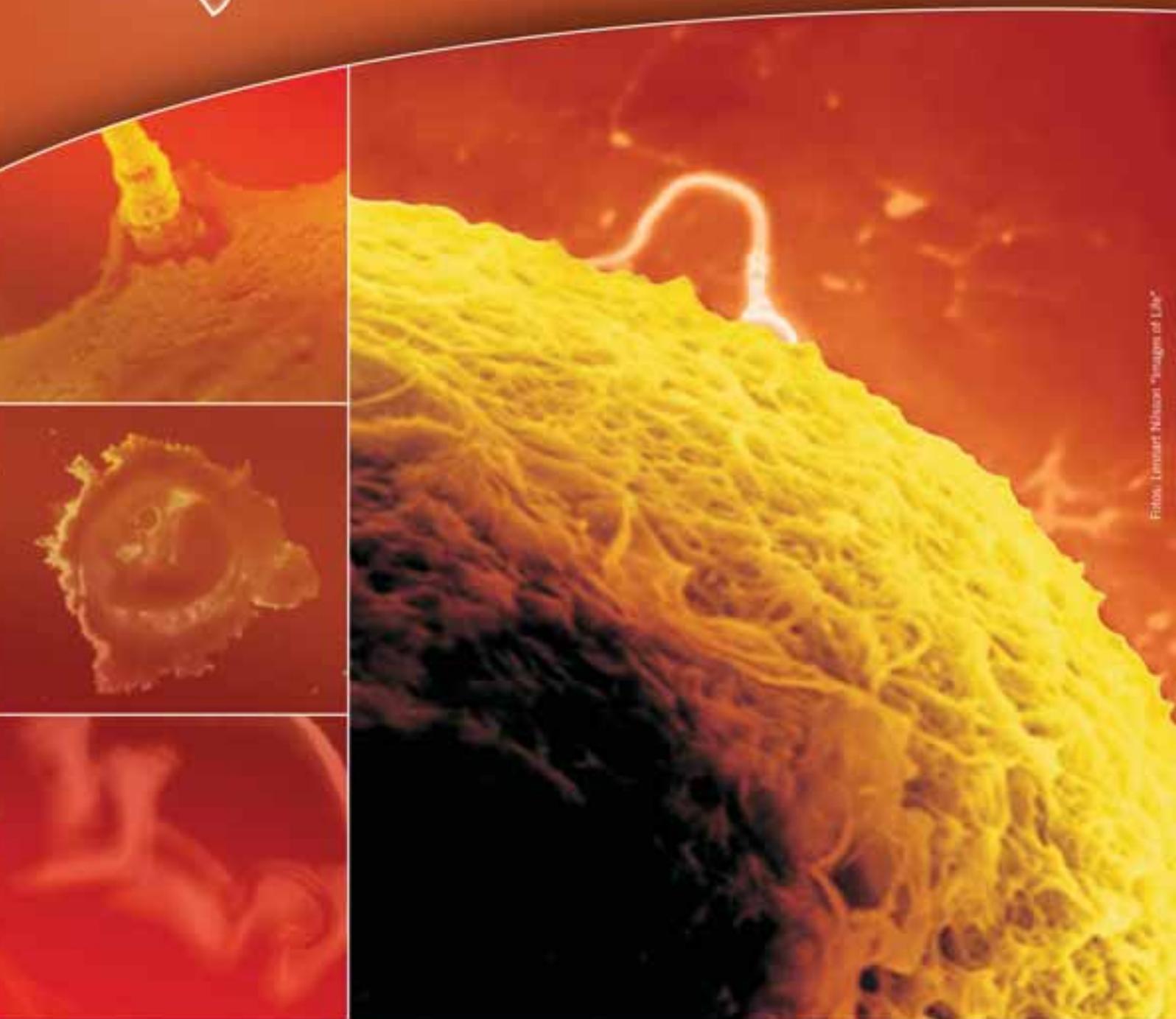


Volume 13 | Número 2 | Abr-Mai-Jun 2009 | ISSN 1517-5693

JBRA

JORNAL BRASILEIRO DE  
**REPRODUÇÃO**  
A S S I S T I D A



Fotos: Lemdard Nilsson - "Images of Life"



# Luveris®

## alfalutropina



A suplementação com r-hLH pode determinar benefícios sobre a evolução do tratamento para mulheres acima de 35 anos de idade<sup>1</sup>

Possibilita a individualização do tratamento<sup>2</sup>

**LUVERIS® 75 UI (alfalutropina) - USO ADULTO - Para uso subcutâneo.** Indicação: Luveris® em associação com uma preparação de hormônio foliculo estimulante (FSH), é recomendado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Luveris® deve ser administrado segundo um esquema de injeções diárias, simultaneamente ao FSH. Dado que estas pacientes são amenorréicas e têm uma reduzida secreção de estrogênios endógenos, o tratamento pode ser iniciado a qualquer momento. **Contraindicações:** hipersensibilidade às gonadotrofinas ou a qualquer dos excipientes; carcinoma do útero, ovário ou mama; tumores ativos, não tratados, do hipotálamo e da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos de etiologia desconhecida; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida. **Precauções e advertências:** Não deve ser utilizado quando não é possível a obtenção de uma resposta efetiva, tais como, falência ovariana, má formação dos órgãos sexuais ou tumores fibróides do útero incompatíveis com a gravidez. As pacientes devem ser examinadas em relação a hipotireoidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise. Risco aumentado de hiperestimulação, podendo conduzir a um grave quadro clínico, caracterizado por cistos ovarianos de grandes dimensões, que podem romper. Uma excessiva resposta ovariana raramente origina uma hiperestimulação significativa, exceto se houver administração de hCG para induzir a ovulação. Portanto, é prudente não administrar hCG nestes casos e recomendar à paciente a abstenção de relações sexuais, ou métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Recomenda-se a monitorização com ecografia, bem como medições do estradiol. Em pacientes submetidas à indução de ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é maior, em comparação à concepção natural. Luveris® não deve ser administrado durante a gravidez e a amamentação, em idosos, crianças e outros grupos de risco. Não se conhecem os efeitos da superdosagem com alfalutropina, no entanto, pode-se admitir a ocorrência da síndrome da hiperestimulação ovariana. **Reações adversas:** A alfalutropina é utilizada em associação com alfafolitropina, sendo difícil atribuir efeitos indesejáveis a qualquer das substâncias utilizadas. Foram relatadas reações ligeiras e moderadas no local da injeção (equimose, dor, rubor, prurido ou edema). Não foram relatadas reações graves no local da injeção nem reações alérgicas sistêmicas após a administração de Luveris®. A síndrome de hiperestimulação ovariana foi observada em menos de 6% das pacientes tratadas com Luveris®. Não foi relatada síndrome de hiperestimulação ovariana grave. Podem ocorrer tromboembolia, torsão dos anexos (uma complicação do aumento do volume ovariano) e hemoperitônio. Pode também ocorrer gravidez ectópica, especialmente em mulheres com história de doença tubária anterior. Reações mais comuns: reações no local da injeção, cefaléia, sonolência, náuseas, dor abdominal, dor pélvica, síndrome de hiperestimulação ovariana, cistos ovarianos, dor nas mamas. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente, avaliada pela medição das dimensões do foliculo por meio de ecografia e do nível de estrogênios. Inicia-se com a administração diária de 75 UI de alfalutropina, por até 3 semanas, em associação com 75-150 UI de FSH. Se um aumento da dose de FSH for considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado, de preferência, após intervalos de 7-14 dias e, de preferência, com incrementos de 37,5-75 UI. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de hCG, 24-48 horas após as últimas injeções de Luveris® e de FSH. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG, bem como no dia seguinte. Como alternativa, pode ser efetuada uma inseminação intra-uterina. Pode ser necessário um suporte da fase lútea, uma vez que a ausência de substâncias com atividade luteotrópica (LH / hCG) após a ovulação pode conduzir a uma falência prematura do corpo lúteo. Se for obtida uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e o hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Modo de Usar:** Para administração subcutânea única e imediata após abertura e reconstituição. Luveris® pode ser misturado com Gonal-f® monodose em 1 ml de solvente, e co-administrado numa injeção única. Neste caso Luveris® deve ser reconstituído em primeiro lugar e depois utilizado para reconstituir o pó de alfafolitropina. Os produtos não utilizados ou os resíduos devem ser descartados. **Conservação:** Conservar em temperatura abaixo de 25°C. Proteger da luz. Nessas condições o medicamento é estável por 36 meses. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Reg MS 1.0089.0354

**Referência:** 1. Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH. RBM On-line 2004; p.1204. 2. Shoham Z, Balen A, Patel A et al. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified follicle-stimulating hormone in hypogonadotrophic hypogonadism patients. Fertil Steril 1991; 56: 1048-1053.

**Contraindicação:** pacientes com carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Luveris® não deve ser coadministrado a outros medicamentos na mesma seringa, exceto Gonal-f® na apresentação monodose. A PERSISTIREM OS SINTOMAS O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.



# JBRA JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

## CORPO EDITORIAL

Editor	Instituição	Região/ País
Maria do Carmo Borges de Souza	G&O Barra/ UFRJ	RJ Brasil
Editor Adjunto		
Paulo Franco Taitson	IRH / PUC MG	MG Brasil
Consultor Editorial		
José Gonçalves Franco Jr	CRH	SP Brasil
Assistente Editorial		
Bruno Borges		RJ
Editores Associados		
Edson Borges Jr	Fertility / Inst Sapientiae	SP Brasil
João Batista A Oliveira	CRH	SP Brasil
Selmo Geber	Origen / UFMG	MG Brasil
Weydson Barros Leal	UFPE	PE Brasil
Conselho Editorial		
Adelino Amaral Silva	Gênesis	DF Brasil
Alessandro Schuffner	Conceber	PR Brasil
Álvaro Petracco	Fertilitat/ PUC RS	RS Brasil
Ana Cristina Allemand Mancebo	G&O Barra	RJ Brasil
Anne R Greenlee	OHSB	EUA
Aroldo Camargos	UFMG	MG Brasil
Bela Zausner	Gênese	BA Brasil
Bruno Scheffer	IBRRA	BH Brasil
Carlos André Henriques	G&O Barra	RJ Brasil
César Calfatti	Clin Los Dominicos	Chile
Claudia Borrero	Conceptum	Colombia
Claudia G Petersen	CRH	SP Brasil
Cláudio Chillik	CEGYR	Argentina
Condesmar Marcondes Filho	Nucl Santista RH	SP Brasil
David Vantman	CER	Chile
Dirceu H Mendes Pereira	CRRAbdelm	SP Brasil

Eduardo Pandolfi Passos	SEGIR / UFRGS	RS Brasil
Ernesto Gallardo Lozano	IMER	México
Fabio Firmbach Pasqualotto	Conception	RS Brasil
Fernando Zeghers-Hochschild	Clin Las Condes	Chile
Francisco Risquez	Clin La Trinidad	Venezuela
Humberto Ikuo Shibasaki	UFMT	MT Brasil
Jorge Blaquier	Fertilab	Argentina
João Pedro Junqueira Caetano	Pró-Criar/Mater Dei	MG Brasil
Joaquim Roberto C Lopes	Cenafert	BA Brasil
Jonathas Borges Soares	Projeto Alfa	SP Brasil
Jorge Hallak	Androscience	SP Brasil
Juan Manuel Montoya	Conceptum	Colombia
Ivan Valencia Madera	CEMEFES	Equador
Karen Sermon	VUB	Bélgica
Leila Montenegro S Farah	Fertility	SP Brasil
Lídio Jair Ribas Centa	Androlab/ UFPR	PR Brasil
Luiz Fernando Dale	C Medicina da Reprodução	RJ Brasil
Madalena Caldas	GERAR	PE Brasil
Marcos Sampaio	Origen	MG Brasil
Mariângela Badalotti	Fertilitat	RS Brasil
Marilena Correa	UERJ	RJ Brasil
Mario Cavagna	H Perola B/ I Sapientiae	SP Brasil
Marisa Decat de Moura	IBBRA/Mater Dei	BH Brasil
Newton E Busso	Unifert	SP Brasil
Paulo Serafini	Huntington/ USP	SP Brasil
Renzo Antonini Filho	I Saude da Mulher	MG Brasil
Ricardo Melo Marinho	Mater Dei	MG Brasil
Roberta Wonchockier	Projeto Alfa	SP Brasil
Roberto Coco	Fecunditas	Argentina
Rose Marie M Melamed	Fertility	SP Brasil
Sidney Glina	Hosp Albert Einstein	SP Brasil
Silvana Chedid	Chedid-Grieco	SP Brasil
Renato Fanchin		França

**Diretoria da SBRA - 2009/2010**

**Presidente:** Adelino Amaral Silva  
www.sbra.com.br

**Departamento de Publicações**

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

**Presidente:** Adelino Amaral Silva

**1º Vice Presidente:** Bela Zausner

**2º Vice Presidente:** Condesmar Marcondes de Oliveira

**1º Secretário:** Newton Eduardo Busso

**2º Secretário:** Lidio Jair Ribas Centa

**1º Tesoureiro:** Hitomi Miura Nakagava

**2º Tesoureiro:** Marcelo de Pontes Rocha

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

**Diretor de Comunicação:** Dr. Paulo Taitson

**Comissão de Atividades Internacionais:**

Marcos Sampaio  
Ricardo Baruffi

**Departamento Científico:**

Mario Cavagna  
Fabio Pasqualotto  
Eduardo Motta

**Comissão de Ética e Defesa de Prerrogativa:****Efetivos:**

José Gonçalves Franco Junior  
Edson Borges Junior  
Selmo Geber

**Suplentes:**

Maria do Carmo Borges de Souza  
Eduardo Pandolfi Passos  
Alvaro Pigato Ceschin

**Comissão de Educação Continuada:**

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

**Conselho Fiscal:****Efetivos:**

Luiz Fernando Dale  
Joaquim Roberto Costa Lopes  
Edilberto de Araújo Filho

**Suplentes:**

Mylena Naves de Castro da Rocha  
Assumpto Iaconelli  
Pedro Paulo Roque Monteleone

**Conselho Consultivo:**

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

**Comissão de Comunicação:**

Paulo Franco Taitson  
Lia Ferragut  
César Cornel

**Relações Governamentais:**

Rosaly Rulli Costa  
Hitomi Miura Nakagava

**PGD:**

Coordenador: Selmo Geber  
Assumpto Iaconelli Junior  
Leila Farah  
Mariana Faller

**DST:**

Caio Parente Barbosa  
Waldemar Diniz de Carvalho  
Paulo Naud

**Endoscopia:**

**Coordenador:** Maria Cecilia Erthal  
Paulo Beltrame  
Sergio Galbinsky

**Endometriose:**

**Coordenador:** Vilmon de Freitas  
Elvio Tognotti  
João Pedro Junqueira

**Enfermagem:**

**Coordenadora:** Suzana Zachia  
Renata Trigo  
Jacqueline Aranki

**Psicologia:**

**Coordenadora:** Ana Rosa

**Andrologia:**

**Coordenador:** Edson Borges

**Projetos Multicentricos:**

Franco Junior

**Comissão de Normatização - ANVISA e SELO SBRA**

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

**Endocrinologia:**

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

**PRESIDENTES DA SBRA**

José Gonçalves Franco Junior **1996-1998 e 1999-2000**

Edson Borges Junior **2001-2002**

Selmo Geber **2003-2004**

Maria do Carmo Borges de Souza **2005-2006**

Eduardo Pandolfi Passos **2007-2008**

Adelino Amaral Silva **2009-2010**

## INFORMAÇÕES GERAIS

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

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

**3.** As Instruções para Autores do J Bras Rep Assist incorporam as recomendações dos *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. A versão completa do texto está disponível em [www.icmje.org](http://www.icmje.org). Manuscritos que estiverem em desacordo com as instruções aqui apresentadas serão devolvidos para a incorporação de ajustes antes da avaliação pelo Conselho Editorial.

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

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

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

**7.** Para textos que forem aceitos para publicação, uma declaração, assinada por todos os autores deverá ser enviada à revista, contendo as seguintes informações: a) o manuscrito é original; b) o manuscrito não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no J Bras Rep Assist; c) todos os autores participaram ativamente na elaboração do estudo e aprovaram a versão final do texto; d) situações de potencial conflito de interesse (financeiro ou de outra natureza) estão sendo informadas; e) foi obtida aprovação do estudo pelo comitê de ética da instituição a qual o trabalho está vinculado (para artigos que relatam dados de pesquisa experimental); f) foi obtido consentimento informado dos pacientes incluídos no estudo (quando aplicável). As informações sobre a aprovação do estudo por comitê de ética e a obtenção de consentimento informado também devem constar na seção Métodos do artigo.

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

## TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

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

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

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

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

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

## PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

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

Síglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; após a primeira ocorrência, somente a sigla deverá ser utilizada. No resumo, o uso de siglas deve ser evitado. Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses.

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

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

## PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

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

## RESUMO E ABSTRACT

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

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

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

### 1. Artigo de periódico

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

### 2. Livro

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

### 3. Capítulo de livro

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

### 4. Artigo de revista eletrônica

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

### 5. Artigo publicado na Internet:

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

### 6. Site

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

### 7. Software

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

## TABELAS E FIGURAS

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

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

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

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

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

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

## ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

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

Se a submissão por email não for possível, duas cópias do texto e figuras devem ser enviadas para o endereço a seguir:

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

---

**Editorial****Redlara y JBRA**

Ernesto Gallardo Lozano

8

---

**Artigo Original****Prospective randomized study to compare the effects of embryo culture performed in an incubator Class 100 with High Efficiency Particulate Air filter (HEPA) plus Volatile Organic Compounds (VOC) filter on outcome measures of ICSI cycles**

Ana Cristina Allemand Mancebo, Maria do Carmo Borges de Souza, Carlos André Henriques, Marcelo Marinho de Souza, Fernanda Freitas Oliveira Cardoso, Haydée Castro Neves Santos

9

**Influência da retirada de fragmentos de embriões nas taxas de gravidez em pacientes submetidas as técnicas de reprodução assistida**

Selmo Geber, Renata Bossi, Fábio Nascimento, Georgina Hastenreiter, Cintia Black, Marcos Sampaio

13

**Morfología Espermática Estricta: influye realmente en los resultados de FIV?**

Gallo A, Ducatelli ME, Mastellari R, Gismondi F, Neuspiller N, Coco R

18

**Transferência de embriões cultivados independentemente em meios de cultura essencial e sequencial melhora as taxas de gravidez em tratamentos com técnicas de reprodução assistida.**

Selmo Geber, Fábio Nascimento, Renata Bossi, Fernando Guimarães, Marcello Valle, Marcos Sampaio

24

**Comparação Entre o Período de Abstinência Sexual e Diferentes Parâmetros Seminais em Pacientes de uma Clínica de Reprodução Assistida e de um Hospital de Porto Alegre - RS**

Rivaroli MS, Frantz G, Bos-Mikich A, Batista MR, de Fraga LS

28

---

**Artigo de Revisão****Endometriose e Infertilidade: Causa ou Consequência?**

William Kondo, Rui Alberto Ferriani, Carlos Alberto Petta, Maurício Simões Abrão, Vivian Ferreira do Amaral

33

---

**Relato de Caso****Efeitos em longo prazo sobre a criopreservação de espermatozóides humanos: 17 anos**

Paulo Franco Taitson, Antonio Mourthé Filho, Antonio Rafael Lemos Faria, Ubiratan Barros de Melo, Fernanda Karoline Lemos da Silva, Maria do Carmo Borges de Souza

39

---

**Eventos**

41

## Redlara y JBRA

La Red Latinoamericana de Reproducción Asistida es una organización científica y educacional que fue establecida en 1995 y hoy reúne a 140 centros que realizan procedimientos de reproducción asistida en toda Latinoamérica. El principal objetivo de la Red-Lara desde siempre ha sido promover la información y especialización a la comunidad científica por medio de sus programas de educación continuada, del Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida y del Programa de Acreditación de centros. Es un gusto especial que el JBRA pueda publicar los trabajos del 9º Taller General de Cancún en ese primer momento. Vemos con muy buenos ojos esta unión y esperamos que pueda resultar más importante cada día. Nuestra familia latinoamericana se fortalece y nuestros lazos se agrandan.

**Ernesto Gallardo Lozano**

Presidente de la Redlara

# Prospective randomized study to compare the effects of embryo culture performed in an incubator Class 100 with High Efficiency Particulate Air filter (HEPA) plus Volatile Organic Compounds (VOC) filter on outcome measures of ICSI cycles

Estudo prospectivo e randomizado para comparar os efeitos da cultura de embriões realizada em incubadora Classe 100 equipada com filtro HEPA VOCs nos resultados dos ciclos de ICSI

Ana Cristina Allemand Mancebo, Maria do Carmo Borges de Souza, Carlos André Henriques, Marcelo Marinho de Souza, Fernanda Freitas Oliveira Cardoso, Haydée Castro Neves Santos

G&O Ginecologia e Obstetrícia da Barra – Rio de Janeiro - Brasil

Apresentado como Tema Livre no 9º Taller General da Red Latinoamericana de Reproducción Asistida – Cancún – 23/25 abril 2009

## RESUMO

Os laboratórios têm instalado filtros especializados nas incubadoras com o objetivo de melhorar a qualidade do ar. Objetivo: Determinar se a cultura de embriões realizada em incubadora Classe 100 equipada com filtro HEPA VOCs melhora os resultados dos ciclos de ICSI.

Métodos: Neste estudo prospectivo e randomizado foram incluídas pacientes com idade  $\leq 39$  anos que realizaram transferência de EB a fresco no período de setembro de 2007 a janeiro de 2009. Foram incluídos 114 ciclos. A cultura foi realizada em incubadora equipada com filtro HEPA VOCs para partículas e compostos voláteis (Grupo 1 = 53) ou em incubadora idêntica equipada apenas com filtro HEPA (Grupo 2 = 61). Os *end points* analisados foram número de embriões de boa qualidade transferidos ( $\geq 8$  células G1/G2) e gestação clínica.

Resultados: Houve 42 transferências no grupo 1 e 55 no grupo 2. Nos grupos 1 e 2 não houve transferência em 11 e 6 ciclos respectivamente devido a falha na captação ou a risco de hiperestímulo. Os 2 grupos eram semelhantes quanto a idade, total de gonadotrofinas, duração do estímulo, espessura endometrial no dia do hCG e nº de oócitos MII aspirados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao nº de oócitos MII aspirados, nº de embriões de boa qualidade transferidos, taxas de fertilização e clivagem. A taxa de gestação clínica embora maior no grupo 1 não foi estatisticamente significativa

Conclusão: Os dados deste estudo demonstraram resultados semelhantes quando a cultura de embriões foi realizada em incubadora equipada com filtro HEPA VOCs.

Palavras-chave: ICSI, embriões, oócitos, fertilização *in vitro*, qualidade do ar

## ABSTRACT

Many laboratories have installed specialized incubator filtration units with the intent of enhancing air quality. The aim of this study is to determine whether an incubator Class 100 with HEPA VOC filter enhance the outcome measures in ICSI cycles.

This prospective, randomized study recruited patients of age  $\leq 39$  years who underwent fresh ICSI cycles from September 2007 to January 2009. 114 ICSI cycles were included. Embryo culture was performed either in an incubator equipped with HEPA filter plus carbon-activated for volatile organic compounds (Group I = 53) or in an identical incubator Class 100 with HEPA filter only without carbon activated (Group II = 61). Main outcome measures were nº of good quality embryos transferred ( $\geq 8$  cells G1/G2) and clinical pregnancy.

A total of 42 transfers were performed in Group I and 55 in Group II. There were 11 cycles without transfers in Group I and 6 in Group II due to either oocyte retrieval failure or OHSS risk.

The two groups were similar in terms of age, total amount of gonadotropins, duration of stimulation, endometrial thickness on the hCG day, nº of metaphase II oocytes retrieved per patient. No significant difference was found neither for the mean nº of MII oocytes nor for fertilization and cleavage rates. The mean nº of embryos transferred and top quality embryos transferred were similar. Clinical pregnancy was not significantly higher in Group I.

The data of this study has demonstrated no significant differences between the two groups in all parameters analyzed.

