1998.
- Shaw J. M., Oranratnachai A., Trounson A. O. - Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.*, 53: 59-72, 2000.
- Tucker M. 1., Morton P. C., Wright G., *et al.* - Clinical application of human egg cryopreservation. *Hum. Reprod.* 13: 3156-3159, 1998.
- Vajta G., Holm P., Kuwayami M. *et al.* - Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries in bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 51: 53-58, 1998.

# Nascimento de feto a termo após congelamento de oócitos.

Born of fetus to term after egg freezing

**Azambuja R.<sup>1</sup>, Stachecki <sup>1,2</sup>, Badalotti M.<sup>1</sup>, Michelin<sup>1</sup>; Petracco A.<sup>1</sup>**

*1 Fertilitat- Centro de Medicina Reprodutiva. Av. (piranga 6690/801.*

*CEP: 90510-000 - Porto Alegre, R.S. - Brasil  
Fone/Fax: 51-33391142. fertilitat@zaz.com.br  
2 Institute for Reproductive Medicine & Science. St. Barnabas Medical Center. West Orange, NJ 07052, USA*

## ABSTRACTS

*The cryopreservation of eggs allows the storage of genetic material, specially in situations here the ovarian function is compromised such as in radio and quimiotherapy, and, also avoids ethical dilemas about embryo storage and destiny, while semen and embryo freezing are very well known and established reporting excelent results worldwide, the oocyte cryopreservation remains to be completely elucidated.*

*A couple, she is 31 and him is 38 years old, with infertility by severe oligospermy, following ICSI, returned to the clinic in order to try a new gestation using then the frozen eggs. The endometium was prepared with 17b Estradiol (Estrofenâ - Medley - Brasil. Three days before the transfer, the patient started using oral progesterone 600mg/day (Utrogestanâ - Enila- Brasil). Two days before the transfer the 8 oocytes were thawed. Six oocytes survived and 5 were inseminated by ICSI. Obtained 100% fertilization and cleavage. In the second day 4 embryos were transferred, 3 with 2 cells and 1 with 3 cells, all grade II. The homonal support was maintained with 10mg/day of 17b Estradiol and 600mg/day of progesterone orally. Six weeks of gestation, a uestational sac was observed with a fetus with fetal heart beat. The hormonal therapy were maintained until 12 weeks of gestation. A cesarean section occurred with 38 weeks of gestation. The baby - girl was born with 2880 grams, and measured 48,5 cm,*

*with Apgar of 9 in the first and fifth minute of age. After 30 days of age the child weighted 3570 gr with 54 cm of length. At the physical examination realized 30 days after born the girl showed all and perfect signs.*

*Although the number of children born using egg cryopreservation is still low, the advantages are clear. The protocol used here lias the best chances to the eggs to survive when compared to others in the literature. Specially, because it was possible to obtain high rates of survival following thawing, as such as high rates offertilization.*

**Key words:** oocytes, freezing, pregnancy human

## INTRODUÇÃO

As modernas técnicas de criopreservação têm permitido reformular algumas abordagens no manejo das técnicas de Reprodução Assistida. Enquanto a criopreservação de espermatozóides e embriões humanos está suficientemente estabelecida permitindo excelentes resultados em todo o mundo, a criopreservação de oócitos evolui a passos lentos e o seu domínio, permanece como um objetivo a ser alcançado. A criopreservação de oócitos permite o prolongamento da capacidade reprodutiva pelo armazenamento de material genético fertilizável, especialmente em situações com risco de comprometimento da função ovariana, tais como radio e quimioterapia, e também evita os dilemas éticos quanto ao destino dos embriões armazenados.

As primeiras gestações oriundas de oócitos congelados foram descritas há aproximadamente 16 anos por Chen (1986) e AlHasani et al. (1987). Novas publicações

incluindo nascimentos se tornaram raras. Recentemente, novas descrições de técnicas de congelamento oocitário foram propostas com a intenção de torná-las mais efetivas e consistentes (Tucker et al., 1996, Porcu et al., 1997 Stachecki et al, 1998).