**Keywords:** ICSI, embryo, oocytes, fertilization in vitro, air quality

## INTRODUCTION

Many of the environmental conditions for in vitro embryo production, have been relatively standardized with very little change in the past years in vitro production systems (Brinster, 1963; Bavister 1995). Laboratory air quality and IVF outcome have been receiving considerable attention because human embryo development in vitro is considered to be related, among other factors, to the conditions of the culture, especially to the air quality in the in vitro fertilization laboratory and in the adjacent semen collection and preparation rooms. Many laboratories have installed specialized incubator filtration units with the intent of enhancing air quality for embryo cultu-

re. As these filtration units are expensive; hence, it should be prudent for programs to determine whether they are effective in their own laboratory environments as the efficacy of this approach is not yet conclusive (Battaglia et al., 2001).

International Congresses of Reproductive Medicine, have been systematically presenting correlation of the presence of pollutants in the air of the IVF laboratory to the fall in the implantation rates (Worrilow et al., 2001, 2002) and to a lower formation of in vitro blastocyst when exposed to volatile organic compounds (VOCs) (Johnson et al., 1993). It has been shown that the use of activated carbon in the incubators reduces the concentration of VOCs (Weissenborn et al., 2001).

At least five studies discuss this topic in full detail including one of our own group (Cohen et al., 1997, 1998; Hall et al., 1998; Boone et al., 1999; Souza et al. 2009). To date, however, the influence the quality of ambient air and gas environment in incubators can have on the embryo development is still little recognized.

It is known that mammals are protected on a large or small scale against environmental agents to which they are exposed, through their epithelial, immune, and digestive systems. Nevertheless, classic studies on toxicology (Klinefelter et al., 1993) do not apply to oocytes and in vitro embryos, since in this situation, mechanisms of absorption of toxic substances can work more directly on the oocyte with effects on the embryo that will come from this oocyte after fertilization.

In vitro fertilization clinics and laboratories are usually located in urban centers with a high rate of environmental pollution or close to industrialized areas. Considering that around 95% of the internal air in the incubator comes from the opening of the door and only 5% from the CO<sub>2</sub> cylinder used to supply the incubator, it is supposedly correct to say that the presence of pollutants from different originating sources present in the room could interfere in the in vitro embryo development.

To better understand the effects of air quality used in the culture of human embryos, this prospective, randomized study compared the results obtained in the ICSI cycles when embryo culture was performed either in an incubator Thermo Forma®, model 3110, serial II, Class 100 equipped with HEPA filter (High Efficiency Particulate Air) plus carbon-activated for volatile organic compounds (HEPA VOC filter) or in an identical incubator with HEPA filter only without carbon activated

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

This prospective, randomized comparative study involved recruitment of patients of age  $\leq 39$  years who underwent fresh ICSI cycles from September 2007 to January 2009. A hundred and fourteen ICSI cycles were included. Embryo culture was performed either in an incubator Thermo Forma®, model 3110, serial II, Class 100 equipped with HEPA filter (High Efficiency Particulate Air) plus carbon-activated for volatile organic compounds-HEPA VOCs filter (Group I = 53) or in an identical incubator with HEPA filter only without carbon activated (Group II = 61). One incubator had HEP filter with 99.99% efficiency in removing particulate contaminants  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  plus volatile organic compounds (VOC) filter. The other incubator had only HEPA filter with 99.99% efficiency in removing particulate contaminants  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  without VOC filter. The Institutional review board of Centro Médico BarraShopping approved the study protocol and all patients gave an oral consent for data utilization as they had already signed a full written consent for ART procedures.

### Ovarian stimulation

Ovarian stimulation was carried out using recombinant FSH (Out et al., 1996) (Gonal-F, Serono Laboratoires). It was initiated on cycle day 2 and doses varied from 150 to 300 IU/d depending on the patient's age, body mass index, ovarian pattern, menstrual cycles and basal hormones. Follicle growth was assessed by vaginal ultrasound. A daily dose of 0.25mg of GnRH antagonist (Cetrotide, Serono Laboratories) administration was initiated when the leading follicle reached 14 mm and continued until the day of hCG administration. Oocyte maturation was triggered by subcutaneous administration of hCG (Ovidrel, Serono) when at least one follicle reached 18 mm in diameter and two 16 mm. Transvaginal oocyte retrieval was scheduled 34–36 hours later (Wickland et al., 1983; Rombauts et al., 2000). The supplementation of the luteal phase was started on the day of oocyte retrieval and consisted of natural micronized progesterone 600 mg per day intravaginally (Smits et al., 1992) in three divided doses (Utrogestan®, Farmoquímica).

### Semen preparation

Samples were obtained by masturbation, after a minimum of 2 and maximum of 5 days abstinence. The evaluation of semen density and motility was carried out according to the recommendations of the World Health Organization, 1999. The samples were prepared to remove seminal fluid, debris, virus and bacteria, and concentrate on the spermatozoa with good motility and morphology using two discontinuous gradients (Bourne et al., 1995) (40% - 80%; Sperm Grad, Vitrolife). The final density and motility were assessed and, whenever necessary, dilutions were performed.

### Oocyte preparation and ICSI procedure

During ovum pick-up, the cumulus-corona cell complexes were immediately separated from the follicular fluid and transferred into 1 ml of IVF medium (Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) in Falcon dishes. The cells of the cumulus and corona radiata were removed by incubation for 30 s in Gamete medium with 40 IU hyaluronidase/ml (Type IV; Sygma, Aldrich, St Louis, USA) (Lassale et al., 1985). Afterward, the oocytes were observed under the inverted microscope at x200 magnification for maturity assessment. The ICSI procedures were carried out on an inverted microscope (Eclipse TE 300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at X 200 equipped with a Narishige micromanipulation system. A single spermatozoon was selected, immobilized and injected into the ooplasm. The injected oocytes were then transferred into 16  $\mu\text{l}$  droplets of IVF medium covered by light paraffin oil. The dishes with the injected oocytes were incubated in two different incubation environments. In Group I (n=53), the embryo culture was performed in an incubator Thermo Forma®, model 3110, serial II, Class 100 equipped with HEPA filter (High Efficiency Particulate Air) plus carbon-activated for volatile organic compounds (HEPA VOC filter). In Group II (n=61), the embryo culture was performed in an identical incubator that had HEPA filter only without carbon activated.

### Assessment of fertilization and embryo cleavage

Eighteen hours after the microinjection, the oocytes were observed under an inverted microscope to check for the presence of two pronuclei and the extrusion of the second polar body as sign of normal fertilization (Trounson & Bongo, 1996). The embryo cleavage was evaluated on day 2 and day 3 according to developmental stage and

morphological quality, as specified in the grading system of *Manual de Procedimientos REDE* (1998). This classification is based on equal-size blastomeres, pattern of fragmentation, and cytoplasmic appearance. Grade 1 represents perfect morphology and Grade 4 is the worst. Embryo replacement was usually done on day 3. If supernumerary embryos were available, they were cryopreserved on day 2 or 3 by the slow freezing protocol with propanediol (Lassalle et al., 1985). Pregnancy was confirmed by detecting increasing serum hCG concentrations 14 days after embryo replacement. A clinical pregnancy was defined as the presence of cardiac activity confirmed by vaginal ultrasound at 6–7 weeks gestation (Goswamy, 1999).

### Statistical analysis

The Student's *t*-test was used for comparison of numerical variables and the chi-square ( $\chi^2$ ) for qualitative data. The difference was considered statistically significant at *p*-value < 0.05.

### RESULTS

The 114 ICSI cycles were randomized into two groups: In 53 cycles (Group I), an incubator Thermo Forma®, model 3110, serial II, Class 100, with HEPA VOC filter air flow system was used. In 61 cycles (Group II), an incubator Thermo Forma®, model 3110, serial II, Class 100 with HEPA filter only without carbon activated was used. A total of 42 transfers were performed in Group I and 55 in Group II. There were 11 cycles without transfers in Group I and 6 in Group II due to either oocyte retrieval failure or OHSS risk.

The two study groups were similar in terms of age, total amount of gonadotropins, duration of stimulation, endometrial thickness on the day of hCG administration, number of metaphase II oocytes retrieved per patient, (Table 1). No significant difference between the groups was found for mean number of number of morphologically mature oocytes. No significant difference between the groups was found for fertilization and cleavage rates. The mean of the number of embryos transferred and top quality embryos transferred, defined as 8 cells Grade 1/ Grade 2, were similar between the groups (Table 2). The clinical pregnancy was not significantly higher in Group I than in Group II (Table 2).

### DISCUSSION

Considering the tendency of human embryos to be transferred back to the uterus after 72 hours (Carillo et al., 1998) in culture and that they are often maintained inside the incubator during this period, we aimed to compare two incubation environments –HEPA plus VOCs filter and HEPA filter only - used for the culture of human embryos to evaluate possible differences in embryo quality and pregnancy rates.

Battaglia et al, (2001) in a prospective randomized trial with incubator CODA® equipped versus non CODA® incubators revealed no effect on embryo quality and pregnancy rate involving human embryos. The authors recommend that IVF laboratories considering CODA® filtration should perform their own analysis to assess their needs before equipping the entire laboratory with expensive filtration systems.

Although some papers concluded that fertilization and cleavage rates, quality of embryos transferred and clinical pregnancies are improved in an environment with high quality air, our study demonstrated no effect on embryo quality and pregnancy rates when embryo culture involved air filtration system with HEPA VOCs filter. We have

**Table 1** Comparison of patients' characteristics in Group I and Group II

Characteristics	Culture in HEPA VOC filter Group	Culture in HEPA filter Group I	p valu
No. of cycles	42	55	
Age(y)	33.76±3.63	34.56±3.48	0.27
Duration of stimulation (d)	10.02±1.76	9.84±1.42	0.56
Total amount of gonadotropins (IU)	2050.9.±695.7	2063.5±726.7	0.93
End. thickness (mm)	10.93±2.86	10.45±2.17	0.29
Oocytes metaphase II (n)	5.07±3.37	4.98±3.47	0.90

Values are expressed as mean ±SD.

**Table 2** Outcome of patients' ICSI cycles

Characteristics	Culture in HEPA VOC filter Group I	Culture in HEPA filter Group II	p value
EB transf (n)	2.21±0.64	2.12±0.64	0.53
EB 8C G1/G2 transf	1.18±0.76	1.16±0.81	0.89
Pregnancy/transfer (%)	50 (21/42)	42(23/55)	0.53

Values are expressed as mean ±SD.

acknowledged that there is a need for more studies to demonstrate the real impact of the high-quality on human in vitro fertilization outcome.

### CONCLUSION

The data of this prospective, randomized comparative study has demonstrated that culture of human embryos in an incubator with HEPA filtration system plus VOCs filter revealed no effect on embryo quality and pregnancy rate. The effectiveness of laboratory air and incubator purification systems is perhaps dependent on unique and specific characteristics of each laboratory and the surrounding area.

### Correspondência:

Ana Cristina Allemand Mancebo  
G&O Barra - Avenida das Américas 4666, salas 312-313,  
Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. CEP 22649-900  
Email: ginecologia@cmb.com.br

### References

- Battaglia DE, Khabani, A, Rainer C, Moore DE. Prospective randomized trial of incubator CODA filtration units revealed no effect on outcome parameters for IVF. *Fertil Steril* 2001; 75, Suppl 1: S6.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Rep Update* 1995; 1:91–149.
- Brinster RL. A method for in vitro cultivation of mouse ova from tube cell to blastocyst. *Exp Cell Res* 1963; 32: 205–208.
- Boone WR, Jonhson JE, Locke Ann-Jannette, Crane MM, Price TM. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril* 1999; 71, n°. 1:150–154.
- Bourne H, Richings N, Liu DY, Clarke GN, Harari O and Baker HWG. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Repro Fertil Dev* 1995; 7:177.

- Carillo AJ, Lane B, Pridham DD, Risch PP, Pool Tb, Silverman IH, et al. Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphatase-free media. *Fertil Steril* 1998; 69:329–334.
- Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Hum Reprod* 1997; 12, no. 8:1742–1749.
- Cohen J, Gilligan A, Willadsen S. Culture and quality of embryos. *Hum Reprod* 1998; 13, Suppl 3:137–147.
- Goswamy R. Ultrasound in assisted conception. In: Brinsden PR, ed. *A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. London: Parthenon Publishing, 1999:157–169.
- Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J. The origin, effects, and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Hum Reprod* 1998; 13, Suppl 4: 146–155.
- Johnson JE, Boone WR, Bernard RS. The effects of volatile compounds (VC) on the outcome of in vitro mouse embryo culture. *Fertil Steril* 1993; Suppl 1: S98–S99.
- Klinefelter G, Gray Jr LE. The clinical relevance of animal models: animal studies that assess the potential for drugs and environmental agents to cause reproductive disorders in humans. In: Sciali AR and Zinaman MJ, eds. *Reproductive Toxicology and Infertility*. New York: MC Graw-Hill, 1993:219.
- Lassalle B, Testart J and Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril* 1985; 44:645–651.
- Manual de Procedimientos Laboratorio de Reproduccion Asistida. Red Lationamericana de Reproducción Asistida. 1998; 44–45.
- Out HJ, Mannaerts BMJL, Driessen SGAJ and Coelnghe Bennink HJT. Recombinant folliclestimulating hormone in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. *Hum. Reprod. Update* 1996; 2:162–171.
- Rombauts L and Wood CE. Oocyte retrieval. In: Trouson AO and Gardner DK, eds. *Handbook of in vitro fertilization*. New York: CRC Press, 2000:67–83.
- Smitz J, Devroey P, Faguer B, Bourgain C, Camus M and Van Steirteghem AC. A prospective randomized comparison of intramuscular or intravaginal natural progesterone as a luteal phase and early pregnancy supplement. *Hum Reprod* 1992; 7:168–175.
- Souza, MCB; Mancebo, ACA; Rocha, CA; Henriques, CA; Souza M.M.; Cardoso, FFO. Evaluation of two incubation environments—ISO class 8 versus ISO class 5—on intracytoplasmic sperm injection cycle outcome. *Fertil Steril*, 2009; 91 (5): 1780–84.
- Trouson A and Bongso A. Fertilization and development in humans. In: Pedersen RA and Schatten CP, eds. *Current topics in developmental biology*. Vol. 32. CA: Academic Press, 1996:59.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C. Smitz J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8:1061–1066
- Weissenborn U, Moller M and Neulen J. Reduction of volatile organic compounds in incubators by activated charcoal. *Hum Reprod* 2001; 16 Suppl 1: 126.
- Wickland M. Collection of human oocytes by the use of sonography. *Fertil Steril* 1983; 39:603–607.
- World Health Organization WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Worrilow KC, Huynh HT, Gwozdziwicz WA, Schillings W, Peters AJ. A retrospective analysis: the examination of a potential relationship between particulate (P) and volatile organic compounds (VOC) levels in a class 100 IVF laboratory cleanroom (CR) and specific parameters of embryogenesis and rates of implantation (IR). *Fertil Steril* 2001; 76, no. 3, Suppl 1: S15–S16.
- Worrilow KC, Huynh HT, Bower JB, Schillings W, Peters AJ. A retrospective analysis: Seasonal decline in implantation rates (IR) and its correlation with increased levels of volatile organic compounds (VOC). *Fertil Steril* 2002; 78:S39 .

# Influência da retirada de fragmentos de embriões nas taxas de gravidez em pacientes submetidas as técnicas de reprodução assistida

## Influence of fragment removal from embryos in pregnancy rates of patients submitted to human assisted reproduction

Selmo Geber<sup>1</sup>, Renata Bossi<sup>2</sup>, Fábio Nascimento<sup>3</sup>, Georgina Hastenreiter<sup>4</sup>, Cintia Black<sup>5</sup> Marcos Sampaio<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Ph.D, Diretor Clínico do Centro de Medicina Reprodutiva -ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>2</sup> Embriologista Chefe do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>3</sup> Embriologista do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>4</sup> Embriologista do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>5</sup> Acadêmica de Ciências Biológicas- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>6</sup> Ph.D, Diretor Clínico do Centro de Medicina Reprodutiva-ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

ORIGEN, Belo Horizonte, Brasil

Apresentado no 9º Congresso da Red Latino Americana de Reprodução Assistida 2009, Cancun – México

### RESUMO

**Introdução:** A ocorrência de fragmentação embrionária *in vitro* é freqüentemente relacionada ao mau prognóstico nos tratamentos de reprodução assistida. Embriões com uma alta porcentagem de fragmentação possuem uma taxa de implantação e gravidez diminuída. Estudos indicam que pode-se reduzir os efeitos indesejados da fragmentação com a retirada dos mesmos.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da retirada de fragmentos em embriões sobre a taxa de gravidez.

**Material e métodos:** O estudo incluiu 50 pacientes cujos embriões possuíam 20-50% de fragmentação e foram submetidos ao processo de retirada de fragmentos. Oitenta e duas pacientes que possuíam embriões com 20-50% de fragmentação e não passaram pelo processo, formaram o grupo controle. Também foi utilizado um grupo controle que passou apenas pelo assisted hatching. O procedimento foi realizado com auxílio de laser diodo e micropipetas, em PBS sem cálcio e magnésio. A transferência foi realizada após a conclusão do procedimento. Quatorze dias após a punção foi realizado o exame de bhCG.

**Resultados:** Todos os dados analisados foram semelhantes entre os grupos estudados. A taxa de gravidez do grupo de retirada de fragmentos foi de 44% versus 43% do grupo controle. Quando foram analisadas pacientes maiores que 37 anos a taxa de gravidez do grupo de retirada de fragmentos (52%) mostrou-se significativamente maior quando comparadas ao grupo cujos embriões não passaram pelo processo (29%) ( $p=0,04$ ), mas similar ao grupo que passou somente pelo processo de assisted hatching (33%).

**Conclusão:** A retirada de fragmentos é uma técnica que pode auxiliar no incremento das taxas de gravidez, em pacientes com mais de 37 anos, quando os embriões a serem transferidos possuem uma fragmentação maior que 20%.

**Palavras-chave:** fragmentação, retirada de fragmentos, qualidade embrionária, gravidez

### ABSTRACT

**Introduction:** The fragmentation of embryos is frequently associated with bad prognosis in treatments of assisted reproduction. Embryos with a high percentage of fragmentation have implantation and pregnancy rates reduced. Studies have demonstrated that removal of fragments could minimize the malefic effects of fragmentation.

**Objective:** Evaluate the effect of fragment removal of embryos in pregnancy rates.

**Material and methods:** The study included 50 patients with embryos that presented 20-50% of fragmentation who were submitted the procedure of fragment removal. The control group was composed by 82 patients who had embryos with 20-50% of fragmentation and were not submitted to procedure of fragment removal. Another control group was submitted only to assisted hatching. A laser diode and micropipettes were used in the procedure, which was performed in PBS without calcium and magnesium. Immediately after the procedure the transfer was performed. The pregnancy outcome was evaluated fourteen days after oocyte retrieval.

**Results:** All evaluated data was similar among the groups. The pregnancy rate of fragment removal group was 44% versus 43% in the control group. In the group of fragment removal, patients with 37 years old or more, have had a pregnancy rate (52%) significantly higher than patients of the same age who were not submitted to the procedure (29%) ( $p=0,04$ ), but similar to the group submitted only to assisted hatching (33%).

**Conclusion:** The fragment removal is a useful technique for provide higher pregnancy rates, in patients with 37 years old or more, when embryos about to be transferred have a fragmentation at least 20%.

**Keywords:** fragmentation, fragment removal, embryo quality, pregnancy

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de fragmentação embrionária *in vitro* é frequentemente relacionada ao mau prognóstico nos tratamentos de reprodução assistida (Erenus et al., 1991; Shulman et al., 1993; Giorgetti et al., 1995). Existem poucos relatos de gravidez após transferência de embriões com alta taxa de fragmentação (Erenus et al., 1991; Shulman et al., 1993; Giorgetti et al., 1995; Veek & Rosenwaks, 1999; Ziebe et al., 1997). Os fragmentos citoplasmáticos surgem após divisão celular podendo ser decorrentes de fatores intrínsecos como, alterações genéticas e idade materna, fatores extrínsecos, como congelamento e ambiente de cultivo inadequado (Giorgetti et al., 1995).

A fragmentação diminui o potencial de desenvolvimento embrionário, visto que o contato dos blastômeros intactos é prejudicado levando a uma falta de compactação e bloqueio do desenvolvimento (Giorgetti et al., 1995; Alikani et al., 1999). Eftekhari-Yazdi et al., (2006) verificaram que a fragmentação influencia no tamanho do blastocisto devido a uma diminuição de células do trofotoderma (TE) e da massa celular interna (ICM). A diminuição de células pode prejudicar o hatching, pois o volume de líquido da blastocela pode estar reduzido (Juriscovera et al., 1996) e há possibilidade de uma diminuição das enzimas produzidas pelo TE (Van Blerkom, 1993).

Uma consequência da fragmentação é a diminuição de citoplasma (Veek & Rosenwaks, 1999; Eftekhari-Yazdi et al., 2006). Johansson et al (2003), observaram que grandes fragmentos podem privar os blastômeros de organelas essenciais como mitocôndrias, RNA mensageiro e proteínas. Além disso, Juriscovera et al (1996) demonstraram que a presença de fragmentos liberam substâncias tóxicas que podem induzir blastômeros intactos ao processo de apoptose.

Vários autores reportam uma redução na taxa de implantação e gravidez para embriões com 10-50% de fragmentação embrionária (Erenus et al., 1991; Shulman et al., 1993; Giorgetti et al., 1995; Ziebe et al., 1997; Ebner et al., 2001). Alikani et al., (1999), realizou um estudo retrospectivo em que foi analisada a influência dos vários padrões de fragmentação nas taxas de gravidez e implantação. Quando a fragmentação embrionária estava entre 25-35% a taxa de gravidez observada foi de 46,3% e quando era maior que 35% a taxa foi de 14,8%. Ebner et al., (2001), observaram que quando foram transferidos embriões com uma fragmentação de 25-50% a taxa de gravidez foi de 17%.

Buscando melhorar as taxas de implantação e gravidez diversos autores (Alikani et al., 1999; Alegretti et al., 2004; Gurgan et al., 2005; Keltz et al., 2006) retiraram fragmentos dos embriões. Desses, alguns observaram (Alikani et al., 1999; Gurgan et al., 2005) uma redução dos efeitos indesejados da fragmentação. Os demais autores, entretanto não demonstraram diferenças significativas (Alegretti et al., 2004; Keltz et al., 2006).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da retirada de fragmentos citoplasmáticos na taxa de gravidez em pacientes de mal prognóstico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 153 casais que se submeteram a tratamento de infertilidade conjugal por técnica de reprodução assistida, no período de julho de 2007 a novembro de 2008, foram incluídos nesse estudo retrospectivo caso-controle. A população do estudo foi composta por 50 casais cujos embriões apresentavam 20% a 50% de fragmentação, no dia da transferência, e foram submetidos à retirada dos fragmentos. A classificação embrionária foi realizada baseada no critério de Veek, 1990.

Como grupo controle, avaliamos 82 casais que possuíam embriões com as mesmas características, mas não foram submetidos à retirada de fragmentos. Um outro grupo, composto por 21 casais cujas mulheres tinham mais de 37 anos, e que tiveram todos embriões submetidos à técnica de assisted hatching, sem retirada de fragmentos, foi posteriormente avaliado como controle.

## Indução da ovulação, ICSI, cultivo e transferência embrionária

A indução da superovulação foi feita com FSH recombinante (rFSH, Gonal F, Serono, Brasil) e a dose foi adequada de acordo com a resposta individual, avaliada por ultrasonografia seriada e dosagem sérica de estradiol, conforme descrito previamente (Geber et al., 2002a). A supressão da função hipofisária foi realizada com análogo do GnRH (Lectrum, Sandoz, Brasil) na fase folicular precoce ou lútea tardia (Geber et al., 2002b) ou antagonista do GnRH (Cetrotide, Serono, Brasil), iniciado quando os folículos apresentavam diâmetro médio de 14mm, para mulheres com idade  $\geq$  40 anos.

Quando os folículos atingiam um diâmetro médio de 17 mm com níveis concordantes de estradiol, administrouse hCG recombinante (Ovidrel, Serono, Brasil), e 34 a 36 horas após foi realizada a punção folicular para aspiração dos oócitos, guiada por ultrasonografia endovaginal. Todos oócitos ficaram incubados em meio GIVF (Vitrolife, Suécia) suplementado com 10% albumina sérica humana (HSA, Vitrolife, Suécia) e Earle's Balanced Salt Solution (EBSS, Sigma, EUA) suplementado com 10% de substituto sintético do soro (Irvine Scientific, EUA) e 0,47 mM de piruvato (Sigma, EUA) por pelo menos duas horas e então denudados com auxílio de pipetas afiladas e hialuronidase (Sigma, EUA) 80UI. Duas horas após a denudação os oócitos em estágio MII foram inseminados pela técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e incubados em meio de cultivo G1 (Vitrolife, Suécia) suplementado com 5% de HSA e EBSS (Geber et al., 2002c), cobertos com óleo mineral (Sigma, EUA) e ambiente de 7% de CO<sub>2</sub>. A transferência foi realizada no dia 2 ou 3 do desenvolvimento embrionário em meio G2 suplementado com 5% HSA (Vitrolife, Suécia). Foi utilizado o cateter soft (Sidney-IVF, Cook, Austrália) e o suporte de fase lútea foi feito com progesterona por via vaginal (Crinone 8%, Serono, Brasil) (Geber et al., 2007). O exame de  $\beta$ hCG foi realizado 14 dias após a punção. Quando positivo ( $>$ 25UI/ml) procedia-se ultrasonografia endovaginal 10 e 20 dias após. Foi considerado gravidez clínica quando se observou batimento cardíaco fetal.

## Retirada dos fragmentos

Os embriões selecionados para retirada dos fragmentos antes da transferência eram aqueles que apresentavam mais de 20% e menos de 50% de fragmentação. Inicialmente foram colocados em placas de petri (Falcon BD, EUA) contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem cálcio e magnésio (Sigma, EUA) suplementado com 20% de HSA e levados ao microscópio invertido (Diaphot 300, Nikon, Japão) acoplado a micromanipuladores (Narishige, Japão) e laser diodo (Octax Laser Shot, Alemanha). O embrião era mantido por pipeta de *holding* (Humagen, EUA) e um orifício na zona pelúcida era aberto com dois tiros de 12 milissegundos do laser (Geber et al., 2005). Após a abertura da zona pelúcida, uma micropipeta de aspiração (Humagen, EUA) era inserida no embrião e os fragmentos retirados por sucção (Figura 1). Uma vez terminado o procedimento, o embrião era recolocado em meio de cultura. A retirada dos fragmentos era feita imediatamente antes da transferência.

## Análise estatística

O cálculo amostral realizado para um poder de 80% mostrou a necessidade de 44 pacientes em cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de *student* para amostras pareadas. Utilizou-se o teste qui-quadrado para se comparar a taxa de gravidez entre os grupos. Foi considerado o  $p < 0,05$  como nível de significância estatística.

## RESULTADOS

A idade das pacientes do grupo de estudo variou de 26 a 42 anos (média=35,4 anos). Um total de 579 folículos foram aspirados sendo 466 oócitos em estágio de MII. A média de folículos aspirados foi de 11,6; a média de oócitos maduros foi de 9,3 por ciclo. Foram obtidos 342 embriões, sendo transferidos um total de 182 embriões que passaram pelo processo de retirada de fragmentos. A média de embriões transferidos por ciclo foi de 3,6 e a taxa de gravidez foi de 44%.

No grupo controle, a idade das pacientes variou de 24 a 46 anos (média=35,6). Um total de 848 folículos foram aspirados sendo 702 oócitos maduros. A média de folículos aspirados foi de 10,3; a média de oócitos maduros foi de 8,6 por ciclo. Foram obtidos 555 embriões dos quais 303 foram transferidos e 230 (76%) possuíam mais de 20% de fragmentação. A média de embriões transferidos foi de 3,7 e a taxa de gravidez foi de 43% (Tabela 1).

Quando comparamos os dois grupos, não observamos diferença entre as médias etárias ( $p=0,773$ ). Não houve diferença com relação ao número médio de folículos aspirados ( $p=0,239$ ), oócitos MII ( $p=0,406$ ), média de embriões transferidos ( $p=0,777$ ) e taxa de gravidez ( $p=0,11$ ). Em ambos os grupos a maior causa de infertilidade foi a masculina seguida por causas múltiplas (Figura 2)

Quando subdividimos os dois grupos, por faixa etária (até 37 anos ou >37 anos), observamos que as proporções se mantinham semelhantes no grupo de mulheres com idade até 37 anos (Tabela 2). No grupo de mulheres >37 anos, entretanto, observamos uma diferença quando comparamos as taxas de gravidez. Nos ciclos de embriões submetidos à retirada de fragmentos ( $n=21$ ) a taxa de gravidez (52%) foi significativamente superior ( $p=0,04$ ) àquela encontrada nos ciclos com embriões fragmentados sem remoção dos fragmentos (29%) (Tabela 3).

Realizamos também uma comparação desse grupo de estudo com um grupo de casais que tiveram seus embriões submetidos à técnica de *assisted hatching*, sem retirada de fragmentos e com idade >37 anos. As pacientes deste grupo ( $n=21$ ) apresentaram uma média de idade 39,7 anos (38 a 42 anos). Foram aspirados 213 folículos, com 205 oócitos MII. A média de folículos por ciclo foi de 10,1 e a média de oócitos maduros foi de 9,7. Foram obtidos 177 embriões sendo transferidos 78. A média de embriões transferidos foi de 3,7 e a taxa de gravidez foi de 33% (Tabela 3).

Quando comparamos os resultados entre os dois grupos, não observamos diferença entre as médias etárias ( $p=0,911$ ). Não houve diferença com relação ao número médio de folículos aspirados ( $p=0,336$ ), oócitos em MII ( $p=0,179$ ), média de embriões transferidos ( $p=0,110$ ) e taxa de gravidez ( $p=0,7$ ).

## DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou que a retirada de fragmentos de embriões, imediatamente antes da transferência, não é prejudicial às taxas de gravidez. Além disso, mulheres com idade maior que 37 anos, cujos embriões passaram por esse procedimento, apresentaram um aumento na taxa de gravidez.

**Tabela 1:** Comparação entre os resultados dos ciclos de RA cujos embriões foram submetidos à retirada de fragmentos e daqueles cujos embriões fragmentados não foram submetidos à retirada de fragmentos

	Ciclos com retirada de fragmentos (n= 50)	Ciclos com embriões fragmentados sem retirada de fragmentos (n=82)	p
Folículos (média)	11,6	10,3	0,239*
Oócitos MII(média)	9,3	8,6	0,406 *
Embriões transferidos (média)	3,6	3,7	0,777 *
Gravidez	22 (44%)	35 (43%)	0,11 †

\*Teste t de student

†Qui quadrado

**Tabela 2:** Comparação entre os resultados dos ciclos de RA cujos embriões foram submetidos à retirada de fragmentos e daqueles cujos embriões fragmentados não foram submetidos à retirada de fragmentos em pacientes  $\leq 37$  anos.

	Ciclos com retirada de fragmentos (n= 29)	Ciclos com embriões fragmentados sem retirada de fragmentos (n=57)	p
Folículos (média)	13,7	11,4	0,103 *
Oócitos MII(média)	10,6	9,2	0,626 *
Embriões transferidos (média)	3,6	3,4	0,813 *
Gravidez	11 (38%)	28 (49%)	0,18 †

\*Teste t de student

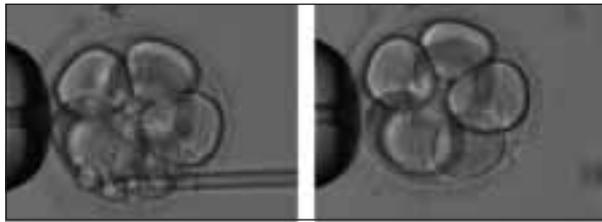
†Qui quadrado

**Tabela 3:** Comparação entre os resultados dos ciclos de RA de pacientes > 37 anos cujos embriões foram submetidos à retirada de fragmentos, embriões fragmentados que não foram submetidos à retirada de fragmentos e embriões submetidos à *assisted hatching*.

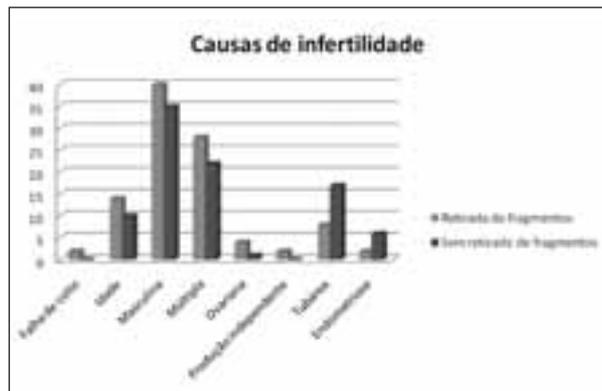
	Ciclos com com retirada de fragmentos (n=21)	Ciclos sem retirada de fragmentos (n=24)	Ciclos com <i>assisted hatching</i> (n=21)
Folículos (média) *	8,7	8,0	10,1
Oócitos (MII) (média)*	7,6	7,0	9,7
Embriões transferidos (média) *	3,8	4,0	3,7
Gravidez †	11 (52%)	7 (29%)	7 (33%)

\*Teste t de student - NS

†Qui quadrado-  $p=0,04$  quando comparados grupos com e sem retirada de fragmentos



**Figura 1-** Processo de retirada de fragmentos. A pipeta holding segura o embrião, enquanto o pipeta de assisted hatching aspira os fragmentos (A). Após a retirada dos fragmentos embrião grau I. Observa-se às 16 horas o tiro feito pelo laser diodo (B).



**Figura 2:** Causas de infertilidade nos casais dos grupos com e sem retirada de fragmentos

Alikani et al (1999) também não observaram efeitos adversos da retirada de fragmentos quando analisaram 68 embriões com mais de 20% de fragmentação. Alegretti et al (2004) não observaram diferença na taxa de gravidez o que pode ter sido ocasionado pelo pequeno número de pacientes incluídos no estudo e utilização de solução ácida para abertura da zona pelúcida. Keltz et al (2006) também não observaram uma melhora na taxa de gravidez após retirada de fragmentos, provavelmente por ter utilizado embriões com baixa taxa de fragmentação. Além disso, os autores não separaram os pacientes de acordo com a faixa etária. Diferentemente do observado em nosso estudo, Gurgan et al (2005) relata um aumento na taxa de gravidez após retirada de fragmentos em embriões de pacientes com três falhas prévias de ICSI. Este estudo, entretanto foi realizado com apenas 25 pacientes.

O grupo de estudo foi composto por 50 casais sendo suficiente para o cálculo estatístico. Este grupo representa uma parcela de pacientes com mau prognóstico de gravidez, uma vez que apresentaram todos seus embriões disponíveis para transferência com mais de 20% de fragmentação. O grupo controle também era composto por pacientes de mau prognóstico, uma vez que apresentavam 76% dos embriões disponíveis para transferência com mais de 20% de fragmentação.

Alguns autores acreditam que embriões com elevada taxa de fragmentação possuem aumento de anormalidades cromossômicas (Hardy et al, 1993; Jamieson et al, 1994; Harper et al, 1995; Hardy, 1999). Bongo et al, 1991 demonstraram uma maior prevalência de aneuploidia em embriões fragmentados. Keefe et al, 2005 demonstraram um encurtamento dos telômeros em embriões muito fragmentados. A retirada de fragmentos não ajuda a melhorar a qualidade destes embriões geneticamente alterados, por este motivo optamos em não realizar a retirada de fragmentos em embriões que possuíam 50% ou mais de fragmentos.

Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação a causa de infertilidade, idade, número de folículos, oócitos e embriões transferidos. Isso demonstra que os grupos foram semelhantes e comparáveis. A taxa de gravidez no grupo de retirada de fragmentos foi igual a do grupo controle de pacientes cujos embriões não passaram pelo processo. Este dado comprova que a micromanipulação não é prejudicial ao tratamento, o que também foi observado anteriormente (Alegretti et al, 2004; Keltz et al, 2006). Além disso, é importante ressaltar que as pacientes do grupo controle apresentavam um melhor prognóstico do que o grupo estudado, pois 24% dos embriões transferidos possuíam fragmentação menor que 20%.

A idade é um dos fatores relacionados ao aumento da fragmentação embrionária (Keltz et al, 2006), assim avaliamos separadamente as pacientes de acordo com a faixa etária. Pacientes com mais de 37 anos que tiveram seus embriões submetidos à retirada de fragmentos apresentaram taxa de gravidez superior ao grupo sem retirada de fragmentos. No nosso entender este é o único estudo, até o momento, que demonstra esse resultado. Para se realizar a retirada de fragmentos é necessário fazer um orifício na zona pelúcida. Assim poder-se-ia inferir que essa melhora no resultado poderia ser decorrente do processo de assisted hatching, visto que vários autores já demonstraram sua eficiência em aumentar a taxa de gravidez em mulheres acima de 37 anos (Hsieh et al, 2002; Edi-Osagie et al, 2003; Ghobara et al, 2006; The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and Practice Committee of the American society for Reproductive Medicine, 2008).

A fim de se confirmar se esse resultado foi realmente decorrente da retirada de fragmentos ou apenas da realização do orifício na zona pelúcida, comparamos este subgrupo com pacientes que tiveram seus embriões submetidos ao processo de assisted hatching somente. Observamos uma maior taxa de gravidez no grupo em que houve retirada de fragmentos, entretanto esse resultado não foi significativo. Isso pode ser explicado pelo pequeno número de pacientes em ambos os grupos. Outro fato importante é que o grupo de assisted hatching os embriões não eram de mau prognóstico.

A melhora na taxa de gravidez após a retirada de fragmentos pode ocorrer devido ao restabelecimento do contato entre os blastômeros e conseqüente desenvolvimento embrionário adequado (Van Blerkom, 1993; Juriscova et al, 1996; Alikani et al, 2000). Eftekhari-Yazdi et al, 2006 observaram também que há um aumento no número de células do TE e ICM quando realizava-se a retirada de fragmentos. Com um maior número de células o hatching embrionário é facilitado. Outro ponto favorável em relação à retirada dos fragmentos é a possível diminuição de substâncias nocivas capazes de induzir o processo de apoptose (Eftekhari-Yazdi et al, 2006; Juriscova et al, 1996).

No nosso estudo demonstrou que a retirada de fragmentos de embriões com 20-50% de fragmentação não é prejudicial ao tratamento com técnicas de reprodução assistida. Além disso, representa uma ótima alternativa para aumentar as taxas de gravidez em pacientes com idade maior que 37 anos. Mais estudos são necessários para se confirmar se esse efeito foi decorrente da retirada de fragmentos ou do assisted hatching.

#### Correspondência:

*Avenida do Contorno 7747, Lourdes – Belo Horizonte/MG cep: 30110-051*

*Tel: (31)2102-6363*

*Fax: (31) 2102-6334*

*selmogeber@origen.com.br*

## Referências bibliográficas

- Alegretti, J R; Rocca T; Motta E L; et al (2004) Microsurgical embryonic fragment removal (MsFR) in patients with multiple IVF implantation failures. *Fert. Steril* 82, (Suppl 2), S326-S327.
- Alikani M; Cohen J; Tomkin G; et al (1999) Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fert. Steril.*, 71, 836-42.
- Alikani M; Calderon G; Tomkin G; Garrisi J; Kokot M; Cohen J. (2000) Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum. Reprod.*, 15, 2634-2643.
- Bongo A; Ng S; Lim J; et al (1991) Preimplantation genetics: chromosomes of fragmented human embryos. *Fertil. Steril.* 56, 66-70.
- Ebner T; Yaman C; Moser M; et al (2001) Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fert. Steril.* 76, 281-85.
- Edi-Osagie E; Hooper L; Seif MW. (2003) The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systematic review. *Hum. Reprod.* 18, 1828-1835.
- Eftekhari-Yazdi P; Valojerdi M R; Ashitani S K; et al (2006) Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *RBM online* 13, 823-32.
- Erenus M; Zouves C; Rajamahendran P; et al (1991) The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 56, 707-10.
- Geber, S; Sales L; Sampaio M (2002a). 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. *J. of Assist. Reprod. Genetics.* 19, 293-98.
- Geber S; Ferreira DP ; Prates L F S ; Sampaio, M. (2002b) Effects of previous ovarian surgery for endometriosis on the outcome of assisted production treatment. *RBM Online*, 5, 162-66.
- Geber S; Sales L ; Sampaio M. (2002c) Laboratory techniques for human embryos. *RBM Online*, 5, 211-218.
- Geber, S ; Moreira, A C. ; Pádua, S O C; Sampaio, M (2007) Comparison between two forms of vaginally administered progesterone for luteal phase support in assisted reproduction cycles. *RBM Online*, 14, 155-158.
- Geber S; Bossi R L; Sales L ; Sampaio M (2005) Comparison between two methods of zona drilling for human embryo biopsy. In: ASRM meeting, 2005, Montreal. *Fertil. Steril.* 84, 346-47.
- Ghobara TS; Cahill DJ; Ford WCL; Collyer HM; Wilson PE; Al-Nuaim L; Jenkins JM (2006) Effects of assisted hatching method and age on implantation rates of IVF and ICSI. *RBM online*, 13, 261-267.
- Giorgetti C; Terriou P; Auquier P; (1995) Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum. Reprod* 10, 2427-31.
- Gurgan T; Demiroglu A; Sari T; et al (2005) Effect of embryo fragment removal of day 3 embryos in recurrent implantation failure. *Fert. Steril* 84 (Suppl 1), S284.
- Hardy K; Winston PML; Handsyside AH (1993) Binucleate blastomeres in normally fertilized preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *J. Reprod. Fertil.* 98, 549-558.
- Hardy K (1999) Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reprod.* 4, 5-134.
- Harper JC; Coonen E; Handsyside AH et al (1995) Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenatal Diagnosis*, 15, 41-49.
- Hsieh, Y-Y; Huang C-C; Cheng T-C; Chang C-C; Tsai H-D; Lee M-S (2002) Laser assisted hatching of embryos is better than the chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil. Steril.* 78, 179-182.
- Jamieson ME; Coutts JRT, Conner JM; (1994) The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Hum. Reprod.* 9, 709-715.
- Johansson M; Hardarson T; Lundin K (2003) There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J. Assist. Reprod. and Genetics* 20, 309-13.
- Juriscova A; Varmuza S; Casper R F (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molec. Hum. Reprod.* 2, 93-98.
- Keefe D; Franco S; Liu L; et al. (2005) Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women –toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am. J. Gynecol.* 192, 1256-61.
- Keltz M D; Skorupski J C; Bradley K; et al (2006) Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 86, 321-24.
- Shulman A; Bem-Nun I; Ghetler Y; et al (1993) Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil. Steril.* 60, 123-6.
- Saessens C; Camus M; Bollen N; et al (1992) The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril.* 57, 626-30.
- The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and Practice Committee of the American society for Reproductive Medicine. (2008) The role of assisted hatching in in vitro fertilization: a review of the literature. A Committee opinion. *Fertil. Steril* 90, (Suppl. 3), S196-S198.
- Van Blerkom J (1993) Development of human embryo to the hatched blastocyst stage in the presence or absence of a monolayer of vero cell. *Hum. Reprod.* 8, 1525-39.
- Veek L. (1990) Handbook of laboratory diagnosis and treatment infertility In: Keel BA, Webster RW, eds. Boca Raton, FL:CR Press, 353-69.
- Veek L; Rosenwaks Z. (1999) An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: Parthenon.
- Ziebe S; Petersen K; Lindenberg S; et al (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12, 1545-9.

# Morfología Espermática Estricta: influye realmente en los resultados de FIV?

## Morfología Espermática Estricta: influi realmente nos resultados de FIV? Strict sperm morphology: a real influence in IVF results?

Gallo A, Ducatelli ME, Mastellari R, Gismondi F, Neuspiller N, Coco R  
Fecunditas - Instituto de Medicina Reproductiva afiliado a la Facultad de Medicina de la UBA  
fecunditas@fecunditas.com.ar

Apresentado no 9º Taller General de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida- Cancún

### ABSTRACT

According to strict morphologic sperm criteria, IVF results are sub-optimal when the sample has <14% normal morphology, and even worse when it is lower than 4%.

**Objective:** To report the effect of sperm morphology on the results of IVF/ICSI in 165 IVF/ICSI cycles with ovum donation, an excellent model to assess the effect of sperm morphology).

**Methods:** There were included 64 IVF cycles, 81 ICSI cycles and 20 mixed procedures (IVF/ICSI). The reason for ovum donation was ovarian failure in receptors. All donors were young, volunteer and anonymous with proven fertility. Receptors were synchronized with donors and all the retrieved oocytes from a donor were used for a single receptor. Embryos were transferred in the same cycle at an average of  $2.88 \pm 0.29$  per receptor. Male patients had spermatograms with morphology following Kruger's criteria. According to the percentage of normal morphology, there resulted four groups: < 4% (n=23); 4% to <10% (n=58); 10% to <14% (n=23), and  $\geq 14\%$  (n=61). The statistical analysis included the non parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, Chi square and Spearman's Rho, according to the specific case.

**Results:** We found no correlation between sperm morphology and normal fertilization rate, normal cleavage rate, good quality embryo rate, implantation rate, pregnancy rate and abortion rate in none of the 3 different procedures.

**Conclusion:** According to our data, there is no influence of sperm morphology over none of the relevant variables for good outcomes in IVF. These findings make us reassess the reliability of sperm morphology as a good biomarker of good response to IVF and, even more, as an indication for ICSI.

**Key-words:** sperm; morphologic strict criteria; ART outcomes

### RESUMEN

Según el criterio estricto de la morfología espermática los resultados de FIV son subóptimos cuando la proporción de espermatozoides normales es <14% y peor aún cuando < 4%.

**Objetivo:** Comunicamos el efecto de la morfología espermática en FIV e ICSI. Para ello, se utilizaron los datos de 165 procedimientos con óvulos donados, un excelente modelo para evaluar la morfología espermática.

**Metodología:** Se realizaron 64 FIV, 81 ICSI y 20 procedimientos mixtos FIV/ICSI. La ovodonación fue por falla ovárica de las receptoras. Todas las donantes fueron jóvenes, voluntarias y anónimas con fertilidad comprobada. Las receptoras fueron sincronizadas con las donantes y todos los óvulos aspirados fueron utilizados para una sola receptora. Los embriones fueron transferidos en fresco y la media fue de  $2.88 \pm 0.29$  por receptora. Los pacientes realizaron un espermograma previo y la morfología espermática fue evaluada según Kruger. De acuerdo con la misma, fueron divididos en 4 grupos: porcentaje de normales <4 (n = 23), entre 4 y <10 (n = 58), entre 10 <14 (n = 23) y  $\geq 14$  (n = 61). Para el análisis estadístico se utilizaron los pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney, Chi cuadrado y Rho de Spearman.

**Resultados:** Se correlacionó morfología espermática con las tasas de fecundación, clivado, embriones buenos, implantación, embarazo y aborto en los tres tipos de procedimientos. No se encontró diferencia alguna.

**Conclusión:** De acuerdo a nuestros datos no hay influencia de la morfología espermática en ninguna de las variables de relevancia para buenos resultados en FIV. Estos hallazgos nos obliga a preguntarnos si realmente la morfología estricta es un buen biomarcador de buena respuesta en FIV e indicación para ICSI.

**Palabras-clave:** espermatozoide; morfología estricta; resultados en RA

### RESUMO

De acordo com o critério da morfologia estrita dos espermatozoides, os resultados da FIV são sub-ótimos quando a proporção de espermatozoides normais é <14%, e ainda pior se <4%.

**Objetivo:** Estudar o efeito da morfologia espermática na FIV e ICSI. , utilizando-se dados de 165 procedimentos com óvulos doados, um excelente modelo experimental.

**Metodologia:** Foram 64 ciclos de FIV, 81 de ICSI e 20 procedimentos mistos FIV/ICSI. A ovodação deu-se por falha ovárica das receptoras. Todas as doadoras eram jovens, voluntárias e anônimas, com fertilidade comprovada. As receptoras foram sincronizadas com as doadoras e todos os óvulos aspirados eram utilizados numa única receptora. Os embriões foram transferidos a fresco, com média de  $2.88 \pm 0.29$  por receptora. Os homens realizaram

um espermograma prévio e a morfologia foi avaliada segundo Kruger, originando 4 grupos: percentagem de normais <4 (n = 23), entre 4 e <10 (n = 58), entre 10 e <14 (n = 23) e  $\geq 14$  (n = 61). Para a análise estatística se utilizaram as provas não paramétricas de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, o Chi cuadrado e o Rho de Spearman.

**Resultados:** Correlacionou-se a morfología espermática com as taxas de fecundação, clivagem, bons embriões, implantação, gravidez e aborto nos três procedimentos. Não houve diferenças significativas.