Pensando na toxicidade de alguns componentes dos meios de congelamento, Stachecki et al. (1998) observaram que o uso de sais de sódio, um dos principais componentes das soluções criopreservantes durante o resfriamento e aquecimento dos embriões, pode ser incompatível com o funcionamento normal das células, quando altas concentrações de sódio resultarem deste processo. A toxicidade gerada por estes sais levou alguns autores a propor o uso da colina em seu lugar, pois a mesma não atravessa a membrana celular e consequentemente evita o aumento da concentração de cátions intracelulares, além de uma possível função de proteção da membrana (Toner et al., 1993; Stachecki et al., 1998). Desta forma, a partir dessas informações passamos a utilizar estes meios de congelamento e descongelamento nos procedimentos de criopreservação oocitária na clínica Fertilitat.

Apresentamos aqui o primeiro nascimento no Brasil de feto a termo após ICSI de óvulos previamente congelados, pois Martin et al. (2001) descreveram gravidez inédita no Brasil de feto oriundo de oócitos submetidos ao processo de vitrificação.

## RELATO DE CASO

Casal com infertilidade devido a oligospermia severa, tendo engravidado previamente com ICSI com espermatozoides do ejaculado na clínica Fertilitat, busca nova gestação pelas mesmas vias. Ela, com 31 anos de idade, e ele, com 38. Após dessensibilização hipofisária com Acetato de Leuprolide (Reliserã - Sero - Brasil) iniciada na metade da segunda fase do ciclo que antecede a FIV, a paciente foi estimulada com gonadotrofina menopáusic humana (Pergonal - Sero - Brasil). Realizou-se a foliculo-aspiração após 34 horas da aplicação de 10.000UI de HCG (Profasi 10000- Sero - Brasil). Foram recuperados 24 oócitos, dos quais 16 estavam em estágio MII e oito em estágio MI. Os oócitos, em placa de Petri, foram mantidos em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar umidificado a 37°C.

Considerando que o casal não desejava congelar embriões, foi proposto, após extensa orientação e consentimento, a inseminação de oito oócitos MII pela técnica de ICSI (Palermo et al., 1992) e o congelamento dos oito restantes que também se encontravam em estágio MII

Dos oito oócitos inseminados resultaram seis embriões com grau morfológico II, segundo Veeck et al. (1998). Foram transferidos quatro embriões no terceiro dia, utilizando-se cateter de Frydman sob visão ecográfica. Os embriões restantes não foram transferidos, devido ao alto grau de fragmentação. Doze dias após a transferência, o nível de  $\beta$ HCG foi de 52,1 mUI/dl, porém não hou-

ve evolução clínica da gestação. Os oito oócitos MII restantes foram congelados aproximadamente seis horas após a punção, segundo técnica de Stachecki et al. (1998).