**Conclusão:** De acordo com nossos dados, não há influência da morfología espermática em nenhuma variável de relevância para bons resultados na FIV. Estes achados nos levam a cuestionar se realmente a morfología estricta é um biomarcador de boa resposta da FIV e de indicação para ICSI.

**Palavras-chave:** espermatozoide; morfología estricta; resultados em RA

## INTRODUCCIÓN

La asociación entre la calidad espermática y la infertilidad masculina ha sido reconocida por más de 50 años. De acuerdo con los datos de la literatura, parecería claro que la morfología estricta tiene una importante relevancia clínica, al punto tal que se lo considera un excelente biomarcador de la capacidad fecundante in vivo e in vitro, independiente de la motilidad y concentración (Ombelet et al, 1995).

En la evaluación de la morfología espermática habría que tener en cuenta la proporción de espermatozoides con morfología normal y la caracterización funcional de un espermatozoide normal.

De acuerdo a los criterios de la OMS, un eyaculado normal debe tener por lo menos 30% de espermatozoides normales (WHO, 1992). En cambio para el criterio estricto, un hombre fértil debería tener más de 14% de formas normales y cuando es menor a 4% sería subfértil. Según Kruger et al, los resultados de FIV fueron subóptimos cuando la proporción de espermatozoides normales era menor al 14% y peor cuando era menor de 4% (Kruger et al, 1988).

Está ampliamente difundida la verificación de la morfología espermática en el diagnóstico de la infertilidad masculina, desde que MacLeod and Gold en 1951 mostraron que la morfología espermática era significativamente distinta entre hombres fértiles e infértiles.

A pesar de los intentos de estandarización para definir al espermatozoide con morfología normal existe una gran subjetividad en la clasificación de la morfología confundiendo en realidad la apariencia con la funcionalidad.

Para la OMS (1987), un espermatozoide normal no debería tener defectos en la cabeza (amorfa, pequeña, grande, alargada, piriforme), ni en la pieza intermedia, ni en la cola, considerando una proporción de 50% de formas normales como valor de referencia.

En el año 1992 la OMS propone un criterio más estricto y disminuye a 30 % el valor normal, considerando como anormales aquellas formas "borderline". De esta manera es considerada morfología anormal cualquier combinación de las formas de la cabeza (grande, pequeña, amorfa, con vacuola, doble cabeza), el defecto en la inserción de la pieza intermedia y el espesor de la misma y cualquiera de las siguientes anomalías de la cola (corta, enrulada, rota, grosor irregular, múltiple, con gota terminal y combinaciones). Las vacuolas en la cabeza del espermatozoide no pueden ocupar más del 20% de la superficie de la misma y las gotas citoplasmáticas en la pieza intermedia no pueden ser mayores al tercio del volumen de la cabeza y no más del 10% pueden tener mala inserción de la cola (WHO, 1992).

El criterio estricto considera además de los descriptos por la OMS dos categorías de amorfos para la cabeza: leve y severamente amorfo; y dos categorías para los defectos de cuello: levemente amorfo como los que tienen debris celular alrededor del mismo, y los severamente amorfos como los que tienen una mala inserción del cuello o anomalías de pieza intermedia en más del 30 %.

Si bien Kruger y colaboradores señalaron el valor del porcentaje de formas ideales en los resultados de FIV, no infirieron indicación de ICSI, fundamentalmente porque el mismo apareció mucho tiempo después. En la actualidad un valor bajo en la morfología inclina la balanza hacia el lado de ICSI.

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la morfología espermática sobre los procedimientos FIV e ICSI. Para ello, se utilizaron los datos de 165 procedimientos de FIV/ICSI con ovodonación; por lo tanto al no existir factor ovocitario constituiría un excelente modelo para evaluar la calidad del semen.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se analizaron los resultados de los procedimientos de fertilización in vitro realizados en 165 receptoras, 64 FIV, 81 ICSI y 20 FIV/ICSI. Los motivos de la ovodonación fue por falla ovárica de las receptoras. Todas las donantes fueron menores de 30 años, voluntarias y anónimas, con fertilidad comprobada y chequeadas clínica, infectológica y genéticamente. Se sincronizó la estimulación de las donantes con la preparación del endometrio de las receptoras. Las receptoras recibieron Lupron Depot 3.75®, mientras que las donantes Lupron 2.8®. El endometrio de las receptoras se preparó con Ronfase® cuando la donante comenzaba con la administración de Gonal-F®. Se discontinuó la administración de la misma cuando uno de los folículos alcanzó un diámetro igual a 22 mm. Se programó la aspiración entre 34 y 36 horas post HCG con Ovidrel®. La aspiración folicular se realizó por vía vaginal guiada ecográficamente y bajo anestesia local y neuroleptoanalgesia. Todos los ovocitos obtenidos de las donantes fueron inseminados o inyectados con el semen procesado de las parejas.

Todos los pacientes realizaron un espermograma previo al procedimiento.

La morfología espermática fue evaluada sobre portaobjetos preteñidos Cell-VU® de acuerdo con los criterios de Kruger et al. Se analizaron 200 espermatozoides con objetivo de inmersión 100X. De acuerdo con la morfología fueron divididos en 4 grupos: a) porcentaje de normales menor de 4 (23), b) entre 4 y menor de 10 (58), entre 10 y menor de 14 (23) y mayor o igual a 14 (61).

El semen fue obtenido por masturbación con una abstinencia de 2-3 días y procesado con Swim down más Swim up. En general, de acuerdo con la cantidad y calidad de la recuperación espermática los ovocitos fueron inseminados o inyectados. Sin embargo una proporción importante de casos con solamente morfología alterada accedieron a ICSI.

Se registraron las siguientes tasas en los tres diferentes procedimientos (FIV, FIV/ICSI e ICSI): fecundación normal, clivados, embriones buenos, implantación y embarazo.

Para el análisis estadístico se utilizaron los siguientes tests: prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, no paramétrico de Mann-Whitney, Chi cuadrado y Rho de Spearman.

## RESULTADOS

La media de ovocitos aspirados en las donantes fue de  $18.72 \pm 6.22$ . Todas las receptoras fueron transferidas con embriones ( $2.88 \pm 0.29$ ). La tasa de embarazo fue 43.0% y la de aborto 14.1%.

En la tabla I figura la correlación entre la calidad espermática y los resultados en los 165 procedimientos de

fecundación in vitro realizados. Se utilizó el coeficiente de correlación Rho de Spearman y no se halló relación significativa entre el porcentaje de espermatozoides normales y las variables fecundación, clivados, embriones buenos y tasa de implantación.

**Tabla I:** Correlación entre el porcentaje de espermatozoides normales y los resultados de FIV

Variables estudiadas	Rho de Spearman	P	N
Tasa fecundados normales	-0,011	NS	165
Tasa Clivados	0,116	NS	165
Tasa embriones Buenos	0,118	NS	165
Tasa implantación	-0,013	NS	165

En la tabla II se correlacionaron las mismas variables dividiendo en cuatro grupos la morfología espermática. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y no

se halló diferencia significativa entre los grupos de morfología y las variables analizadas.

Con la intención de conocer si había alguna variable con mayor influencia en el logro del embarazo, se tuvieron en cuenta los grupos de embarazo y no embarazo y se los correlacionó con las variables que figuran en la Tabla III. Se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney y si bien resultaron diferentes las tasas de fecundados normales y clivados en el grupo de embarazo, la diferencia fue solo entre 70.0% vs 65.6% y 93.0% vs 89.0%, respectivamente.

La tasa de embarazo en los tres tipos de procedimientos efectuados (FIV, FIV/ICSI e ICSI) fueron 45,3%, 40.0% y 42.0%, respectivamente.

En las tablas IV, V, VI y VII figuran las tasas de fecundación, clivados, calidad embrionaria e implantación en los tres tipos de procedimientos realizados (FIV, FIV/ICSI e ICSI) de acuerdo con la morfología espermática. El análisis de la varianza y la prueba de Levene evidenció que no hay diferencias en las tasas mencionadas en los tres tipos de procedimientos ni entre los diferentes grupos de morfología normal, excepto la tasa de embriones buenos que fue significativamente mayor en FIV que en ICSI o FIV/ICSI ( $p < 0.05$ )

**Tabla II:** Correlación entre las variables de FIV y los subgrupos de morfología espermática

Variables estudiadas	Normales < 4		4 ≤ Normales < 10		10 ≤ Normales < 14		Normales ≥ 14	
	N=23		N =58		N=23		N=61	
	Media	S	Media	s	Media	s	Media	s
Tasa fecundados normales	0,680	0,146	0,675	0,167	0,677	0,152	0,671	0,155
Tasa clivados	87%	17%	91%	14%	92%	16%	91%	15%
Tasa embriones Buenos	0,64	0,24	0,64	0,25	0,66	0,31	0,70	0,23
Tasa implantación	0,19	0,33	0,24	0,32	0,15	0,29	0,20	0,25

**Tabla III:** Influencia de las variables estudiadas sobre el embarazo

Variables estudiadas	No embarazo				Embarazo				p<
	N	Media	S	Rango medio	N	Media	S	Rango medio	
Ovocitos Recuperados	94	18,74	6,30	83,11	71	18,73	6,15	82,85	NS
Tasa fecundados normales	94	0,656	0,153	77,49	71	0,700	0,157	90,3	0,05
Tasa clivados	94	0,89	0,16	78,32	71	0,93	0,13	89,19	0,05
Morfología espermática Normal %	94	9,86	5,93	80,85	71	10,35	5,79	85,85	NS
Tasa embriones Buenos	94	0,65	0,24	79,46	71	0,68	0,26	87,69	NS

**Tabla IV:** Influencia de la morfología espermática sobre la fecundación en los diferentes procedimientos de fecundación in vitro.

Morfología espermática	FIV			FIV/ICSI			ICSI		
	Media	s	N	Media	s	N	Media	s	N
<b>Normales &lt; 4</b>	0,69	0,12	5	0,57	0,15	4	0,71	0,15	14
<b>4 ≤ Normales &lt; 10</b>	0,67	0,19	19	0,74	0,14	4	0,67	0,16	35
<b>10 ≤ Normales &lt; 14</b>	0,62	0,19	10	0,69	0,08	2	0,73	0,11	11
<b>Normales ≥ 14</b>	0,64	0,15	30	0,69	0,15	10	0,71	0,16	21
<b>Total</b>	0,65	0,17	64	0,67	0,14	20	0,70	0,15	81

**Tabla V:** Influencia de la morfología espermática sobre el clivaje en los diferentes procedimientos de fecundación in vitro.

Morfología espermática	FIV			FIV/ICSI			ICSI		
	Media	s	N	Media	s	N	Media	s	N
<b>Normales &lt; 4</b>	0,84	0,23	5	0,94	0,09	4	0,86	0,17	14
<b>4 ≤ Normales &lt; 10</b>	0,95	0,11	19	0,96	0,08	4	0,89	0,15	35
<b>10 ≤ Normales &lt; 14</b>	0,99	0,04	10	0,78	0,31	2	0,87	0,18	11
<b>Normales ≥ 14</b>	0,91	0,16	30	0,89	0,17	10	0,92	0,13	21
<b>Total</b>	0,93	0,14	64	0,90	0,15	20	0,89	0,16	81

**Tabla VI:** Influencia de la morfología espermática sobre la calidad embrionaria en los diferentes procedimientos de fecundación in vitro.

Morfología espermática	FIV			FIV/ICSI			ICSI		
	Media	s	N	Media	s	N	Media	s	N
<b>Normales &lt; 4</b>	0,63	0,24	5	0,58	0,39	4	0,66	0,21	14
<b>4 ≤ Normales &lt; 10</b>	0,75	0,25	19	0,87	0,09	4	0,55	0,22	35
<b>10 ≤ Normales &lt; 14</b>	0,79	0,27	10	0,43	0,10	2	0,59	0,33	11
<b>Normales ≥ 14</b>	0,75	0,20	30	0,65	0,28	10	0,65	0,24	21
<b>Total</b>	0,74	0,23	64	0,66	0,28	20	0,60	0,24	81

**Tabla VII:** Influencia de la morfología espermática sobre la implantación en los diferentes procedimientos de fecundación in vitro.

Morfología espermática	FIV			FIV/ICSI			ICSI		
	Media	s	N	Media	s	N	Media	s	N
Normales < 4	0,27	0,43	5	0,17	0,33	4	0,17	0,31	14
<b>4 ≤ Normales &lt; 10</b>	0,29	0,34	19	0,25	0,32	4	0,22	0,31	35
<b>10 ≤ Normales &lt; 14</b>	0,10	0,32	10	0,00	0,00	2	0,21	0,30	11
<b>Normales ≥ 14</b>	0,20	0,28	30	0,25	0,29	10	0,17	0,20	21
<b>Total</b>	0,22	0,32	64	0,21	0,28	20	0,20	0,28	81

En la Tabla VIII figuran las tasas de embarazo en relación a los tres tipos de procedimientos realizados ( FIV, FIV/ICSI e ICSI) y a la morfología espermática. Se aplicó el test Chi cuadrado y resultó no significativo.

**Tabla VIII:** Influencia de la morfología espermática sobre la tasa de embarazo en los diferentes procedimientos de fecundación in vitro.

Morfología espermática	FIV			FIV/ICSI			ICSI			
	Beta negativa	Beta positiva	Total	Beta negativa	Beta positiva	Total	Beta negativa	Beta positiva	Total	
Normales < 4	n	3	2	5	3	1	4	9	5	14
	%	60,0%	40,0%	100%	75,0%	25,0%	100%	64,3%	35,7%	100%
4 ≤ Normales < 10	n	9	10	19	2	2	4	21	14	35
	%	47,4%	52,6%	100%	50,0%	50,0%	100%	60,0%	40,0%	100%
10 ≤ Normales < 14	n	7	3	10	2	0	2	7	4	11
	%	70,0%	30,0%	100%	100,0%	0,0%	100%	63,6%	36,4%	100%
Normales ≥ 14	n	16	14	30	5	5	10	10	11	21
	%	53,3%	46,7%	100%	50,0%	50,0%	100%	47,6%	52,4%	100%

En la tabla IX se relacionó la morfología espermática con la tasa de aborto. Se aplicó el test exacto de Fisher que resultó no significativo.

**Tabla IX:** Relación entre la morfología espermática y la tasa de aborto

Morfología espermática	No aborto	Aborto	Total	
Normales < 4	n	7	1	8
	%	87,5	12,5	100,0
4 ≤ Normales < 10	n	23	3	26
	%	88,5	11,5	100,0
10 ≤ Normales < 14	n	5	2	7
	%	71,4	28,6	100,0
Normales ≥ 14	n	26	4	30
	%	86,7	13,3	100,0
Total	n	61	10	71
	%	85,90	14,10	100,00

Para verificar si la tasa de aborto dependía del procedimiento se compararon los datos de la tabla X. Se aplicó el test exacto de Fisher y no resultó significativo.

**Tabla X:** Relación entre tipo de procedimiento y tasa de aborto

Procedimientos	No aborto	Aborto	Total	
FIV	n	25	4	29
	%	86,2	13,8	100,0
FIV/ICSI	n	7	1	8
	%	87,5	12,5	100,0
ICSI	n	29	5	34
	%	85,3	14,7	100,0
Total	n	61	10	71
	%	85,9	14,1	100,0

En la tabla XI figuran las principales variables estudiadas y su relación con los procedimientos de FIV e ICSI dejando de lado los 20 procedimientos mixtos, para poder evaluar a los dos tipos de procedimientos.

**Tabla XI:** relación entre tipo de procedimientos y los resultados según FIV o ICSI

Variables estudiadas	FIV				ICSI				P<
	N	Media	s	Rango promedio	N	Media	s	Rango promedio	
Tasa fecundados normales	64	0,650	0,165	65,98	81	0,695	0,151	78,540	0,05
Tasa clivados	64	0,928	0,143	79,9	81	0,890	0,155	67,55	0,05
Morfología espermática Normales %	64	11,5	5,7	84,96	81	9,0	6,0	63,55	0,002
Tasa embriones Buenos	64	0,744	0,230	86,88	81	0,599	0,243	62,03	0,001
Tasa implantación	64	0,216	0,317	73,56	81	0,198	0,282	72,56	NS

**Discusión:**

Está ampliamente aceptado que la morfología estricta tiene una importante relevancia clínica, al punto tal que se la considera un excelente biomarcador de la capacidad fecundante in vivo e in vitro, independiente de la motilidad y concentración. A pesar de los intentos de estandarización para definir al espermatozoide con morfología normal, existe una gran subjetividad en la clasificación de la morfología, confundiendo, en realidad, la apariencia con la funcionalidad.

Si bien Kruger y colaboradores señalaron el valor óptimo del porcentaje de formas ideales en los resultados exitosos de FIV, no infirieron que porcentajes inferiores fueran indicación de ICSI, como se lo interpreta actualmente. En realidad un valor bajo en la morfología estricta inclina la balanza hacia la indicación del ICSI, sin tener en cuenta la concentración ni la movilidad.

En el presente trabajo evaluamos los resultados de 165 procedimientos de fecundación in vitro y se los relacionó con la morfología espermática de acuerdo con los criterios estrictos de Kruger. Como los procedimientos de FIV e ICSI fueron realizados con óvulos donados y endometrios preparados fisiológicamente, pensamos que constituiría el modelo ideal para evaluar la morfología espermática ya que los factores ovocitarios y endometriales no interferirían. La tasa global de embarazo fue de 43.0% y la de aborto 14.1%.

De acuerdo a nuestros datos no hay influencia de la morfología espermática en ninguna de las variables de relevancia para buenos resultados en fecundación in vitro, es decir, tasa de fecundación, clivados, embriones buenos, implantación, embarazo ni aborto (ver tablas I, II, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X). Estos hallazgos no concuerdan con lo previamente publicado por Kruger et al., 1986, que afirman que existe una excelente correlación entre los porcentajes de formas normales y las tasas de fecundación y embarazo, además de tener una alta precisión y un alto valor pronóstico (Kruger et al, 1986; Coetzee et al, 1998). Rogers et al ya habían señalado la importancia de la morfología en la capacidad fecundante de los espermatozoides (1983). Posteriormente otros autores reafirman los hallazgos de Kruger como Gopalkrishnan et al (1992), Ombelet et al (1994), Hernández et al (1996), Terriou et al (1997), Obara et al (2001). Por el contrario, nuestros resultados concuerdan con los publicados por Svalander et al (1996), Lundin et al (1997), Zahalsky et al (2003), McKenzie et al (2004), Powers et al (2004), Gvakharia et al (2005), Keegan et al (2007) y Wu Y et al (2008), quienes no encuentran relación con la morfología espermática ni aun en los casos de teratozoospermia severa, a pesar de que el operador siempre intenta elegir al mejor espermatozoide para inyectar.

¿Será realmente importante la morfología espermática en los resultados de fecundación in vivo e in vitro?. Para poder contestar esta pregunta, uno debería preguntarse cual es la real función del espermatozoide cuando ha logrado penetrar al ovocito. Todos sabemos que un espermatozoide funcional reanuda la segunda división del

ovocito, aporta el centríolo para el clivaje del huevo fecundado y la mitad del genoma, que se evidenciará alrededor de las 64 hs. post fecundación. Si uno asumiera que una morfología alterada fuera sinónimo de mala constitución genética, sería más entendible su relevancia en la fecundación y su posterior evolución. Sin embargo hoy no hay dudas de que aún los espermatozoides aneuploides pueden ser morfológicamente normales y fecundos (Celik-Ozenci et al, 2004) y además una buena morfología embrionaria no es sinónimo de euploidía (Handyside et Ogilvie, 1999; Munné et al, 2007). De hecho existen trabajos donde se demostró la ausencia de correlación entre la morfología y la aneuploidía espermática (Coco et al, 2002; Sun et al, 2006).

¿La morfología espermática estricta no será una apreciación estética más que funcional?. Obviamente que si tenemos en cuenta la función del espermatozoide, la morfología convencional de la OMS cumple con su propósito. Teniendo en cuenta que nuestro modelo de trabajo fue casi el ideal para apreciar el efecto de la morfología espermática, pensamos que la morfología estricta es más bien dependiente del esteticismo del operador y que en realidad no refleja alteración funcional alguna. Esto no quiere decir que las anomalías claramente objetivizables, usando los criterios de OMS tanto como los de Kruger, no sean importantes en los resultados de los procedimientos de FIV e ICSI, sino que las alteraciones mínimas en la morfología, son las que no tienen importancia. No hay dudas que la calidad embrionaria es el factor más importante en el logro del embarazo. Cabe consignar, como se aprecia en la tabla XI, que la calidad embrionaria en los procedimientos de FIV es superior a los de ICSI, por lo tanto, habría que tener en cuenta este dato y ser muy cuidadoso al utilizar la morfología estricta como indicación para ICSI.

**Agradecimientos:**

A Delia Garrido, por la evaluación estadística de los resultados.

**Referencias:**

Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. **Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations.** Hum Reprod 2004; 19: 2052 - 2059.

Coco R, Coco F, Gallo A, Urquiza M, Minzman J, Reynoso F, Neuspiller N. Aneuploidy rates in spermatozoa from men who have normal semen parameters. Proceedings Of 11<sup>th</sup> International Conference of Prenatal Diagnosis and Therapy; 2002 June 3-5; Buenos Aires, Argentina; 2002: 73.

Gvakharia M, Beri ZL, Adamson GD. Correlation between sperm morphology by Kruger's strict criteria and the outcome of ICSI in IVF cycles. Fertil Steril 2005; 84: S459.

WHO. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge; 1987: 1 - 67 pp.

Kruger TF, Menkveld R, Stander F, Lombard C, Van Der Merwe J, Van Zyl J, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic

- factor in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-1123.
- Gopalkrishnan K, Hinduja I, Kumar TC. Incidence of abnormalities in sperm morphology as an indicator of its fertilizing potential. *Indian J Med Res* 1992; 96: 215-218.
- Gvakharia M, Beri ZL, Adamson GD. Correlation between sperm morphology by Kruger's strict criteria and the outcome of ICSI in IVF cycles. *Fertil Steril* 2005; 84: S459.
- Handyside AH, Ogilvie CM. Screening oocytes and preimplantation embryos for aneuploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999, 11: 301-305.
- Hernandez M, Molina R, Olmedo J, Olmedo SB, Coetzee K, Estofán D. Prognostic value of the strict criteria: An Argentinian experience. *Arch Androl* 1996; 37 (2): 87-89.
- Keegan B, Barton S, Sanchez X, Berkeley A, Krey L, Grifo J. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007; 88: 1583-1588.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 112-117.
- Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. The relationship of sperm morphology and rates of fertility, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reprod* 1997; 12: 2676-2681.
- Mc Kenzie LJ, Kovansi E, Amato P, Cisneros P, Lamb D, Carson S. Pregnancy outcome of in-vitro fertilization / Intracytoplasmic sperm injection with profound teratospermia. *Fertil Steril* 2004; 82: 847-849.
- Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fisher J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007; 14 (5): 628-634.
- Obara H, Shibahara H, Tsunoda H, Taneichi A, Fujiwara H, Takamizawa S, Idei S, Sato I. Prediction of unexpectedly poor fertilization and pregnancy outcome using the strict criteria of sperm morphology before and after sperm separation in IVF-ET. *Int J Androl* 2001; 24 (2): 102-108.
- Ombelet W, Fourie FL, Vandeput H, Bosmans E, Cox A, Janssen M, Kruger TF. Teratozoospermia and in-vitro fertilization: A randomized prospective study. *Hum Reprod* 1994; 9 (8): 1479-1484.
- Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. Sperm morphology assessment: Historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update* 1995, 1: 543-557.
- Powers TL, Colver RM, Reuter LM, Bopp BL, Adaniya GK. The predictive value of Kruger's strict morphology on embryo development and early cleaving embryos. *Fertil Steril* 2004; 82: S531.
- Rogers BJ, Bentwood BJ, Van Campen H, Helmbrecht G, Soderdahl D, Hale RW. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl* 1983; 4: 119.
- Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 25 (4): 1-5.
- Svalander P, Jakobsson A, Forsberg A, Bengtsson A, and Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to "strict criteria" sperm morphology. *Human Reprod* 1996; 11: 1019-1022.
- Terriou P, Giorgetti C, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R. Teratozoospermia influences fertilization rates in-vitro but not embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 2 (5): 1069-1072.
- WHO. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge; 1987: 1 - 67 pp.
- WHO. Laboratory Manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge; 1992: 1 - 107 pp.
- Wu Y, Xu HM, Zhang SY, Xu WH, Tang F, Yang LH. Sperm morphology does not influence fertilization rate in-vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2008; 14 (7): 610-613.
- Zahalsky M, Zoltan E, Medley N, Nagler H. Morphology and the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 2003; 79 (1): 39-41.