Três meses após, o casal procurou a clínica para tentar nova gestação através da utilização dos oócitos congelados. O endométrio foi preparado com o uso de 17 $\beta$  Estradiol (Estrofen - Medley- Brasil), com dose inicial de 2mg ao dia, a partir do terceiro dia do ciclo. A dose máxima usada foi de 8mg ao dia até o momento em que o endométrio atingiu 11 mm de espessura pela medida de ultra-som transvaginal. Três dias antes da transferência, a paciente iniciou o uso de progesterona oral micronizada na dose de 600mg ao dia (Utrogestan- Enila- Brasil). Dois dias antes da transferência, os oito oócitos foram descongelados, segundo Stachecki et al. (1998). Seis oócitos sobreviveram ao descongelamento, dos quais, cinco foram submetidos à ICSI. Obteve-se 100% de fertilização e clivagem. No segundo dia foram transferidos quatro embriões, três deles com duas células e um com três células, todos grau II (Veeck, 1998). O embrião restante não foi transferido, devido ao alto grau de fragmentação. O suporte hormonal foi mantido com 1 Omg ao dia de 17 $\beta$  Estradiol e 600mg ao dia de Utrogestan por via oral. Treze dias após a transferência o  $\beta$ BHCG foi de 231 UI. O saco gestacional foi observado com seis semanas de gestação, no qual se visualizava feto com batimentos cardíacos. A manutenção dos hormônios foi até 12 semanas de gestação. A gestação foi interrompida por cesariana com 38 semanas de evolução. O recém-nascido pesou 2880 gramas, comprimento de 48,5 cm, índice de Apgar de 9 no primeiro e quinto minuto de vida, respectivamente. Após 30 dias do nascimento, a criança pesou 3570 gramas, com 54 cm de comprimento. Ao exame físico realizado no nascimento e aos 30 dias de vida, a menina apresentou-se normal em todos os aspectos. Observamos uma taxa de sobrevivência de 75% similar aos 73,3% observados por Porcu et al. (1999) e aos 69% relatados por Fabri *et al* (2001) para oócitos congelados no estágio de MII Já Martin et al. (2001) utilizando a técnica de vitrificação, observaram uma taxa de sobrevivência de 45,5%, com 80% de fertilização. Enquanto obtivemos 100% de fertilização, Porcu et al. (1999) e Fabri et al. (2001), observaram 45 e 58%, respectivamente. Esta diferença observada poderia ser devida aos diferentes meios de congelamento utilizados. Já a taxa de clivagem foi similar, enquanto obtivemos 100% de clivagem, Porcu et al. (1999) e Fabri et al. (2001) observaram 100% e 91 %, respectivamente, demonstrando que a clivagem não parece ser afetada pela criopreservação. Quanto ao exame físico, Porcu et al. (2000) não observaram más-formações em 13 crianças advindas de oócitos previamente congelados. Semelhante ao observado neste relato. Quintans et al. (2002), utilizando os mesmos meios de congelamento e descongelamento relatados neste trabalho, obtiveram o nascimento de duas crianças, incluindo 6 gravidezes clínicas em 13 pacientes.

Embora o número de nascimentos utilizando-se a técnica de criopreservação de oócitos ainda seja pequeno, as vantagens do seu uso são claras, conforme previamente descrito. Acreditamos que o protocolo usado neste caso proporcione melhores condições de sobrevivência embrionária do que outros descritos na literatura (Porcu et al., 1997, Fabri et al., 2001), especialmente porque foi possível obtermos uma alta taxa de sobrevivência após o descongelamento, assim como alta taxa de fertilização.

Ao submetemos este relato à publicação, contamos com outra paciente com gravidez clínica utilizando-se a mesma técnica descrita.

## RESUMO

A criopreservação de oócitos permite o prolongamento da capacidade reprodutiva pelo armazenamento de material genético fertilizável, especialmente em situações com risco de comprometimento da função ovariana, tais como rádio e quimioterapia, e também evita os dilemas éticos quanto ao destino dos embriões armazenados. Enquanto a criopreservação de espermatozoides e embriões humanos está suficientemente estabelecida, permitindo excelentes resultados em todo o mundo, a criopreservação de oócitos evolui a passos lentos e o seu domínio permanece como um objetivo a ser alcançado.

O casal, ela com 31 anos de idade e ele com 38, com infertilidade severa por oligospermia, retorna à clínica para tentar nova gestação, utilizando oócitos congelados. O endométrio foi preparado com o uso de 17 $\beta$  Estradiol (Estrofen - Medley - Brasil). Três dias antes da transferência, a paciente iniciou o uso de progesterona oral na dose de 600mg ao dia (Utrogestan - Enila- Brasil). Dois dias antes da transferência, os oito oócitos foram descongelados. Seis oócitos sobreviveram ao descongelamento, dos quais cinco foram submetidos à ICSI. Obteve-se 100% de fertilização e clivagem. No segundo dia foram transferidos quatro embriões, três deles com duas células e um com três células, todos grau II. O suporte hormonal foi mantido com 1 Omg ao dia de 17 $\beta$  Estradiol e 600mg ao dia de Utrogestan por via oral. O saco gestacional foi observado com seis semanas de gestação, no qual se visualizava feto com batimentos cardíacos. A manutenção dos hormônios foi até 12 semanas de gestação. A gestação foi interrompida por cesariana com 38 semanas de evolução. O recém-nascido pesou 2,880 gramas, comprimento de 48,5 cm, índice de Apgar de 9 no primeiro e quinto minuto de vida, respectivamente. Após 30 dias do nascimento, a criança pesou 3,570 gramas, com 54cm de comprimento. Ao exame físico realizado no nascimento e aos 30 dias de vida, a menina apresentou-se normal em todos os aspectos.