# Transferência de embriões cultivados independentemente em meios de cultura essencial e sequencial melhora as taxas de gravidez em tratamentos com técnicas de reprodução assistida.

Transference of embryos cultivated independently in Essential and Sequential culture medium improves the rates of pregnancy in treatments with techniques of *in vitro* fertilization.

Selmo Geber<sup>1</sup>, Fábio Nascimento<sup>2</sup>, Renata Bossi<sup>3</sup>, Fernando Guimarães<sup>4</sup>, Marcello Valle<sup>5</sup>, Marcos Sampaio<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Ph.D, Diretor Clínico do Centro de Medicina Reprodutiva -ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil [selmogeber@origen.com.br](mailto:selmogeber@origen.com.br)

<sup>2</sup> Embriologista do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>3</sup> Embriologista Chefe do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

<sup>4</sup> Embriologista do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Rio de Janeiro/Brasil

<sup>5</sup> Diretor Clínico do Centro de Medicina Reprodutiva - ORIGEN, Rio de Janeiro /Brasil

<sup>6</sup> Ph.D, Diretor Clínico do Centro de Medicina Reprodutiva- ORIGEN, Belo Horizonte/Brasil

Apresentações: 2009: 9º Congresso da Rede Latinoamericana de Reprodução Assistida – Cancun / México

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o impacto da transferência simultânea de embriões cultivados independentemente em dois diferentes meios de cultura.

**Metodologia:** Finalizada a punção folicular, os oócitos de cada paciente foram separados em dois grupos e incubados por 2 horas conforme o meio de cultivo a ser usado até a transferência, Essencial ou Sequencial (Givf). Em seguida, realizou-se a denudação dos oócitos e após uma hora, a inseminação dos mesmos por ICSI. Logo após a inseminação, os oócitos pré-incubados em Essencial e Givf foram cultivados individualmente nos meios Essencial e Sequencial (G1) respectivamente. A fertilização foi checada 19 horas após a ICSI e no dia seguinte (dia 2) realizou-se a classificação e transferência embrionária. Todas as transferências foram realizadas em meio G2, de forma que pelo menos 1 embrião de cada meio de cultivo foi selecionado.

**Resultados:** Os resultados de gravidez dos ciclos que realizaram cultivo misto (bhcg = 51,85%) foram superiores, de forma significativa ( $p=0,00230$ ) aos ciclos que cultivaram apenas em G1 (bhcg=36,68%) e superiores ( $p= 0,09134$ ) aos que cultivaram e transferiram apenas em Essencial (bhcg= 44,2%).

**Conclusão:** O sistema de cultivo misto apresentou melhores resultados de gravidez em relação ao sistema seqüencial ( $p<0,05$ ). A diversidade de meios de cultivo demonstrou favorecer o melhor aproveitamento do potencial implantacional de embriões de um mesmo ciclo de Fertilização *in vitro*.

**Palavras-Chave:** Cultivo Misto, Meios de Cultura, Desenvolvimento embrionário, Transferencia Simultanea, Taxa de gravidez.

## ABSTRACT

**Objective:** Evaluate the impact of the simultaneous transfer of embryos cultivated independently in two different kinds of culture medium.

**Methodology:** After follicular aspiration, the oocytes of each patient were divided in two groups and incubated for 2 hours according to the culture medium to be used until the embryo transfer, Essential or Sequential (Givf). After the 2h of incubation, the oocytes denudation were performed and after more 1h the insemination were realized by ICSI. Just after insemination, the oocytes pre-incubated in Essential and Givf were cultured individually in Essential and Sequential (G1) respectively. The fertilization were evaluated 19h after ICSI and one day after (Day2) we realized the classification and embryo transfer. All transfers were realized in G2, and at least 1 embryo from each culture medium was chosen.

**Results:** The pregnancy outcomes of cycles which realized mixing culture (bhcg = 51,85%) were significantly higher ( $p=0,00230$ ) than the cycles that were cultivated only in G1 (bhcg = 36,68%) and superior ( $p = 0,09134$ ) to than that were cultivated and transferred only in Essential (bhcg = 44,2%).

**Conclusion:** The compound culture system, showed better results in relation to the sequential ( $p<0,05$ ). The diversity of culture medium showed to privilege a higher income of the embryo implantation potential on a same IVF cycle.

**Keywords:** Compound Culture, Culture Medium, Embryo Development, Simultaneous Transfer, Pregnant rates.

## INTRODUÇÃO

Uma das etapas mais importantes no tratamento com técnicas de reprodução assistida é o cultivo embrionário. Diversos tipos de meios de cultura tem sido propostos nos últimos anos (Biggers, 2002 e 2003; Summers & Biggers, 2003; Jones, 1998; Perin et al., 2008) com objetivo de melhorar o ambiente para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, de forma a mimetizar o ambiente natural, da forma mais aproximada possível.

É fundamental ter cuidados com substrato energético (Whitten, 1956, 1957; Biggers et al., 1967), presença de fontes fixas de nitrogênio como aminoácidos, albumina

ou soros (Loutradis et al., 2000), a adição de antioxidantes (Tarin, 1995; Vermeiden & Bast, 1995) e antibióticos (Biggers & Summers, 2008). O maior conhecimento sobre as vias metabólicas embrionárias, levaram a mudanças no que se considera ideal para os meios de cultura (Biggers & Summers, 2008).

Os primeiros meios de cultura utilizados foram os essenciais (*minimum essential media* - MEM) que contêm sais, glicose, bicarbonato de sódio e vermelho fenol, devendo ser suplementado com piruvato e albumina (Biggers et al., 1967) suprindo assim as necessidades energéticas e de pH, para todo o período de desenvolvimento pré-implantacional.

Posteriormente, foram desenvolvidos os meios chamados de seqüenciais, uma vez que apresentavam diferentes composições de acordo com a fase de desenvolvimento embrionário. Esse meio contém sais, glicose, piruvato, aminoácidos, antibióticos, anti-oxidantes e bicarbonato de sódio, devendo ser suplementado com albumina (Pool, 2002, 2005).

Não existem, até o momento, estudos que tenham demonstrado a superioridade de um tipo de meio de cultura sobre os demais, com relação ao desenvolvimento embrionário e taxas de gravidez, quando a transferência é realizada até o dia 3 (Biggers & Summers, 2008). Além disso, não se sabe se alguns embriões seriam mais beneficiados por um tipo de meio de cultura do que outro.

Assim, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito da exposição de embriões de um mesmo ciclo a dois diferentes meios de cultura, com posterior transferência de pelo menos um embrião cultivado em cada meio de cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 652 casais submetidos a tratamento de infertilidade pela técnica de reprodução assistida, no período de janeiro de 2007 a julho de 2008, foi incluído no estudo. Deste total, 243 tiveram os embriões cultivados em dois tipos de meio de cultura, isto é, Essencial e Seqüencial - cultivo misto; 169 casais tiveram os embriões cultivados apenas em meio Seqüencial, e 240 casais apenas em meio Essencial.

### Indução da ovulação

A indução da superovulação foi feita com FSH recombinante (rFSH - Gonal F - Serono - Brasil) e a dose foi adequada de acordo com a resposta individual, avaliada por ultrasonografia seriada e dosagem sérica de estradiol, conforme descrito previamente (Geber et al., 2002).

A supressão da função hipofisária foi realizada com análogo do GnRH (Lectrum - Sandoz - Brasil) na fase folicular precoce ou lútea tardia (Geber et al., 2002b), ou antagonista do GnRH (Cetrotide - Serono - Brasil), iniciado quando os folículos apresentavam diâmetro médio de 14mm, para mulheres com idade  $\geq 40$  anos.

Quando os folículos atingiam um diâmetro médio de 17 mm com níveis concordante de estradiol, administrouse hCG recombinante (Ovidrel - Serono - Brasil), e ~34 horas após foi realizada a punção folicular para aspiração dos oócitos, guiada por ultrasonografia endovaginal.

### Fertilização in vitro, cultivo e transferência embrionária

Após a identificação e separação dos oócitos do líquido folicular, os mesmos foram transferidos para tubos com 1ml de meio de cultura. No grupo de cultivo misto, os embriões foram alocados igualmente para os dois

meios de cultura. Nos demais grupos, todos os embriões foram alocados para um tipo de meio de cultura, apenas. Após duas horas de incubação em meio de cultura, os oócitos foram denudados em hialuronidase com pipeta afilada. O preparo do sêmen foi realizado pela técnica de *swim up* modificado (Geber et al., 2002c).

Aproximadamente duas horas depois todos os oócitos foram inseminados pela técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) e a fertilização foi confirmada após 19 horas. Os embriões foram mantidos em meio de cultura cobertos por óleo mineral (Sigma - EUA) a 37°C e 7% de CO<sub>2</sub>. A transferência embrionária foi realizada no dia 2 ou 3 pós ICSI utilizando-se catéter Soft (Sydney IVF - Cook - Austrália). Foram considerados embriões de boa qualidade aqueles que tinham 2 a 4 células, com blastômeros regulares e fragmentação de até 10% (Veeck, 1999).

O suporte de fase lútea foi feito com progesterona por via vaginal (Crinone 8% - Serono - Brasil). O teste de gravidez ( $\beta$  hCG serico) foi realizado 14 dias após a punção folicular, e uma vez positivo ( $>25$  mUI/ml), realizou-se ultrasonografia 10 dias após, seguida de nova ultrasonografia 10 dias depois. Foram consideradas grávidas as pacientes que apresentaram batimentos cardíaco-fetais ao exame.

### Meio de cultura

O meio de cultura Essencial foi o Earle's Balanced Salt Solution (EBSS - SIGMA - EUA) suplementado a 10% com soro sintético substituto (SSS - Irvine Scientific - EUA) e 0,47mM de piruvato (Sigma - EUA) (Caro & Trounson, 1986). O meio Seqüencial foi composto por duas partes, G-IVF (Vitrolife - Suécia) para manipulação de gametas, e G1 (Vitrolife - Suécia), para cultivo até dia 3. A suplementação foi feita com 10% de Human Serum Albumin (HSA - Irvine Scientific - EUA) para o G-IVF e 5% de HSA para o G1. O meio de transferência utilizado em todos os casos foi o G2 (Vitrolife - Suécia) suplementado com 5% de HSA. Os suplementos adicionados em cada meio possuíam diferentes concentrações de Albumina, sendo 50mg/ml para SSS e 100mg/ml para HSA.

Foram denominados ciclos de cultivo Misto aqueles em que pelo menos um embrião cultivado em cada tipo de meio de cultura tenha sido transferido. Quando os embriões transferidos foram cultivados em meios G-IVF e G1, foram denominados cultivo Seqüencial, e quando os embriões transferidos foram cultivados apenas em EBSS, foram denominado cultivo Essencial.

### Análise Estatística

Foi realizado um estudo prospectivo tipo caso controle. O cálculo amostral foi realizado considerando-se um poder de 80%, sendo necessários pelo menos 103 pacientes para cada grupo. Foram utilizados os testes de qui-quadrado ou t de student quando adequado. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

A idade das pacientes variou de 21 a 45 anos, com média de 34,4. Nos grupos de cultivo Misto, Seqüencial e Essencial as médias de idade foram de 34, 34,2 e 35,1, respectivamente. O grupo de meio Essencial apresentou idade superior aos demais ( $p=0,024$ ). O tempo de indução da superovulação e dose total de rFSH foi semelhante nos três grupos, com média de 11 dias e 2325 UI. O número de oócitos em metáfase II foi semelhante nos três grupos (Tabela 1).

Quando comparamos o número médio de embriões de boa qualidade obtidos nos três grupos, identificamos

uma menor proporção no grupo de embriões cultivado em meio Seqüencial, com uma média de 4 embriões, enquanto nos grupos Misto e Essencial a média observada foi de 4,6 embriões (Tabela 1).

Identificamos uma maior taxa de gravidez no grupo de cultivo Misto, quando comparada com o grupo de cultivo Seqüencial ( $p=0,002$ ). Apesar de não significativa, observamos uma maior taxa de gravidez no grupo de cultivo Misto quando comparado ao grupo de cultivo Essencial (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação entre o número de oócitos MII, embriões de boa qualidade, embriões transferidos e taxas de gravidez entre os grupos estudados.

	Cultivo Misto	Cultivo Seqüencial	Cultivo Essencial
Oócitos em MII	10,7	9,77	7,42*
Embriões de boa qualidade	4,6	4	4,6 †
Embriões transferidos	3,9	3,2	3,2‡
Taxa de Gravidez	51,9%	36,7%	44,2%§

\*  $p>0,05$  quando comparados os três grupos - teste t de student

†  $p<0,05$  quando comparados cultivo misto e seqüencial - teste t de student

‡  $p<0,05$  quando comparados cultivo misto e seqüencial - teste qui quadrado

## DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que o cultivo de embriões, de um mesmo ciclo de tratamento, em diferentes meios de cultura determinou aumento nas taxas de gravidez, quando comparado aos ciclos cujos embriões foram cultivados em um único meio. Em nosso entender, esse é o primeiro estudo que faz esse tipo de avaliação. Os resultados sugerem também, que diferentes embriões podem ter diferentes necessidades fisiológicas durante o período de desenvolvimento preimplantacional, ainda que provenientes de um mesmo casal.

O aumento nas taxas de gravidez encontrado pode ser explicado pelas diferenças nos dois meios de cultura utilizados simultaneamente para embriões de um mesmo casal. Assim, ampliamos os tipos de oferta, aumentando a chance de atender às principais necessidades metabólicas de cada pool de embriões, pois em todas as transferências havia pelo menos um embrião de cada um dos dois tipos de meio de cultura, ao invés de apenas um meio de cultura.

Nossos resultados confirmam os achados de Trounson & Caro (1986) (Caro & Trounson, 1986) sobre a não essencialidade da presença de um grupo complexo de aminoácidos para o adequado desenvolvimento de todos embriões. Tal afirmação sustenta-se no fato de que apesar do meio Seqüencial possuir suplementação com HSA e aminoácidos como fonte de proteína, o meio Essencial possui apenas o SSS.

Os dois meios de cultura apresentavam fontes de nitrogênio fixado em diferentes proporções tanto nos suplementos (HSA e SSS) quanto na adição direta de aminoácidos. Este fato reafirma as conclusões de Houghton *et al* (2002) (Franchesca *et al.*, 2002), que descreveram a capacidade de embriões na fase pré-implantacional de selecionar e consumir gradativamente os elementos mais importantes para o próprio desenvolvimento, sem necessariamente que embriões pertencentes a um mesmo ciclo apresentem o mesmo padrão de seletividade. Não há conformidade fisiológica em retirarmos aminoácidos dos meios de cultivo.

Nosso trabalho reafirmou os achados de Barak *et al* (1998) (Barak *et al.*, 1998) e Macklon *et al* (2002) (Macklon *et al.*, 2002) demonstrando que em determinados meios a glicose não inibe o desenvolvimento embrionário inicial. Uma vez que ambos os meios utilizados possuem glicose em toda a sua constituição.

Podemos concluir que a transferência de embriões provenientes de meios de cultura diferentes, sendo um Essencial e outro Seqüencial, pode determinar um aumento nas taxas de gravidez em ciclos de reprodução assistida.

## Referências Bibliográficas

Biggers JD. Fundamentals of the design of culture media that support human preimplantation development. In: Van Blerkom J, ed. Essential IVF. Norwell, MA: Kluwer Academic Press, 2003:291-332.

Biggers JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in medium KSOMAA: is a two-step protocol necessary? *Reprod BioMed Online* 2002;5:133-40.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:560-7.

Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:560-7.

Barak Y, Goldman S, Gonen Y, Nevo Z, Bartoov B, Kogosowski A. Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes? *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 4): 203-11.

Caro CM, Trounson A. Successful fertilization, embryo development, and pregnancy in human in vitro fertilization (IVF) using a chemically defined culture medium containing no protein. *J In Vitro Embryo Transfer* 1986;3:215-7.

Franchesca D.H, Judith A.Hawkhed, Peter G.Humpherson, Jan E.Hogg, Adam H.Balen, Anthony J.Rutherford and Henry J.Leese. Non-invasive acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Human Reproduction* 2002; vol. 17 No.4; 999-1005.

Geber S; Sales L; Sampaio MAC. Comparison between a single dose of goserelin (depot) and multiple daily doses of leuprolide acetate for pituitary suppression in IVF treatment: a clinical endocrinological study of the ovarian response. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2002;19(7):313-8.a

Geber S; Ferreira DP; Prates LFVS; Sales L; Sampaio M. Effects of previous ovarian surgery for endometriosis on the outcome of assisted reproduction treatment. *Reproductive biomedicine online* 2002;5(2):162-6.b

Geber S; Sales L ; Sampaio M. Laboratory techniques for human embryos. *Reproductive Bio Medicine Online* 2002; 5, 211-218.c

Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N,Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13:169-77.

John D. Biggers, D.Sc., Ph.D., and Michael C. Summers, MD., Ph.D. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertility and Sterility, Modern Trends* 2008;90:473-83.

Lucinda L. Veeck. An Atlas of Human Gametes and Conceptions: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology, 1999.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Sofikitis N, Kallipolitis G, Milingos S, Makris N, Michalas S. Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development, and implantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 900: 325-35.

Macklon NS, Pieters MHEC, Hassan MA, Jeucken PHM, Eijkemans MJC, Fauser BCJM. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human

blastocyst development. Hum Reprod 2002;17:2700-5.

Perin PM, Malif M, Janu\_ario DANF, Saldiva PHN. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. Fertil Steril 2008. Published online 25 January 2008 [Epub ahead of print].

Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety. Semin Reprod Med 2002;23:309-18.

Pool TB. Recent advances in the production of viable human embryos in vitro. Reproductive Bio Medicine Online 2005;4:294-302.

Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos; historical perspective and current issues. Hum Reprod Update 2003;9:557-82.

Whitten WK. Culture of tubal ova. Nature 1956;177:96.

Whitten WK. Culture of tubal ova. Nature 1957;179:1081-2.

(Antioxidantes) J. J. Tarín. **Antioxidants in IVF culture media.** Human Reproduction 1995; 10:698.

(Antioxidantes) J.P.W. Vermeiden and A. Bast **Antioxidants in IVF culture media.** Human Reproduction 1995; March 1995; 10: 696 - 697.

# Comparação Entre o Período de Abstinência Sexual e Diferentes Parâmetros Seminais em Pacientes de uma Clínica de Reprodução Assistida e de um Hospital de Porto Alegre - RS

## Comparison Between Length of Sexual Abstinence and Semen Parameters in Patients of an Assisted Reproduction Center and a Hospital from Porto Alegre - RS

Rivaroli MS<sup>1</sup>, Frantz G<sup>2</sup>, Bos-Mikich A<sup>3</sup>, Batista MR<sup>4</sup>, de Fraga LS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz (CPRHNF), Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

<sup>4</sup> Hospital Fêmina (HF), Porto Alegre, Brasil.

**Instituições Executoras:** CPRHNF/ UFRGS/ FEEVALE/HF

### RESUMO

Os parâmetros de morfologia, motilidade e concentração de espermatozoides determinam a qualidade de uma amostra seminal e alterações nestes parâmetros podem afetar a fertilidade do indivíduo. O presente trabalho teve como objetivo analisar diferentes parâmetros de qualidade seminal e compará-los com o período de abstinência sexual. Para isso, foi realizado um estudo retrospectivo de análise de prontuários de 33 pacientes. Os valores dos parâmetros seminais foram comparados em um mesmo paciente entre dois períodos: após uma primeira coleta com um período de abstinência curto (período A, 1-4 dias), e após uma segunda coleta com um período de abstinência maior (período B - máximo 5 dias de abstinência). Houve o acréscimo de pelo menos um dia de abstinência de diferença entre os dois períodos e não houve intersecção entre eles. Para a análise dos resultados foi utilizado um Teste T de Student para amostras pareadas. Os resultados mostraram um aumento significativo nos valores de concentração e motilidade no período mais longo (Concentração: período A=31,1±5,19; período B=44,846±7,738;  $P<0,01$ . Motilidade: período A=42,51±3,32; período B=53,27±3,15;  $P<0,001$ ; média±erro padrão). Não foram verificadas diferenças significativas nos demais parâmetros analisados (Morfologia: período A=22,57±1,79; período B=25,36±2,004;  $P=0,059$ . Volume: período A=2,83±0,225; período B=3,32±0,369; Vitalidade: período A= 58,83±2,98; período B=57,23±2,43; média±erro padrão,  $P>0,05$ ). Um período de abstinência de até 5 dias parece ideal para que a maturidade espermática se complete, tornando os espermatozoides mais aptos à fertilização. Assim, o aumento no período de abstinência (até 5 dias) parece produzir uma melhora na qualidade seminal e pode ser um dado importante para casais que enfrentam problemas de fertilidade.

**Palavras-chave:** Abstinência sexual; Espermatogênese; Qualidade seminal; Fertilidade;

### ABSTRACT

The parameters of morphology, motility and sperm concentration confer quality to a semen sample and changes in these parameters may affect male fertility. The present study aimed to compare different parameters of semen quality after two different sexual abstinence periods. The semen analysis of 33 patients were retrospectively analyzed. Semen parameters were compared for each patient in two different periods of sexual abstinence: period A short (1-4 days) and period B long (maximum of 5 days of abstinence). There was at least one more day of sexual abstinence between the two periods and there was not any overlapping between them. Results were analyzed by Student's *t*-test for paired samples. Results showed a significant increase in sperm concentration and motility for the more prolonged period of sexual abstinence (Concentration: period A= 31,1±5,19; period B= 44,846±7,733;  $P=0,0026$ . Motility: period A=42,51±3,32; period B= 53,27±3,15;  $P=0,00038$ ). No significant differences were detected for any of the other parameters analyzed (Morphology: period A= 22,57±1,79; period B=24,36±2,004;  $P=0,059$ ; Volume: period A=2,83±0,225; period B=3,32±0,369; Viability: period A= 58,83±2,98; period B= 57,23±2,43; mean ± standard error,  $P>0,05$ ). An abstinence period up to 5 days seems ideal for sperm maturation, possibly by making sperm more competent to fertilization. Thus, an increase of the sexual abstinence of up to 5 days seems to improve semen quality and may represent an important factor to consider when treating infertile couples.

**Keywords:** Sexual abstinence; Spermatogenesis; Semen quality; Fertility;

### INTRODUÇÃO

Os parâmetros de morfologia, motilidade e concentração total de espermatozoides conferem a qualidade de uma amostra seminal e alterações nestes parâmetros

podem afetar a fertilidade do indivíduo. Após a espermatogênese, os espermatozoides formados permanecem armazenados nos testículos e/ou nos epidídimos até o momento da ejaculação (Junqueira & Carneiro, 2008). A motilidade é induzida durante a ejaculação quando os espermatozoides se misturam com as secreções das glândulas acessórias (Lindholmer, 1974). Ela é o parâmetro mais importante no processo fertilizante (Donnelly *et al.*, 1998). Se não houver ejaculação em um intervalo de até 5 dias a qualidade dos espermatozoides diminui (Bras *et al.*, 1996). A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza como período padrão de tempo de abstinência o intervalo entre 2 e 5 dias. Tal recomendação é de grande importância para aumentar as possibilidades de fecundação em casais que enfrentam problemas de fertilidade (OMS1999).

Sauer e colaboradores (1988), realizaram um estudo com o sêmen de 10 indivíduos férteis com períodos de abstinência de 12 horas, 1, 3 e 5 dias e observaram uma correlação positiva entre concentração, volume e o aumento do período de abstinência. Entretanto a motilidade espermática não foi afetada pelo período de abstinência. Por outro lado, a motilidade progressiva é um parâmetro que sofre redução se a abstinência for muito longa, como 10 dias (Magnus *et al.*, 1991).

A análise de outros períodos de abstinência (24 horas e 4 dias), também mostrou um aumento do volume, da concentração e da motilidade no período mais longo (Matilsky *et al.*, 1993).

Outro parâmetro que está relacionado à abstinência é a fragmentação do DNA. A análise dos parâmetros seminais e de fragmentações do DNA em espermatozoides de 11 homens que mantiveram períodos de abstinência de 1, 3, 5 ou 8 dias, mais uma vez demonstrou o aumento da concentração e do volume com o aumento do período de abstinência. A motilidade, o pH e a vitalidade ficaram inalterados e não foram detectadas alterações significativas na fragmentação de DNA relacionadas ao aumento do período de abstinência (Jonge *et al.*, 2004).