Embora o número de nascimentos utilizando-se a técnica de criopreservação de oócitos ainda seja pequeno, as vantagens do seu uso são claras. Acreditamos que o protocolo usado neste caso proporcione melhores condições de sobrevivência embrionária

do que outros descritos na literatura. Especialmente porque foi possível obtermos uma alta taxa de sobrevivência após o descongelamento, assim como alta taxa de fertilização.

Unitermos: Oócitos congelamento gravidez humana

## REFERÊNCIAS

- Al-Hasani S., Kirsch J., Diedrich K., Blanke S., Van der Vem H., Krebs D. - Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum. Reprod.* 2:695-700,1989.
- Chen C. - Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1:884-886,1986.
- Fabbri R., Porcu E., Marselia T., Rocchetta G., Venturoli S.: Flamigni C. - Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reprod.* 16:411-416, 2001.
- Lovelock J. - The protective action of neutral solutes against hemolysis by freezing and thawing. *Biochem J.* 56:265, 1954.
- Martin H., White J., Peterle M., Serafini P. - Gravidez com a utilização de ovócitos vitrificados: nota prévia. *Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida*, 5(1), 2001.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Vau Steirteghem A. - Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into the oocyte. *Lancet*, 340:17, 1992.
- Porca E., Fabbri R., Seracchioli R., Ciotti P. M., Magrini O., Flamigni C. - Birth of a healthy female after ICSI of cryopreserved human oocytes. *Fert. Steril.* 68:724-726, 1997.
- Porcu E., Fabbri R., Petracci S., Ciotti P. M., Flamigni C., - Ongoing pregnancy after cytoplasmic injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180:1044-1045, 1999.
- Porcu E., Fabbri R., Seracchioli R., De Cesare R., Giunchi S., Caracciolo D., - Obstetric, perinatal outcome and follow up of children conceived from cryopreserved oocytes. *Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, San Diego-CA. Fertility and Steril.* 74:548, 2000.
- Quintans C., Donaldson M., Bertolino V., Marazzi A, Pasqualini S. - Birth of two normal babies after in vitro fertilization of oocytes previously cryopreserved in a medium with low sodium content. *12th World Congress on In Vitro Fertilization and Molecular Reproduction.* Buenos Aires, Argentina, 16-19 March. Pp 60, 2002.
- Stachecki J. J., Cohen J., Willadsen S -Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. *Biol. Reprod.* 59:396-400,1998.
- Toner M., Carvalho E. G., Stachecki J., Fitzgerald T., Tompkins R. G., Yarmush M. L., Armant D. R. - Non equilibrium freezing of one-cell mouse embryos. Membrane integrity and developmental potential. *Biophys J.* 64:1908-1921, 1993.
- Tucker M., Wright G., Morton P., et al. - Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2 PROH and sucrose. *Human Reprod.* 11:1513-1515, 1996.
- Veeck L. L. - Preembryos with the ability to implant. In: *An atlas of human gametes and conceptuses.* Veeck, LL (ed) Parthenon, New York. pp 52-56, 1998.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs. Jacques Cohen e Steen Willadsen pelo fornecimento dos meios de congelamento e descongelamento.

2006

**The first seven days – From gametes to blastocyst and stem cell**

Serono Symposia International  
26 – 28 Abril 2006  
TAMPA, Flórida  
www.seronosymposia.org

**ESHRE 2006**

22nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology – Prague  
18 a 21 de Junho de 2006  
http://www.eshre.com

**X Congresso da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida - SBRA**

27- 29 Julho de 2006  
Hotel Windsor Barra  
Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
Informações: www.sbra.com.br  
e-mail: congressosbra2006@cmb.com.br  
JZ Congressos  
Tel.: (21) 2266 9150 / Fax: (21) 2266 9175  
Rua Guilhermina Guinle, 272 / 2º andar - Botafogo 22270-060  
Rio de Janeiro - Brasil  
www.jz.com.br

**The 8<sup>th</sup> World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility**

14 – 17 Setembro 2006  
Salvador, Bahia  
www.comtecmed.com/cogi/brazil

**XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Humana**

4 a 07 de outubro de 2006 - Curitiba - PR  
Informações - Equipe de Eventos  
Tel.: (41) 3022-1247  
E-mail - ekipe@ekipedeeventos.com.br  
http://www.sbrh.med.br

**Evocanil®** Progesterona natural micronizada. **APRESENTAÇÕES:** 100 mg. Embalagens com 30 e 60 cápsulas. **USO RESTRITO A PACIENTES DO SEXO FEMININO E ADULTAS. COMPOSIÇÃO:** Cada cápsula gelatinosa mole contém 100 mg de progesterona natural micronizada e excipientes: lecitina de soja, óleo de milho, óleo vegetal hidrogenado. **INDICAÇÕES:** Todas as insuficiências de progesterona, em particular síndrome pré-menstrual, irregularidades menstruais por problemas de ovulação, mastopatias benignas, mastodínias, esterilidade de causa hormonal por alterações na ovulação, pré-menopausa e menopausa. Ameaça de aborto ou aborto freqüente. De acordo com a posologia sugere-se a utilização da via de administração oral ou vaginal. **CONTRA-INDICAÇÕES:** Hipersensibilidade conhecida a qualquer dos componentes da formulação. Hemorragia genital de causa desconhecida. Porfíria. Otosclerose. Alterações graves da função hepática. Quadros depressivos. Herpes gestacional. Aborto incompleto. Retenção de feto morto. Tromboflebite. Hemorragia cerebral. **PRECAUÇÕES:** O medicamento deve ser utilizado com cuidado em pacientes cujas condições possam ser agravadas pela retenção de líquidos (por exemplo, hipertensão, distúrbios cardíacos ou renais, epilepsia) e naquelas com histórico de depressão, diabetes, disfunção hepática ou enxaquecas. **Gravidez e Lactação:** A utilização de progesterona não está indicada durante a lactação. **Efeito sobre a capacidade de dirigir e operar máquinas:** Deve-se tomar cuidado com o risco de sonolência e/ou sensação de vertigem relacionada ao uso da progesterona. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** O efeito da progesterona pode ser diminuído pelo uso concomitante de barbitúricos, carbamazepina, hidantoína ou rifampicina. O uso deste medicamento pode aumentar os efeitos dos betabloqueadores, teofilina ou ciclosporina. **REAÇÕES ADVERSAS:** A administração de progesterona é raramente seguida de reações adversas ou efeitos colaterais, que são, normalmente, leves. **Via oral:** Sonolência ou vertigem passageiras 1 a 3 horas após a ingestão. Nestes casos, recomenda-se diminuir a dose ou modificar o ritmo de administração: 2 cápsulas à noite ao deitar-se durante 12 a 14 dias por ciclo, ou alterar para a via vaginal. Em caso de encurtamento do ciclo menstrual ou sangramento intercorrente, atrasar o início do tratamento (por exemplo: iniciar no 19º dia do ciclo em vez do 17º dia). Estes efeitos são causados, geralmente, por superdosagem. **Via vaginal:** Não foi observada intolerância local durante os estudos clínicos. Nenhum efeito secundário geral foi relatado nos estudos clínicos na posologia recomendada. **POSOLOGIA:** Respeitar estritamente as posologias preconizadas. **CONDUTA NA SUPERDOSAGEM:** Em algumas pacientes, a posologia média pode ser excessiva, seja pela persistência ou reaparição de uma secreção endógena instável de progesterona ou por uma sensibilidade particular ao produto. Nestes casos, deve reduzir-se a posologia em quantidade e em duração. Se for observada sonolência ou sensação de vertigem passageira, deve-se reduzir a dose. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.**  
Reg. MS - 1.2214.0056 Fabricado por R. P. Scherer – EUA. 2725 Scherer Drive North, St. Petersburg – Flórida. Importado e embalado por: ZODIAC PRODUTOS FARMACÊUTICOS S/A., subsidiária de Tecnofarma Internacional. Sede: Rua Suíça, 3.400 - Pindamonhangaba – SP. C.N.P.J. 55.980.684/0001-27 - Indústria Brasileira. SAC: 0800-166575