A fragmentação do DNA é um parâmetro inversamente correlacionado à qualidade seminal. O aumento da fragmentação do DNA está comumente associado a populações que apresentam diminuição da morfologia normal, da motilidade e da concentração de espermatozoides (Murator *et al.*, 2008).

Visto que poucos estudos dessa natureza têm sido realizados no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes parâmetros de qualidade seminal e relacioná-los com o período de abstinência sexual em indivíduos da cidade de Porto Alegre, RS.

## MÉTODOS

O presente trabalho compreende estudo retrospectivo de análise de prontuários de 15 pacientes da Clínica de Pesquisa e Reprodução Assistida Nilo Frantz (do período de 2000 a 2008) e de 18 pacientes do Hospital Fêmina (do período de 2007 a 2008), ambos na cidade de Porto Alegre, RS. Os parâmetros de qualidade seminal foram comparados em um mesmo paciente entre o período de abstinência A (curto, de 1 a 4 dias) onde foi realizada a primeira coleta para o espermocitograma e o período de abstinência B (longo, de 2 a 5 dias) no qual foi realizada a segunda coleta. Houve o acréscimo de pelo menos um dia de abstinência de diferença entre os dois períodos, não havendo intersecção entre eles. As análises foram realizadas pela mesma analista em ambos os locais, utilizando a mesma metodologia sugerida pela OMS (1999). As análises consistiram de observações microscópicas das amostras coletadas, utilizando-se a Câmara de Makler® (Fertility Makler), para a contagem dos espermato-

zoides (concentração/ml) e a análise da motilidade. A motilidade dos espermatozoides foi classificada em A (direcionais rápidos), B (direcionais lentos), C (não direcionais) e D (imóveis). As amostras foram coradas com o kit Instant Prov, (Newprov/Brasil) para a avaliação da morfologia da cabeça, da peça intermediária ou da cauda. A medição do volume foi realizada utilizando-se um tubo cônico graduado.

Os prontuários contendo os resultados dos espermocitogramas que puderam ser analisados deveriam conter todas as informações sobre o espermocitograma tais como volume, concentração, motilidade, morfologia e vitalidade. A idade média dos pacientes foi de 34 anos e o período médio entre as coletas foi de 83 dias. O índice de normalidade seminal (NMS) das amostras foi calculado a partir do cálculo descrito por Jensen *et al.* (2004): volume X concentração X % de espermatozoides móveis rápidos e direcionais (tipos A e B) X % de morfologia normal. Este índice representa o número total de espermatozoides normais com motilidade normal para cada amostra seminal. A média dos valores totais encontrados nos espermocitogramas é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Médias dos valores dos espermocitogramas

Parâmetros seminais	Média±Erro padrão	Variações
Volume (mL)	3,08±0,21	0,8-10
pH	7,98±0,02	7,5-8,5
Motilidade (%)	47,89±2,36	6-85
Morfologia Normal (%)	23,95±1,34	3-47
Concentração (x 10 <sup>6</sup> /mL)	37,97±4,70	0,11-179
Idade Média (anos)	34,03±1,67	21-60
Média entre as coletas (dias)	83,2±6,72	5-242
Média Período A (dias)	2,75±0,17	1-4
Média Período B (dias)	4,1±0,18	2-5
Vitalidade (%)	58,035±1,91	16,66-84,5

Nota: Totalizados 66 espermocitogramas de 33 homens.

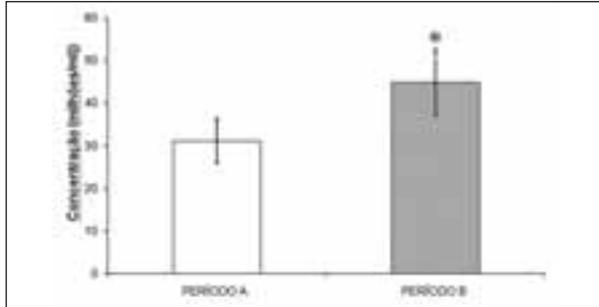
A normalidade das amostras foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A análise estatística foi realizada através do Teste T de Student para amostras pareadas (período longo versus período curto do mesmo paciente). Os dados são apresentados como média ± erro padrão com um nível de significância de 0,05.

Foram analisados 90 prontuários. O critério para exclusão dos espermocitogramas foi a falta de apresentação de alguma das informações necessárias para a análise ser realizada. Também foram excluídos os prontuários de pacientes que realizaram as duas coletas com o mesmo período de abstinência. Foram selecionados para este estudo 76 prontuários, sendo que 10 destes apresentaram períodos de abstinência maiores do que 5 dias.

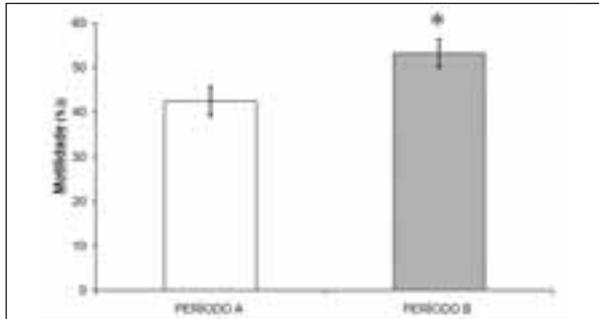
## RESULTADOS

A análise dos espermocitogramas mostrou um aumento significativo nos valores de concentração (período A=31,1 ± 5,19; período B=44,846 ± 7,738;  $P<0,01$ ) e motilidade (período A=42,51 ± 3,32; período B=53,27 ± 3,15;  $P<0,001$ ), com o aumento do período de abstinência sexual (Figuras 1 e 2). Os valores de morfologia normal (período A=22,57 ± 1,79; período B=25,36 ± 2,004;  $P=0,059$ ), volume (período A=2,83ml ± 0,225; período B=3,32ml ± 0,369;  $P>0,05$ )

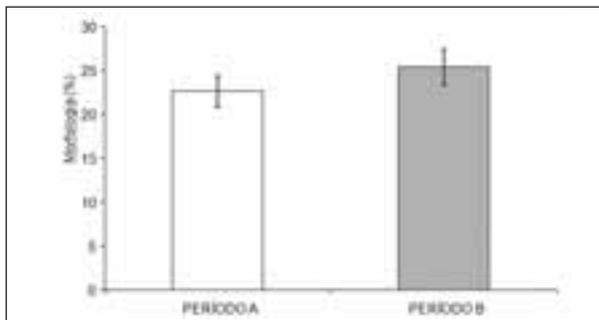
e vitalidade (período A=  $58,83 \pm 2,98$ ; período B=  $57,23 \pm 2,43$ ;  $P>0,05$ ) não apresentaram alterações estatisticamente significativas ( Figuras 3, 4 e 5, respectivamente). Cinco pacientes que realizaram as coletas com um período de abstinência maior do que 5 dias, não foram incluídos nos resultados descritos acima. Entretanto, a análise dos espermocitogramas destes pacientes mostrou que existe uma redução do NMS com o aumento do período de abstinência (Figura 6). Observou-se, portanto, uma tendência para diminuição do NMS após 5 dias de abstinência.



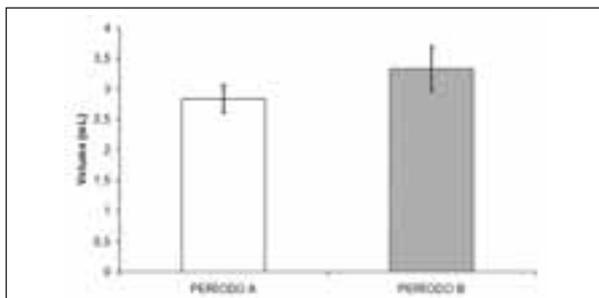
**Figura 1:** Média das concentrações de espermatozoides (concentração - milhões/ml) em dois períodos de abstinência sexual. Período A (curto); Período B (longo). Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste T,  $*P<0,05$ ). O número amostral foi de 33 para cada ponto.



**Figura 2:** Motilidade espermática (%) em dois períodos de abstinência sexual. Período A (curto); Período B\* (longo). Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste T,  $*P<0,05$ ). O número amostral foi de 33 para cada ponto.

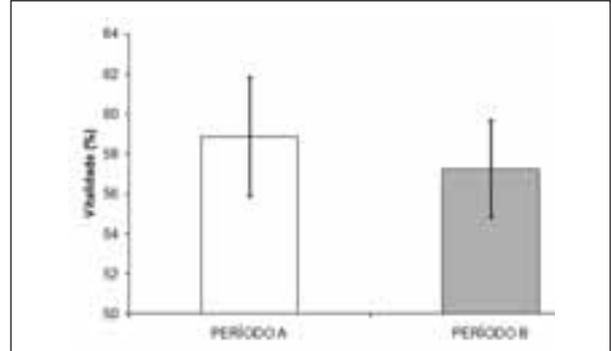


**Figura 3:** Morfologia espermática normal (%) em dois períodos de abstinência sexual. Período A (curto); Período B (longo). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste T,  $P>0,05$ ). O número amostral foi de 33 para cada ponto.

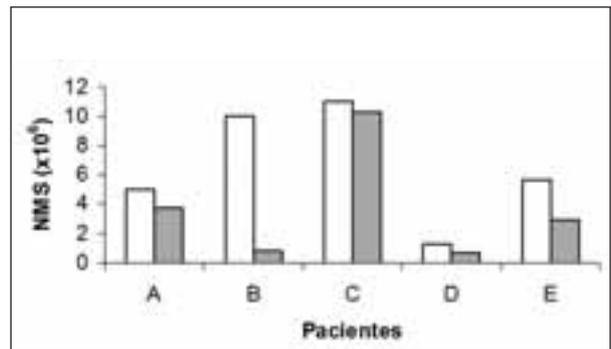


**Figura 4:** Volume seminal (mL) em dois períodos de abstinência sexual.

al. Período A (curto); Período B (longo). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste T,  $P>0,05$ ). O número amostral foi de 33 para cada ponto.



**Figura 5:** Vitalidade (%) em dois períodos de abstinência sexual. Período A (curto); Período B (longo). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas (Teste T,  $P>0,05$ ). O número amostral foi de 33 para cada ponto.



**Figura 6:** Índice de Normalidade Seminal (NMS x  $10^6$ ) em dois períodos de abstinência sexual. Período A (curto - barras brancas); Período B (longo - barras hachuradas). Observa-se uma diminuição do NMS em relação ao aumento do período de abstinência para cada um dos pacientes analisados. \*A: 4 e 10 dias de abstinência; \*B: 3 e 6 dias; \*C: 5 e 7 dias; \*D: 5 e 10 dias; \*E: 4 e 6 dias;

## DISCUSSÃO

O estudo permitiu a observação de que o aumento do período de abstinência até 5 dias ocasiona uma melhora significativa em relação à motilidade e à concentração de espermatozoides. A morfologia, o volume, e a vitalidade não apresentaram diferenças significativas em relação aos dois períodos.

Os espermatozoides são formados nos túbulos seminíferos e em seguida percorrem o epidídimo. A barreira hematotesticular permite que o sangue entre em contato com o epidídimo para que haja uma troca de nutrientes e íons, permitindo a ocorrência da primeira fase da maturação dos espermatozoides. Após a passagem pelo epidídimo os espermatozoides seguem para o canal deferente onde cerca de 60% dos mesmos são armazenados. No momento da ejaculação as vesículas seminais secretam no ducto ejaculatório substâncias nutritivas contendo frutose, ácido cítrico, prostaglandinas e fibrinogênio. A próstata secreta um líquido que contém cálcio, zinco, fosfato e antígeno específico da próstata (PSA), neutralizando a acidez dos outros líquidos seminais e conferindo um caráter alcalino ao sêmen final. Essa é a última fase de maturação dos espermatozoides (Guyton & Hall, 2006).

Nossos resultados mostrando a melhora da motilidade com o aumento do período de abstinência estão de acordo com outros estudos que indicam que múltiplas ejaculações diminuem as reservas testiculares. Assim períodos mais curtos de abstinência estão associados a baixas concentrações das substâncias secretadas pelas glândulas acessórias como o zinco (próstata) e  $\alpha$ -glucosidase neutra (NAG - epidídimo) (Cooper *et al.*, 1993). A NAG secretada está diretamente correlacionada com a motilidade do espermatozóide, pois otimiza os níveis energéticos dessas células (Fouri *et al.*, 1991; Elzanaty *et al.*, 2002). O zinco é outro fator importante, pois regula a atividade proteolítica do PSA no plasma seminal. Estudos indicam que o PSA está envolvido com a degradação da proteína responsável pela formação do coágulo do sêmen (Robert & Gagnon, 1996) e foi também correlacionado com a motilidade (Elzanaty *et al.*, 2005).

A frutose é o principal substrato energético utilizado pelo espermatozóide (Mann, 1964). A diminuição do conteúdo de frutose no sêmen de pacientes com curto período de abstinência já foi previamente evidenciada (Cooper *et al.*, 1993).

Assim, os resultados estão de acordo com a hipótese de que o aumento do período de abstinência provoca um concomitante aumento da quantidade de espermatozoides formados, aumentando a concentração espermática por mL de sêmen.

Entretanto, o aumento da abstinência por um período maior do que 5 dias está relacionado à reabsorção dos espermatozoides pelo epidídimo e a uma diminuição da motilidade dos mesmos (Bras *et al.*, 1996). A diminuição da motilidade pode estar relacionada ao aumento da porcentagem de defeitos encontrados na cauda (Blackwell & Zaneveld 1992; Pellestor *et al.*, 1994). A motilidade também depende da morfologia dos espermatozoides (Bedford, 1979). Não foi encontrado no presente trabalho aumento de defeitos na cauda, apenas uma diminuição do NMS. Entretanto, se cada variável usada para o cálculo do NMS for isolada, verifica-se que o parâmetro que sofreu maior alteração com o aumento do período de abstinência sexual foi a motilidade rápida e progressiva dos espermatozoides.

## CONCLUSÃO

A maturação final dos espermatozoides livres no epidídimo e no canal deferente depende de fatores nutricionais e hormonais presentes no lúmen destas estruturas. Um período de abstinência de alguns dias parece ser benéfico para que a maturidade se complete, tornando os espermatozoides mais aptos à fertilização. Observamos que a motilidade e a concentração foram os parâmetros mais afetados com o aumento do período de abstinência sexual, possivelmente uma consequência da exposição mais prolongada às substâncias secretadas pelas glândulas acessórias. Assim, o aumento do período de abstinência (até 5 dias) produz uma melhoria na qualidade seminal do paciente. Os efeitos de períodos de abstinência maiores do que 5 dias precisam ser estudados em maior escala para serem conclusivos.

### Correspondência:

Marcelo Silveira Rivaroli  
 Campo Novo 234, Ipanema, Porto Alegre  
 Rio Grande do Sul, Brasil  
 (51) 81206000  
 mrivaroli@gmail.com

## Referências Bibliográficas

- Bedford JM. Evaluation of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In Fawcett DW and Bedford JM (eds), *The Spermatozoon*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, pp. 7-21. 1979.
- Blackwell JM & Zaneveld LJ. Effect of abstinence on sperm acrosin, hypoosmotic swelling, and other semen variables. *Fertil Steril*. 1992;58:798-802.
- Cooper TG; Keck C; Oberdieck U, Nieschlag E. Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *EUA Human Reproduction*. 1993;8:1251-1258.
- Donnelly ET, Lewis SEM, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *EUA Fertility Sterility*. 1998;70:305-314.
- Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *EUA Human Reproduction*. 2002;17:2904-2911.
- Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. *EUA Human Reproduction*. 2005;20(1):221-225.
- Fourie MH, du Toit D, Bornman MS, Van der Merwe MP, Du Plessis DJ.  $\alpha$ -Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch Androl*. 1991;26:139-141.
- Guyton & Hall. *Funções Reprodutivas e Hormonais Masculinas (e Função da Glândula Pineal)*. In: Guyton & Hall, eds. *Tratado de Fisiologia Médica* 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier editora Ltda.; 2006. p. 996-1002.
- Jensen TK, Andersson AM, Jorgerssen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *EUA Fertility and Sterility*. 2004;82(4):863-870.
- Jonge CD, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *EUA Fertility and Sterility*. 2004;82(1):57-65.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Aparelho reprodutor masculino*. In: Junqueira LC, eds. *Histologia Básica* 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A; 2008. p. 414-428.
- Lens JW and Rijnders PM. The spermatozoon - theory. In: Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M and Zeilmaker GH, eds. *IVF Lab - Laboratory Aspects of In vitro Fertilization*. Amsterdam: NV Organon; 1996. P. 177-203.
- Lindholmer C. The importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol Reprod*. 1974;10:533-542.
- Magnus O, Tollefsrud A, Abyholm T, Purvis K. Effects of varying the abstinence period in the same individuals on sperm quality. *Arch Androl*. 1991;26:199-203.
- Mann T. Fructose, polyols, and organic acids. In: Nam T, eds. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Methuen & Co. Ltd; 1964. p. 237-264.

Matilsky M, Battino S, Ben-Ami M, Geslevich Y, Eyali V, Shalev E. The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population. *EUA Human Reproduction*. 1993;8:71-73.

Muratoril M, Marchiani S, Tamburrino L, Tocci V, Failli P, Forti G, Baldi E. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *EUA Hum Reprod*. 2008;23(5):1035-1043.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Manual de Laboratório para o Exame do Sêmen Humano e Interação Esperma-Muco

Cervical. 3.ed. Brasil: Livraria Santos; 1999. 111p.

Pellestor F, Girardet A, Andreo B. Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *Int J Fertil*. 1994;39:278-282.

Robert M & Gagnon C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod*. 1996;55:813-821.

Sauer MV, Zeffer KB, Buster JE, Sokol RZ. Effect of abstinence on sperm motility in normal men. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;158:604-607.

# Endometriose e Infertilidade: Causa ou Consequência?

## Endometriosis and infertility: cause or consequence?

William Kondo<sup>1 2</sup>, Rui Alberto Ferriani<sup>3</sup>, Carlos Alberto Petta<sup>4</sup>, Maurício Simões Abrão<sup>5</sup>, Vivian Ferreira do Amaral<sup>2 6</sup>

<sup>1</sup> Ginecologista e Cirurgião Geral do Hospital Vita Curitiba, Paraná.

<sup>2</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

<sup>4</sup> Unicamp

<sup>5</sup> USP

<sup>6</sup> Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná

### RESUMO

A endometriose é uma doença ginecológica benigna que acomete mulheres em idade reprodutiva e se manifesta sob a forma de dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade. A associação de endometriose e infertilidade tem sido reconhecida há anos, embora ainda não haja uma evidência definitiva de causalidade. É claro que nos casos de doença em estágio avançado com distorção mecânica da anatomia pélvica a infertilidade é facilmente explicada. No entanto, a ligação entre a endometriose inicial e a infertilidade ainda permanece controversa. Os mecanismos de infertilidade associados à endometriose incluem foliculogênese anormal, estresse oxidativo aumentado, função imune e ambiente peritoneal e folicular alterados, e receptividade endometrial reduzida. Estes fatores levam a pior qualidade do ócito e prejuízo na fertilização e na implantação. Neste artigo, revisamos a literatura médica a respeito da fisiopatologia da infertilidade relacionada à endometriose.

Key-words: endometriose, endometriomas, infertilidade, fertilização *in vitro*.

### ABSTRACT

Endometriosis is a benign gynecological disorder affecting women of reproductive age and can have a varied symptomatology including chronic pelvic pain, dysmenorrhea, and infertility. The association of endometriosis and infertility has been recognized for years, although definite evidence of causality still eludes us. It is clear that in the advanced stage of the disease with mechanical disruption of the pelvic anatomy, infertility is easily explained. Nevertheless, the link between early stage endometriosis and infertility remains a source of controversy. The mechanisms of infertility associated with endometriosis include abnormal folliculogenesis, elevated oxidative stress, altered immune function, and hormonal milieu in the follicular and peritoneal environments, and reduced endometrial receptivity. These factors lead to poor oocyte quality, impaired fertilization, and implantation. In this manuscript we review the medical literature concerning the pathophysiology of the endometriosis-related infertility.

Key-words: endometriose, endometriomas, infertilidade, fertilização *in vitro*. Key-words: endometriosis, endometriomas, infertility, *in vitro* fertilization.

### INTRODUÇÃO

A endometriose é uma doença caracterizada pelo crescimento de glândulas endometriais e/ou estroma em sítios extra-uterinos. O local mais comum dos implantes de endometriose é a cavidade peritoneal, mas lesões têm sido ocasionalmente encontradas na cavidade pleural, fígado, rim, músculos glúteos e bexiga. A localização anatômica e a resposta inflamatória a essas lesões parecem ser responsáveis pelos sinais e sintomas associados ao binômio endometriose/infertilidade (Pritts & Taylor, 2003).

### Epidemiologia

A endometriose tem sido observada em mulheres com idade entre 12 e 80 anos, sendo a idade média de diagnóstico em torno de 28 anos. A exposição aos hormônios ovarianos parece ser essencial para o desenvolvimento desta condição. Não há nenhuma predileção racial ou sócio-econômica conhecida. Nos casos de doença severa, parece haver uma predisposição de caráter familiar, mas nenhuma hereditariedade mendeliana foi identificada, e a maioria dos autores acredita ser uma ocorrência poligênica multifatorial.

A prevalência da endometriose varia de 2 a 50% em mulheres em idade reprodutiva. A variabilidade nas taxas estimadas de prevalência reflete a população estudada e o método de diagnóstico empregado. Em mulheres com infertilidade, a prevalência varia de 20 a 50% e se acredita que a endometriose tenha um papel deletério no potencial de fertilidade dessas mulheres (Pritts & Taylor, 2003).

### Sintomatologia

A dor pélvica, representada por dismenorréia, dispareunia, disúria e disquezia, está presente na maior parte das mulheres com endometriose. Geralmente se inicia antes da menstruação e continua durante todo o período menstrual. A dor também pode ser referida em regiões músculo-esqueléticas como flancos, região lombar baixa ou panturrilhas (Pritts & Taylor, 2003).

Outro sintoma comum é a infertilidade. Mulheres com doença moderada a severa podem ter problemas de infertilidade causados pelo bloqueio mecânico da união entre o espermatozóide e o óvulo, ou pelas aderências/destruição da anatomia pélvica normal. Mulheres com doença mínima ou leve, no entanto, também têm fecundidade dimi-

nuída quando comparadas àquelas sem evidência clínica de endometriose. As causas exatas ainda permanecem desconhecidas, mas vários mecanismos são postulados.

### **A endometriose é causa de infertilidade?**

A associação entre endometriose e infertilidade tem sido repetidamente relatada na literatura, mas até hoje ainda não foi definida nenhuma relação causa-efeito (Pritts & Taylor, 2003). Quando a endometriose cria distorção da anatomia pélvica normal ou obstrução das trompas, o risco de infertilidade é alto. Em mulheres com endometriose moderada a severa (aquelas com grande distorção da anatomia pélvica), muitos estudos citam uma taxa de gravidez próxima a zero (Pritts & Taylor, 2003). No entanto, quando se consideram os efeitos da endometriose mínima ou leve, a controvérsia é maior.

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar a menor fertilidade em mulheres portadoras de endometriose, incluindo a alteração na foliculogênese, levando à disfunção ovariana e pior qualidade do oócito, assim como os defeitos na fase lútea, a taxa de fertilização diminuída e a embriogênese anormal.

A taxa de fecundidade mensal para casais normais em idade reprodutiva é de cerca de 20-30% para os três primeiros ciclos e diminui para 4% nos casais que tentam a gravidez por mais de 1 ano. Os casais que obtêm a gestação nos primeiros meses são mais férteis e cerca de 18% dos casais não conseguem a gravidez ao final de 1 ano (Zinaman et al., 1996). Nas mulheres com diagnóstico de endometriose e infertilidade, a taxa de fecundidade mensal varia de 2 a 10%.

Existem, no entanto, estudos que não mostram uma correlação entre a severidade da endometriose e o prognóstico reprodutivo. Em uma série de 2080 mulheres com infertilidade, o diagnóstico laparoscópico de endometriose foi estabelecido em 1263 delas (60,7%). As taxas de concepção foram idênticas em mulheres com e sem endometriose, gerando uma incerteza na relação causa-efeito (Inoue et al., 1992).

A melhora do potencial de fertilidade em mulheres com endometriose tem sido investigada após tratamento clínico, cirúrgico ou combinado. Os tratamentos clínicos normalmente não têm sucesso e os resultados dos tratamentos cirúrgicos têm sido inconsistentes (Gupta et al., 2008). Dois estudos randomizados e controlados que investigaram os efeitos do tratamento cirúrgico na endometriose leve geraram resultados conflitantes (Marcoux et al., 1997; Parazzini, 1999).

### **Foliculogênese**

A foliculogênese alterada em mulheres com endometriose pode contribuir para disfunção ovulatória, pior qualidade dos oócitos, taxas de fertilização reduzidas, piores embriões e menores taxas de implantação (Pellicer et al., 2000).

Em um estudo observacional de fertilização *in vitro* (FIV) usando ciclos naturais, a fase folicular foi significativamente mais longa e a taxa de fertilização menor em pacientes com endometriose mínima e leve comparadas com mulheres com infertilidade por fator tubário ou sem causa aparente (Cahill et al., 1997). Mulheres com endometriose apresentam taxa de crescimento folicular mais lenta e menor tamanho do folículo dominante comparadas com mulheres com infertilidade sem causa aparente (Tummon et al., 1988). Trinder e Cahill (2002) também observaram que mulheres com endometriose têm desenvolvimento folicular, ovulação e função lútea anormais. Contraditoriamente, Mahmood e Templeton (1991) não encontraram diferenças significativas na duração da fase folicular e no desenvolvimento dos folículos dominantes nas pacientes com endometriose.

### **Função das células da granulosa**

As alterações na cinética das células da granulosa das pacientes com endometriose podem ser responsáveis pela deficiência no crescimento folicular e na maturação oocitária. Analisando-se o ciclo celular das células da granulosa de pacientes com e sem endometriose através de citometria de fluxo, observa-se um menor número de células na fase G2/M e um aumento tanto na fase S quanto nas células apoptóticas nas mulheres com endometriose (Saito et al., 2002).

A qualidade dos oócitos também pode ser influenciada pela apoptose das células da granulosa. A apoptose aumenta proporcionalmente com a severidade da doença e resulta em pior qualidade dos oócitos e redução nas taxas de fertilização e de gravidez. A redução significativa das taxas de gravidez em pacientes com endometriose submetidas a FIV pode ser consequência deste processo de apoptose. Células da granulosa aspiradas de mulheres com endometriose durante ciclos de FIV mostraram maior evidência de stress oxidativo e taxas aumentadas de apoptose e de alterações no ciclo celular (Saito et al., 2002).

Estudos clássicos utilizando culturas *in vitro* de células da granulosa foram capazes de demonstrar um aumento na síntese de estradiol e de progesterona em mulheres com endometriose (Garrido et al., 2000). Pellicer et al (1998b) demonstraram um aumento na produção de progesterona (indicando oócitos maduros) nos casos mais severos de doença, sem diferença nos valores de estradiol, androsterona e testosterona. A relação estradiol/testosterona, previamente considerada um fator importante no prognóstico da FIV, foi surpreendentemente mais favorável nas mulheres com endometriose.

### **Estresse oxidativo nas células da granulosa**

Os marcadores de estresse oxidativo como o 8-hidroxil-2-nonenal (usado para a avaliação do dano oxidativo ao DNA) e o 4-hidroxil-2-nonenal (produto da peroxidação lipídica) estão significativamente elevados em células da granulosa de mulheres com endometriose (Saito et al., 2002). Sugere-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO) elevadas, que levam ao estresse oxidativo, são produzidas por eritrócitos e células apoptóticas de endometriomas, assim como por macrófagos ativados que são recrutados para fagocitar as células apoptóticas.

O estresse oxidativo exerce seu papel na infertilidade por meio de múltiplos mecanismos: (1) indução de degeneração e apoptose do oócito por meio de distúrbio do eixo meiótico, (2) danificação das células via peroxidação lipídica (Agarwal et al., 2006) levando a aumento da permeabilidade da membrana, danificação da integridade da membrana, inativação de enzimas e dano estrutural do DNA; morte celular rapidamente se segue, (3) indução de fragmentação embrionária quando é utilizada a injeção intracitoplasmática de espermatozoides e impedimento do desenvolvimento *in vitro* dos blastocistos (Agarwal et al., 2006), e (4) indução de inflamação local resultando em níveis elevados de citocinas e de outros fatores que promovem a endometriose.

### **Alterações na função imune e hormonal do fluido folicular**

A endometriose está associada com alterações inflamatórias no fluido folicular e no fluido peritoneal. Concentrações aumentadas de linfócitos B, células natural killer, monócitos-macrófagos, interleucinas (IL-6, IL-1b, IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), assim como diminuídas de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) têm sido documentadas no fluido folicular de pacientes com endometriose e infertilidade (Garrido et al., 2000; Pellicer et al., 1998a).

### Fator de crescimento vascular endotelial

Os níveis reduzidos de VEGF em mulheres com endometriose (Garrido et al., 2000) podem estar associados com menores taxas de implantação e pior qualidade embrionária (Pellicer et al., 2000), uma vez que o VEGF parece estar relacionado com o aumento da saúde e da vascularização folicular.

### Fator de necrose tumoral alfa

Calberg et al (2000) observaram concentrações significativamente elevadas de TNF- $\alpha$  em culturas de células da granulosa de mulheres com endometriose. Esta elevação pode estar envolvida na fisiopatologia da infertilidade tendo em vista que o TNF- $\alpha$  parece aumentar a adesividade das células do estroma endometrial ao mesotélio peritoneal, provavelmente por aumento da expressão de moléculas de adesão celular ICAM1 e Sele.

### Interleucinas

O ciclo das células da granulosa pode estar alterado em pacientes com endometriose por influência das citocinas (Saito et al., 2002). A IL-10 elevada impede a regulação descendente (down regulation) natural do p27, causando parada na fase G0. Muitas outras citocinas que estão aumentadas no fluido folicular de pacientes com endometriose (como IL-6, IL-1b, IL-8 e IL-1a) também induzem várias anormalidades no ciclo celular, podendo contribuir para a subfertilidade em tais pacientes (Saito et al., 2002).

### Hormônios

Alterações nas concentrações do hormônio luteinizante, estrogênio, progesterona e activina do fluido folicular foram relatadas em alguns ciclos estimulados e não estimulados (Cahill et al., 1997; Pellicer et al., 1998b). Concentrações reduzidas de hormônio luteinizante no fluido folicular foram associadas com fertilização prejudicada de oócitos *in vitro*, mesmo com concentrações normais de hormônio folicular estimulante e esteróides. Harlow et al (1996) relataram níveis reduzidos de estradiol e progesterona nas células da granulosa, tanto em ciclos estimulados quanto não estimulados.

Alterações nas vias enzimáticas dos esteróides ovarianos podem ser moduladas por citocinas secretadas por células ovarianas e leucócitos (Pellicer et al., 2000). A endotelina-1 parece ser uma potente inibidora da esteroidogênese nas células da granulosa em ratas *in vitro* e está elevada no fluido folicular de pacientes com infertilidade associada a endometriose (Abaé et al., 1994). Também foi demonstrado que o aumento dos níveis de IL-6 nos folículos pré-ovulatórios de pacientes com endometriose resultam em diminuição da atividade da aromatase. Isto acarreta uma diminuição na conversão intra-folicular de androstenediona a estrona, seguida de uma conversão reduzida de androstenediona a testosterona, que seria aromatizada a estradiol. A redução resultante nos níveis foliculares de estradiol podem então aumentar os problemas de fertilidade (Yoshida et al., 2004). Níveis alterados de progesterona também têm sido encontrados no fluido folicular de pacientes com endometriose; no entanto, a relação direta entre infertilidade e níveis de progesterona modificados ainda deve ser estabelecida (Pellicer et al., 2000).

### Função imune e o ambiente peritoneal

Alterações na imunidade humoral e mediada por células têm sido encontradas no meio ambiente peritoneal de pacientes com endometriose (Oosterlynck et al., 1993). Depósitos de imunoglobulinas e de complemento têm sido observados em tecido endometrial ectópico. Mathur et al (1982) demonstraram a presença de auto-anticor-

pos para os antígenos endometriais em mulheres com endometriose. Acredita-se que esses anticorpos anti-endométrio se desenvolvem como uma resposta fisiológica para atuar contra a endometriose.

Os vários componentes da imunidade mediada por células (como os macrófagos pélvicos ativados) estão aumentados no fluido peritoneal de pacientes inférteis com endometriose, resultando em uma cascata inflamatória peritoneal local. Foi proposto que esta resposta inflamatória pode acarretar um aumento da implantação ectópica de tecido endometrial, assim como seu crescimento e sua proliferação. As células natural killer, responsáveis pelo reconhecimento e destruição de linhagens celulares estranhas transplantadas, e os linfócitos T também estão aumentados (Lebovic et al., 2001). Oosterlynck et al (1993) demonstraram que nas mulheres com endometriose há uma atividade supressiva significativa do fluido peritoneal sobre a citotoxicidade das células natural killer e dos leucócitos. Tal mecanismo de supressão pode ser uma tentativa adicional do organismo de limitar a progressão da endometriose, o que nos permite propor que essa cascata inflamatória pode estar relacionada com a infertilidade nessas mulheres.

As alterações imunológicas peritoneais resultam em proliferação de células do estroma endometrial, proliferação de linfócitos, aumento da ativação cíclica de macrófagos e presença de auto-anticorpos não órgão-específicos. Os leucócitos e outras células secretam citocinas e fatores de crescimento no espaço extra-celular endometrial, onde funcionam como mediadores de comunicação intercelular efetuando a atividade parácrina do sistema imune (Lebovic et al., 2001). A secreção aumentada de RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) atua como um quimio-atrator para monócitos e células T de memória, assim como um mediador de inflamação.

A IL-6 é uma citocina que regula as respostas inflamatória e imune no ambiente peritoneal por meio da ativação de linfócitos T e da diferenciação dos linfócitos B. É produzida pelas células epiteliais e estromais endometriais em resposta à indução do estrogênio pela IL-1 e pelo TNF- $\alpha$ . Um aumento dos níveis de IL-6 pode estar associado com efeitos deletérios na motilidade espermática (Yoshida et al., 2004).

O excesso de TNF- $\alpha$  no fluido peritoneal é produzido pelos linfócitos ativados, macrófagos e células NK em pacientes com endometriose, e causa um aumento da produção de prostaglandinas pelas células endometriais epiteliais, inicia um processo de liberação de citocinas inflamatórias e promove a aderência das células endometriais ectópicas ao peritônio (Carlberg et al., 2000).

O aumento da concentração de VEGF no fluido peritoneal de mulheres com endometriose tem sido relatado, mas a origem deste aumento ainda não foi determinada. O VEGF induz a formação de uma matriz de fibrina promotora de angiogênese na cavidade peritoneal, que pode contribuir para aderências pélvicas e aumentar a taxa de captura de tecido endometrial livre. Estes fatores podem promover a progressão da endometriose (Lebovic et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 são reguladores ascendentes da matriz metaloproteinase, que regula o turnover da matriz extracelular e pode aumentar a invasividade dos fragmentos endometriais. Como os níveis de TNF- $\alpha$  e de IL-1 estão aumentados no fluido peritoneal de mulheres com endometriose, a matriz metaloproteinase provavelmente está aumentada em tais mulheres, embora estudos não tenham confirmado esta noção.

A catepsina D é uma protease ácida amplamente distribuída em células animais e humanas. Ela inicia eventos proteolíticos resultando na degradação da membrana basal e de componentes da matriz extracelular. Suzumori

et al (2001) observaram aumento dos seus níveis no fluido peritoneal de mulheres com endometriose em estágios III e IV comparado com estágios I e II, e diminuição nas mulheres tratadas com agonistas de GnRH.

### **Ambiente peritoneal e estresse oxidativo**

O aumento do número e da atividade de macrófagos na endometriose é acompanhado pela liberação de citocinas e de outros mediadores imunes como o óxido nítrico. O óxido nítrico é um radical livre e um bio-regulador de apoptose. Baixos níveis de óxido nítrico são importantes tanto para a função ovariana quanto para a implantação. No entanto, quantidades aumentadas de óxido nítrico e de óxido nítrico sintase são vistos no endométrio de mulheres com endometriose (Khorram & Lessey, 2002). Esses altos níveis parecem (1) diminuir a fertilidade em decorrência dos seus efeitos deletérios na função dos ovidutos e na motilidade espermática e (2) ser tóxicos aos embriões e inibir a implantação. Foi sugerido que a redução da produção de óxido nítrico no fluido peritoneal ou o bloqueio dos efeitos do óxido nítrico poderia melhorar a fertilidade na endometriose. A FIV pode melhorar a taxa de concepção em mulheres com endometriose evitando o contato dos gametas e embriões com fatores potencialmente tóxicos no peritônio e nos ovidutos.

A ativação dos leucócitos polimorfonucleares e dos macrófagos também resulta em aumento da produção de ERO. Alguns estudos investigando a associação do óxido nítrico, peróxido lipídico e ERO no fluido peritoneal não encontraram nenhuma diferença entre mulheres com e sem endometriose. Amaral et al (2005) avaliaram o fluido peritoneal de 21 mulheres com infertilidade/endometriose e 21 mulheres férteis submetidas a ligadura tubária e observaram que o nível de peroxidação lipídica não diferiu nos dois grupos, sugerindo que o aumento das ERO pode não ser um dos fatores responsáveis pelo comprometimento da fertilidade em mulheres com endometriose.

As alterações da foliculogênese, presumidamente causadas pelo stress oxidativo, podem prejudicar a qualidade dos oócitos e ser uma causa de subfertilidade. Saito et al (2002) observaram que os níveis do marcador de stress oxidativo 8-hidroxi-1-desoxiguanosina foram maiores em pacientes com endometriose do que em pacientes com infertilidade tubária, masculina ou sem causa aparente. Um aumento de seis vezes nos níveis de 8-hidroxi-1-desoxiguanosina e de peróxido lipídico foi demonstrado em endometriomas ovarianos comparado com tecido endometrial normal.

Também foi demonstrado que o stress oxidativo pode induzir dano ao DNA genômico e mitocondrial (Aitken & Krausz, 2001), o que leva à diminuição na fertilidade.

### **Endometriose e função espermática**

A função espermática prejudicada tem sido implicada na patogênese da infertilidade/endometriose, assim como na toxicidade ao embrião e ao oócito. Novamente, os dados da literatura são conflitantes. Um aumento da fagocitose do esperma foi encontrado por alguns autores durante a incubação de células peritoneais de mulheres com endometriose (Jha et al., 1996). No entanto, outros não foram capazes de comprovar tais achados (Awadalla et al., 1987). Resultados de estudos *in vitro* de motilidade também são variados (Burns & Schenken, 1999), embora o transporte espermático através das trompas pareça não ser diferente em mulheres com endometriose leve e sem a doença.

O aumento da geração de ERO pelos macrófagos ativadas pode induzir fragmentação do DNA em células espermáticas. O efeito direto das ERO nos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular causa a peroxidação lipídica, uma das mais destrutivas formas existentes de

oxidação (Van Langendonck et al., 2002). A peroxidação lipídica causa vários efeitos indesejáveis, tais como aumento na permeabilidade da membrana, perda da integridade da membrana e inativação enzimática no espermatozóide (Agarwal et al., 2006). Além disso, o stress oxidativo severo pode levar à infertilidade através de seu impacto negativo na reação acrossomal e na fusão espermatozóide-oócito.

Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  também têm efeitos adversos na função e na integridade espermática. Dois mecanismos foram propostos para explicar este efeito: (1) o TNF- $\alpha$  poderia estimular a apoptose em células espermáticas e (2) o TNF- $\alpha$  estimularia o espermatozóide a gerar ERO, levando à peroxidação lipídica e diminuindo o potencial espermático de fertilizar um óvulo (Said et al., 2005).

A IL-6 elevada também pode contribuir para a subfertilidade devido aos seus efeitos na motilidade espermática no útero. Parece que a IL-6 combinada ao seu receptor, ambos presentes no fluido peritoneal, associa-se à glicoproteína-130 (gp130) expressada no esperma e acarreta diminuição da motilidade espermática (Yoshida et al., 2004).

### **Endometriose e fertilização**

Há dados conflitantes no que diz respeito à relação causal entre a endometriose e os resultados da FIV (Harlow et al., 1996; Pal et al., 1998; Simón et al., 1994). Pal et al (1998) relataram uma redução significativa nas taxas de fertilização em estágios III e IV de endometriose comparado com estágios I e II. Por outro lado, Matson e Yovich (1986) não foram capazes de identificar um efeito significativo nas taxas de fertilização.

Uma explicação possível para os piores resultados da FIV em mulheres com endometriose é a qualidade comprometida do oócito, já que tem sido demonstrado que as doadoras de oócitos com endometriose estabelecem menores taxas de gravidez do que as doadoras sem a doença (Pellicer et al., 1995; Simón et al., 1994).

Um outro mecanismo envolve o efeito do fluido folicular na interação dos gametas. O fluido folicular normal induz reação acrossomal e aumenta a ligação do espermatozóide à zona pelúcida. Qiao et al (1998) relataram que o fluido peritoneal obtido de mulheres com endometriose submetidas a fertilização *in vitro* resultou em redução significativa da ligação do espermatozóide à zona pelúcida.

Os desfechos da reprodução assistida em pacientes com endometriomas também são controversos. Tanto em ciclos naturais como estimulados por clomifeno, a ressecção prévia do endometrioma foi associada com menor resposta folicular no ovário (Loh et al, 1999). Teoricamente, a cirurgia pode estar associada com remoção inadvertida de tecido ovariano normal e dano causado pela eletrocoagulação utilizada para hemostasia.

Alguns estudos não mostraram diferenças nos resultados da FIV em pacientes com endometriomas (Al-Azemi et al., 2000). Em contraste, outros investigadores encontraram que mulheres com endometrioma têm números diminuídos de folículos pré-ovulatórios, menor taxa de fertilização e redução do número de embriões transferidos comparado com mulheres com infertilidade por hidro-salpinge e aderências (Dlugi et al., 1989).

### **Endometriose e implantação**

A receptividade endometrial diminuída pode ser secundária à maturação histológica atrasada ou a distúrbios bioquímicos (Lessey et al., 1994). Outro mecanismo envolve a molécula de adesão celular integrina avb3. Lessey et al (1994) demonstraram que a expressão da integrina avb3 está aumentada no endométrio durante a janela de implantação, mas está reduzida ou ausente em pacientes com endometriose. Também foi encontrado que a desregulação de outros genes no endométrio de

pacientes com endometriose pode levar à implantação embrionária prejudicada, embriotoxicidade, disfunção imune e apoptose durante a janela de implantação. Estudos com doação de oócitos comparando as taxas de sucesso em mulheres sem doença recebendo oócitos de mulheres com endometriose e em mulheres com endometriose recebendo oócitos "normais" encontraram que mulheres normais recebendo oócitos de pacientes com endometriose tiveram menores taxas de sucesso, podendo-se deduzir que a causa principal de subfertilidade em pacientes com endometriose deriva de oócitos disfuncionais e não de oócitos alterados pelo ambiente. Vários estudos com doação de oócitos têm sido conduzidos e dados conflitantes têm sido obtidos. Alguns estudos mostraram que mulheres normais recebendo oócitos de pacientes com endometriose tiveram menores taxas de sucesso, enquanto que outros estudos não encontraram diferença significativa (Navarro et al., 2003).

### Endometriose e qualidade oocitária/embrionária

O estudo com doação de oócitos é uma oportunidade única para investigar os resultados reprodutivos em mulheres com endometriose. Trata-se de uma opção terapêutica para mulheres com infertilidade associada à endometriose e insucessos repetidos com FIV. A avaliação dos resultados reprodutivos de mulheres com e sem endometriose severa recebendo oócitos doados de mulheres saudáveis é uma das formas de se tentar avaliar como a doença afeta a fertilidade.

Pellicer et al (1995) compararam três grupos de mulheres do seu programa de doação de oócitos: mulheres com falência ovariana prematura (n=54), mulheres com baixa resposta (n=77) e mulheres com endometriose (n=10). Com um número similar de embriões em cada grupo, não houve diferenças entre os grupos nas taxas de gravidez por paciente e por ciclo e nas taxas de implantação. Os autores também avaliaram os resultados de acordo com a fonte de oócitos doados para comparar a implantação de embriões de mulheres com infertilidade por fator tubário, endometriose, distúrbios ovulatórios, laqueadura prévia e fator masculino. Não houve diferença nas taxas de gravidez por transferência; no entanto, as taxas de implantação foram significativamente menores em mulheres que receberam oócitos de mulheres com endometriose. Em um estudo prospectivo, três grupos foram comparados: 44 doadoras e receptoras sem endometriose, 14 doadoras com endometriose que doaram oócitos para receptoras sem a doença e 16 doadoras sem endometriose que doaram oócitos para receptoras com endometriose. O segundo grupo mostrou uma diminuição nas taxas de gravidez por transferência e nas taxas de implantação, o que sugere que os embriões de mulheres com endometriose apresentam uma capacidade reduzida de implantação. Contraditoriamente, alguns estudos prévios demonstraram que a endometriose não é deletéria para a implantação (Simón et al., 1994; Sung et al., 1997); entretanto, estes estudos foram retrospectivos e não controlados com relação à origem dos oócitos.

Díaz et al (2000) conduziram um estudo em que os oócitos foram doados para mulheres com e sem endometriose severa para confirmar ou rejeitar a hipótese de que o ambiente endometrial não afeta a fertilidade em mulheres com endometriose severa. Vinte cinco receptoras de oócitos com endometriose estágio III e IV e 33 receptoras sem a doença foram comparadas. As doadoras incluíram dez mulheres que foram submetidas a FIV e 15 mulheres jovens férteis que doaram oócitos voluntariamente. O número de oócitos doados, a taxa de fertilização, o número de embriões disponível, o número de embriões

transferidos e o número médio de embriões de boa qualidade transferidos não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. As taxas de gravidez, de implantação e de aborto não foram afetadas pela endometriose estágio III e IV quando comparado com o grupo controle. A taxa de nascidos vivos foi igual.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A endometriose é uma doença enigmática. Ainda não se sabe se os estádios iniciais de endometriose são uma causa de infertilidade ou se a endometriose é apenas um achado incidental em mulheres com infertilidade sem causa aparente. Também não se sabe se a subfertilidade nas mulheres com a doença em estádios avançados ocorre devido a alterações anatômicas ou fisiológicas. Os dados conflitantes existentes na literatura refletem as limitações no desenho de vários estudos, que incluem grupos heterogêneos de mulheres, doenças em estádios diferentes, grupo controle composto por mulheres férteis e sem endometriose, diferentes terapêuticas clínicas e cirúrgicas usadas para o tratamento da endometriose, resultados variados de FIV estudados, falta de critérios rígidos de inclusão, e outros fatores que influenciam o resultado da FIV em mulheres com endometriose. Estudos randomizados e controlados com grupos comparáveis de mulheres são necessários para avaliar o real impacto da endometriose na fertilidade e definir com exatidão se existe uma relação causal entre as duas entidades.

#### Endereço para correspondência:

Prof Dr Vivian Ferreira do Amaral  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
CCBS - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho  
Cep: 80.215-901 Curitiba - Paraná - Brasil  
E-mail: [v.amaral@pucpr.br](mailto:v.amaral@pucpr.br)  
Tel: (41) 3271-2285 / Fax:(41) 3271-1657

### Referências Bibliográficas

- Abaé M, Glassberg M, Majercik MH, Yoshida H, Vestal R, Puett D. Immunoreactive endothelin-1 concentrations in follicular fluid of women with and without endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*. 1994;61:1083-7.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18:325-32.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122:497-506.
- Al-Azemi M, Bernal AL, Steele J, Gramsbergen I, Barlow D, Kennedy S. Ovarian response to repeated controlled stimulation in in-vitro fertilization cycles in patients with ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2000;15:72-5.
- Amaral VF, Bydlowski SP, Peranovich TC, Navarro PA, Subbiah MT, Ferriani RA. Lipid peroxidation in the peritoneal fluid of infertile women with peritoneal endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;119:72-5.
- Awadalla SG, Friedman CI, Haq AU, Roh SI, Chin NW, Kim MH. Local peritoneal factors: their role in infertility associated with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;157:1207-14.
- Burns WN, Schenken RS. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 1999;42:586-610.
- Cahill DJ, Wardle PG, Maile LA, Harlow CR, Hull MG. Ovarian dysfunction in endometriosis-associated and unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*. 1997;14:554-7.
- Carlberg M, Nejaty J, Frøysa B, Guan Y, Söder O, Bergqvist A. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod*. 2000;15:1250-5.
- Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Impact of

- stage III-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case-control study. *Fertil Steril*. 2000;74:31-4.
- Dlugi AM, Loy RA, Dieterle S, Bayer SR, Seibel MM. The effect of endometriomas on in vitro fertilization outcome. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1989;6:338-41.
- Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update*. 2000;6:67-74.
- Gupta S, Goldberg JM, Aziz N, Goldberg E, Krajcir N, Agarwal A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008;90:247-57.
- Harlow CR, Cahill DJ, Maile LA, Talbot WM, Mears J, Wardle PG, et al. Reduced preovulatory granulosa cell steroidogenesis in women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:426-9.
- Inoue M, Kobayashi Y, Honda I, Awaji H, Fujii A. The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167:278-82.
- Jha P, Farooq A, Agarwal N, Buckshee K. In vitro sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Am J Reprod Immunol*. 1996;36:235-7.
- Khorram O, Lessey BA. Alterations in expression of endometrial endothelial nitric oxide synthase and alpha(v)beta(3) integrin in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;78:860-4.
- Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001;75:1-10.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril*. 1994;62:497-506.
- Loh FH, Tan AT, Kumar J, Ng SC. Ovarian response after laparoscopic ovarian cystectomy for endometriotic cysts in 132 monitored cycles. *Fertil Steril*. 1999;72:316-21.
- Mahmood TA, Templeton A. Folliculogenesis and ovulation in infertile women with mild endometriosis. *Hum Reprod*. 1991;6:227-31.
- Marcoux S, Maheux R, Bérubé S. Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N Engl J Med*. 1997;337:217-22.
- Mathur S, Peress MR, Williamson HO, Youmans CD, Maney SA, Garvin AJ, et al. Autoimmunity to endometrium and ovary in endometriosis. *Clin Exp Immunol*. 1982;50:259-66.
- Matson PL, Yovich JL. The treatment of infertility associated with endometriosis by in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986;46:432-4.
- Navarro J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A. How does endometriosis affect infertility? *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2003;30:181-92.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M. Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1993;82:206-12.
- Pal L, Shifren JL, Isaacson KB, Chang Y, Leykin L, Toth TL. Impact of varying stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet*. 1998;15:27-31.
- Parazzini F. Ablation of lesions or no treatment in minimal-mild endometriosis in infertile women: a randomized trial. Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi. *Hum Reprod*. 1999;14:1332-4.
- Pellicer A, Oliveira N, Ruiz A, Remohí J, Simón C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1995;10 Suppl 2:91-7.
- Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohí J, Simón C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril*. 1998;70:425-31.
- Pellicer A, Valbuena D, Bauset C, Albert C, Bonilla-Musoles F, Remohí J, et al. The follicular endocrine environment in stimulated cycles of women with endometriosis: steroid levels and embryo quality. *Fertil Steril*. 1998;69:1135-41.
- Pellicer A, Albert C, Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C. The pathophysiology of endometriosis-associated infertility: follicular environment and embryo quality. *J Reprod Fert Suppl*. 2000;55:109-19.
- Pritts EA, Taylor RN. An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32:653-67.
- Qiao J, Yeung WS, Yao YQ, Ho PC. The effects of follicular fluid from patients with different indications for IVF treatment on the binding of human spermatozoa to the zona pellucida. *Hum Reprod*. 1998;13:128-31.
- Said TM, Agarwal A, Falcone T, Sharma RK, Bedaiwy MA, Li L. Infiximab may reverse the toxic effects induced by tumor necrosis factor alpha in human spermatozoa: an in vitro model. *Fertil Steril*. 2005;83:1665-73.
- Saito H, Seino T, Kaneko T, Nakahara K, Toya M, Kurachi H. Endometriosis and oocyte quality. *Gynecol Obstet Invest*. 2002;53 Suppl 1:46-51.
- Simón C, Gutiérrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarín JJ, Remohí J, et al. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod*. 1994;9:725-9.
- Sung L, Mukherjee T, Takeshige T, Bustillo M, Copperman AB. Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients. *J Assist Reprod Genet*. 1997;14:152-6.
- Suzumori N, Ozaki Y, Ogasawara M, Suzumori K. Increased concentrations of cathepsin D in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2001;7:459-62.
- Trinder J, Cahill DJ. Endometriosis and infertility: the debate continues. *Hum Fertil (Camb)*. 2002;5:S21-7.
- Tummon IS, Maclin VM, Radwanska E, Binor Z, Dmowski WP. Occult ovulatory dysfunction in women with minimal endometriosis or unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1988;50:716-20.
- Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002;77:861-70.
- Yoshida S, Harada T, Iwabe T, Taniguchi F, Mitsunari M, Yamauchi N, et al. A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum Reprod*. 2004;19:1821-5.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J, Selevan SG. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1996;65:503-9.

# Efeitos em longo prazo sobre a criopreservação de espermatozóides humanos: 17 anos

## Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa: 17 years

Paulo Franco Taitson<sup>1,2</sup>, Antonio Mourthé Filho<sup>1,2</sup>, Antonio Rafael Lemos Faria<sup>2</sup>, Ubiratan Barros de Melo<sup>1,2</sup>, Fernanda Karoline Lemos da Silva<sup>1</sup>, Maria do Carmo Borges de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biological Sciences (ICBS), Pontifical Catholic University of Minas Gerais.

<sup>2</sup> I.R.H. - Institute of Human Reproduction, BH/MG.

<sup>3</sup> Institute of Gynecology (IG), Federal University of Rio de Janeiro.

### ABSTRACT

This paper presents spermatic feasibility after 17 years of freezing. A young man affected by renal cancer sought the sperm freezing service. After 17 years he asked for disposal and signed an authorization term. The thawing and the analysis of the material took place. The comparison of the findings showed an activity reduction from the thawing to the fresh semen in 59,26%. Considering the morphology, the thawing showed a reduction of 32,5% in relation to the fresh semen. The spermatic motility decreased 48% in relation to the fresh semen. The couple (26 years old woman) held one intrauterine insemination in 2009, obtaining success in the first attempt.

**Keywords:** cancer; sperm banking; spermatozoa.

### RESUMO

Este trabalho apresenta viabilidade espermática após 17 anos de congelamento. Um paciente com diagnóstico de câncer renal procurou o serviço de congelamento de sêmen. Após 17 anos, ele procurou o serviço para descarte do material, assinando autorização prévia. O descongelamento e à análise do material ocorreram em seguida. A comparação dos resultados mostrou uma redução da atividade espermática para o sêmen fresco em 59,26%. Considerando-se a morfologia, o descongelamento mostrou uma redução de 32,5% em relação ao sêmen fresco. A motilidade espermática diminuiu 48%. O casal (mulher com 26 anos) realizou uma inseminação intrauterina em 2009, obtendo êxito na primeira tentativa.

**Palavras-chave:** câncer, banco de sêmen, espermatozóide.

### INTRODUCTION

Semen freezing techniques present reports since the 18th century through Spallanzani's works in 1776 with observations on the survival of spermatozoa after freezing. It is generally accepted, however, that Christopher Polge, Andrey Smith and Alan Parkes were the first scientists to demonstrate the possibility of using, in a reproducible way, the technology of semen cryopreservation. They also demonstrated that glycerol had properties and particularities as a cryoprotectant (Polge et al., 1949). The technological development of the semen cryopreservation is grounded on the need of the survival of cells of spermatogenic lineage for years and, many times, for decades. Thus, the main objective is to cryopreserve

man's fertilizing capacity in liquid nitrogen at the temperature of minus 196°C and to maintain its feasibility after thawing. The addition of cryoprotector solutions diminishes the damages caused to the cells, due to the formation of intracellular ice crystals. Among the most used cryoprotectants are glycerol, dimethylsulfoxide and 1-2 propanediol (Donnelly et al. 2001).

Nowadays, several indications lead to the spread of the human cryopreservation services. Among these indications, the freezing of samples prior to chemotherapy and / or radiotherapy stand out. Therefore, the seminal freezing should precede chemotherapeutic and radiotherapeutic treatments as they usually cause aplasia in the germinal cells. The asynchrony of the reproductive activity among patients who undergo assisted reproduction techniques determines another indication with relative incidence (Anger et al., 2003).

### CASE REPORT

In February 1992, a 24 year-old man affected by renal cancer sought the sperm freezing service, before the beginning of radiotherapy and chemotherapy. The semen was mixed volume by volume and homogenized in solution containing 6% of glycerol and a tampon solution containing (TES) N-tris (hydroxymethyl) methyl-2- aminoethanol-sulphonic acid and TRIS (hydroxymethyl) amino methane and warmed egg yolk. The final solution was inserted in 0, 5 mL blades from IMV® (France). Next, the blades were put in aluminum racks. The solution was slowly cooled in a liquid nitrogen barrel at minus 80°C and stored in liquid nitrogen at minus 196°C. The cooling rate of the dry-shipper and its period of useful time, established under laboratory conditions, were respectively 25.7–30.8 °C/min (between 0 and –60 °C) and 9 days after charging (Taitson et al., 2008).

In May 2009, 17 years and two months after the freezing, the patient, now 41 years old, no longer needed the maintenance of the frozen semen. After signing the disposal authorization term, the blades were submitted to room temperature for 10 minutes to be thawed.

The comparison of the findings from the fresh sample results and the post-thawed showed an activity reduction in 59,26%. Considering the morphology, the thawing resulted in a reduction of 32,5% in relation to the fresh semen while the spermatic motility (A+B) decreased 48% in relation to the fresh semen (Table 1).

**Table 1.** Comparison between seminal parameters and fresh semen and post-thawing. The thawing took place after 17 years.

Parameter	Fresh semen	Thawing
Activity (%)	54	22
Morphology (ovals,%)	40	27
Motility	A: 15%, B: 10% C: 33%, D: 42%.	A: 04%, B: 08% C: 18%, D: 78%.

## DISCUSSION

High-dose chemotherapy and radiotherapy have increased long-term survival of young patients with cancer. Sometimes however, the price paid is both ovarian and testis failure and sterility. It is important to detect who are the patients at risk in order to verify when fertility preservation is indicated. After conventional chemotherapy, there are significant differences in ovarian and testis failure rate according to patients' age, the disease for which patients were treated for and the drugs used. Bone marrow transplantation in cancer patients almost invariably induced ovarian failure, irrespective of patient age, treatment protocol or administration of hormonal treatment (Meirow, 2000; Taitson & Souza, 2008).

During the cryopreservation process, the cells go through morphological alterations which can cause their death. These alterations occur at the plasmatic membrane level of the head and the intermediate piece of spermatozoa. Therefore, the preservation state of the spermatic membranes is decisive for the success of cryopreservation. The success of this technique requires the cooling rates to be situated, in general, between 10 and 50° C / minute (Anger et al., 2003).

The recrystallization invariably occurs during thawing, creating intracellular ice, which is lethal (the several small ice crystals that exist are converted into few crystals, though bigger, when the thawing is slow). For this reason, a high rate of thawing is usually used in order to diminish the level of recrystallization. When the thawing is rapid, there is not enough time for the dehydrated cells to absorb the quantity of water that was lost during freezing.

In March 2004, it was reported that a baby was born from semen frozen for 21 years and sent to the *in vitro* fertilization technique. In 2005, it was observed that semen of two individuals was frozen for 21 and 28 years and both sent to intrauterine insemination, resulting in the birth of two babies (Horne et al., 2004; Feldschuh et al., 2005).

Rofeim and Gilbert (2005) evaluated the long-term effects of cryopreservation on spermatozoa of men with testicular cancer, lymphoma, and benign conditions. No statistically significant decrease in semen parameters was noted. Duration of follow-up was up to 5 years and mean follow-up was 2 years.

Another study in 2005 evaluated 238 individual semen samples collected from 34 patients (18 had cancer) between 1976 and 1989. The maximum cryopreserved sperm deposits took 21 years. All semen parameters were worse than the fresh ones and semen motility loss was 80%. The semen deterioration criteria were more directly related to the initial freezing than to the length of storage (Bolten et al., 2005).

Clarke et al (2006) studying six semen samples after more than 28 years of storage in liquid nitrogen showed recovery of human sperm motility and ability to interact

with the human zona pellucida. Normal acrosomic reaction was established in 4 samples. They call attention to semen cryopreservation prior to chemotherapy.

A recent study showed that only 27% of men who store semen prior to cancer treatment used the samples in ten years' time. Another relevant point is the fact that many of the patients that ask for semen cryopreservation are young (mean age of 24). Consequently, it is likely for the beginning of the formation of their family to be awaited (Blackhall et al., 2002).

In the present study, the post-thawing spermatic findings proved the spermatic feasibility of semen frozen for 17 years. The couple (26 years old woman) held one intrauterine insemination in 2009, obtaining success in the first attempt. Despite the data in the literature suggesting that the semen cryopreservation and thawing can lead to damage in the seminal DNA in sterile men (Donnelly et al., 2001), there is no data suggesting that the damage is increased by the storage period.

## Correspondência:

Address: Dr. Paulo Franco Taitson, Ph.D.  
Institute of Biological Sciences (ICBS), Pontifical Catholic University of Minas Gerais, 500 Dom José Gaspar Ave. Belo Horizonte, Brazil, 30.535-901  
Tel.: +55 31 3337 1960; Fax: +55 31 3319 4938  
email: pftaitson@bol.com.br

## References

- Anger JT, Gilbert BR, Goldstein MARC: Cryopreservation of sperm: Indications, methods and results. *J Urology*. 2003; 170:1079-1084.
- Blackhall FH, Atkinson AD, Maaya MB, Ryder WDJ, Horne G, Brison DR, Lieberman BA and Radford JA: Semen cryopreservation, utilization and reproductive outcome in men treated for Hodgkin's disease. *Brit J Cancer*. 2002; 87:381-4
- Bolten M, Kaden R. Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urology*. 2005; 44:904-8.
- Clarke GN, Liu Y, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2006; 86:721-2.
- Donnelly ET, Steele EK, Mc Clure N, Lewis SE: Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001; 16:1191-9.
- Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A: Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005; 84:1017.
- Horne G, Atkinson AD, Pease EH, Logue JP, Brison DR, Lieberman BA: Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment case report. *Hum Reprod*. 2004; 19:1448-9.
- Meirow D. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 169:123-31.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164:666.
- Rofeim O, Gilbert BR. Long-term effects of cryopreservation on human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2005; 84:536-7.
- Taitson PF, Chami E, Godinho HP. Gene banking of the neotropical fish *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836): A protocol to freeze its sperm in the field. *Anim Reprod Sci*. 2008; 105:283-91.
- Taitson PF, Souza MCB. Incidence of male infertility by occupational factors in the State of Minas Gerais. *J Bras Reprod Assist*. 2008; 12:14-8.

**AGENDA DE EVENTOS PARA 2009****FEVEREIRO**

**11 a 15/02** - 2009 Annual Meeting of the International Society for the Study of Women's Sexual Health

**MARÇO**

**11 a 14/03** - 2009 APGO/CREOG

**ABRIL**

**04 a 07/04** - 2009 ASA 34th Annual Conference

**25 a 30/04** - 2009 Annual Meeting American Urology Association

**23 a 25/04** - 9º. Congresso Geral da Redlara - Cancun  
informações: info@redlara.com

**MAIO**

**02/05 a 14/06** - Frontiers in Reproduction: Molecular & Cellular Concepts & Applications

**JUNHO**

**5 a 6/06** - Joint Meeting ALMER (Ex-FLASEF) - ASRM - REDLARA Advances in Reproductive Medicine  
Mercure Grand Hotel International - Foz do Iguazu - PR

**Plenarium Organização de Eventos**

Rua Ramiro Barcelos, 820 - 90035-000 - Porto Alegre - RS

**Tel.: (55) 3311-8969 / 3311-9456 / 3311-2578**

www.plenariumcongressos.com.br / www.almerweb.com



**21 a 25/06** - 2009 19th WAS World Congress for Sexual Health

**28/06 a 01/07** - The 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology

**AGOSTO**

Agosto - Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida (SBRA)

**SETEMBRO**

**24 - 26/09** - American Urogynecologic Society

**OUTUBRO**

**17 a 21/10** - 65th Annual Meeting of the ASRM

**NOVEMBRO**

**14 a 17/11** - Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia

# **SBRA**

**SOCIEDADE BRASILEIRA DE  
REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

## **Venha para a SBRA!**

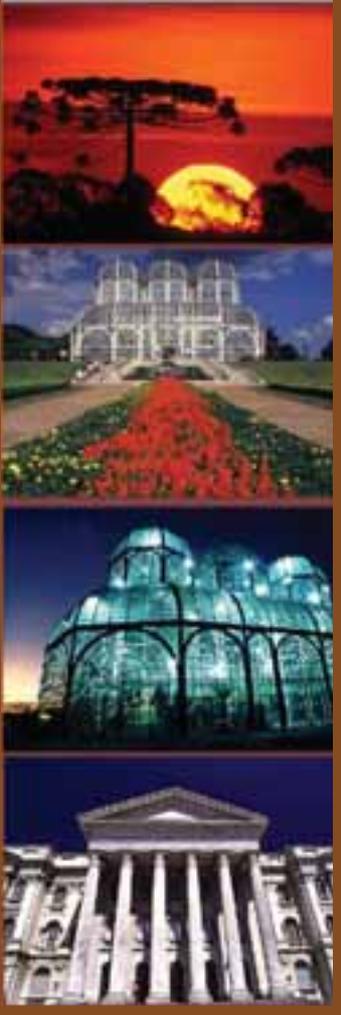
### **Para ser sócio da SBRA:**

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

**2- depósito direto na conta da sociedade:  
R\$ 190,00:O depósito identificado em conta corrente –  
Banco do Brasil Ag 3478-9 conta 24886-X  
– SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.  
Neste caso, notificar a Secretaria virtual pelo site,  
preenchendo o re-cadastramento.**

### **Benefícios aos Associados:**

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



# XIII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida

27 a 29 de agosto de 2009

INSCRIÇÕES NO SITE DO EVENTO

[www.repassist2009.com.br](http://www.repassist2009.com.br)

## Programa Preliminar

27 de Agosto - Quinta-Feira	
08h00 - 18h00	CURSO PRÉ-CONGRESSO - VITRIFICAÇÃO
08h00 - 12h00	CURSO PRÉ-CONGRESSO - CENTRO DE REPRODUÇÃO: ADMINISTRANDO FINANCIERAMENTE UM CENTRO DE REPRODUÇÃO
08h00 - 12h30	CURSO PRÉ-CONGRESSO - TEMAS COTIDIANOS EM REPRODUÇÃO HUMANA
14h00 - 15h30	MESA REDONDA: INDUÇÃO DA OVULAÇÃO
16h00 - 17h00	MESA REDONDA: ANDROLOGIA
17h30	SIMPÓSIO SATÉLITE
28 de Agosto - Sexta-Feira	
SALA 01 - PRÓ-NÚCLEO	
08h00 - 09h40	LABORATÓRIO DE RA
10h30 - 12h00	LABORATÓRIO DE RA
12h00 - 14h00	SIMPÓSIO SATÉLITE - SERONO
14h00 - 18h00	CURSO TEÓRICO / PRÁTICO - SUPER ICSI
SALA 02	
08h00 - 08h45	CONFERÊNCIA: RECENT ADVANCES IN HUMAN REPRODUCTION
08h45 - 10h00	TEMAS LIVRES
10h00 - 10h30	Intervalo
10h30 - 12h00	MESA REDONDA: ENDOMETRIOSE
12h00 - 14h00	SIMPÓSIO SATÉLITE
14h00 - 15h30	PONTO E CONTRA PONTO - PROCEDIMENTOS QUE MELHORAM A TAXA DE FIV
16h00 - 17h00	CONFERÊNCIA - IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA: MITOS E REALIDADES
17h00 - 18h00	CONFERÊNCIA - OPTIMIZING THE USE OF SAGE MEDIA
18h00	REUNIÃO SBRA
29 de Agosto - Sábado	
SALA 01	
08h00 - 10h30	ENCONTRO DE ENFERMAGEM EM RA
SALA 02	
08h00 - 08h45	CONFERÊNCIA: ESTIMULAÇÃO MÍNIMA - EVIDENCE-BASED ON SCIENTIFIC "BUBBLE"?
08h45 - 10h30	TEMAS LIVRES
11h00 - 12h00	SIMPÓSIO COMENTADO
11h00 - 11h30	IMPLICAÇÕES JURÍDICAS DOS TRATAMENTOS DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA
11h30 - 12h00	ASPECTOS BIOÉTICOS EM RA
12h00 - 13h00	CONFERÊNCIA: PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE - INDICAÇÕES, RESULTADOS FUTURAS TENDÊNCIAS
13h00	ENCERRAMENTO

Valores de Inscrição - Congresso		
	Até 20/08/2009	Após 20/08/2009
Médicos ou Pós Graduandos Sócios Quites da SBRA*	R\$ 420,00	a definir
Médicos ou Pós-Graduandos Não-Sócios	R\$ 600,00	a definir
Residentes**	R\$ 250,00	a definir
Estudantes de Graduação**	R\$ 120,00	a definir
Outros Profissionais ou Pós Graduandos - Não Prescritores	R\$ 300,00	a definir
Valores de Inscrição - Cursos Pré-Congresso***		
Pré-Congresso: Vitricificação (vagas limitadas!)	R\$ 300,00	a definir
Pré-Congresso: Administrando Financeiramente um Centro de Reprodução (para Médicos, Enfermeiros, Administradores e Gerentes de Clínicas de Reprodução Assistida)	R\$ 150,00	a definir
Pré-Congresso: Temas Cotidianos em Reprodução Assistida	R\$ 90,00	a definir
Valores de Inscrição - Curso Intra-Congresso***		
Intra-Congresso: Teórico / Prático - Super ICSI (vagas limitadas!)	R\$ 150,00	a definir

\* Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida  
 \*\* Comprovação obrigatória.  
 \*\*\* Para participar dos Cursos Pré/Intra-Congresso é necessário estar inscrito no Congresso (exceto curso "Administrando Financeiramente um Centro de Reprodução").  
 Forma de Pagamento: exclusivamente através de boleto bancário.

### Convidados Estrangeiros

G. David Ball (EUA)  
 Klaus Wiemer (EUA)  
 Renato Fanchin (França)  
 Wana Popal (EUA)

### Passagem e Hospedagem

M. Leal Agência de Viagens  
 Tel. 41 3343-4300  
 e-mail: mleal@mleal.com.br

### Informações

EKIPE Eventos  
 Tel. 41 3022-1247  
 Fax. 41 3022-3005  
 e-mail: ekipe@ekipeeventos.com.br

### Local do Evento

Estação Embratel Convention Center  
 Av. Sete de Setembro, 2775  
 Rebouças - Curitiba - PR

# Luveris®

## alfalutropina

Pacientes com idade reprodutiva mais avançada podem se beneficiar com a adição de r-hLH quando submetidas a ART<sup>1</sup>



Possibilita a individualização do tratamento<sup>2</sup>

**LUVERIS® 75 UI (alfalutropina) - USO ADULTO - Para uso subcutâneo. Indicação:** Luveris® em associação com uma preparação de hormônio folículo estimulante (FSH), é recomendado para a estimulação do desenvolvimento folicular em mulheres com insuficiência grave de LH e FSH. Luveris® deve ser administrado segundo um esquema de injeções diárias, simultaneamente ao FSH. Dado que estas pacientes são amenorréicas e têm uma reduzida secreção de estrogênios endógenos, o tratamento pode ser iniciado a qualquer momento. **Contraindicações:** hipersensibilidade às gonadotrofinas ou a qualquer dos excipientes; carcinoma do útero, ovário ou mama; tumores ativos, não tratados, do hipotálamo e da hipófise; hipertrofia ou cistos ovarianos de etiologia desconhecida; hemorragias ginecológicas de etiologia desconhecida. **Precauções e advertências:** Não deve ser utilizado quando não é possível a obtenção de uma resposta efetiva, tais como, falência ovariana, má formação dos órgãos sexuais ou tumores fibróides do útero incompatíveis com a gravidez. As pacientes devem ser examinadas em relação a hipotireoidismo, insuficiência da supra-renal, hiperprolactinemia e tumores do hipotálamo ou hipófise. Risco aumentado de hiperestimulação, podendo conduzir a um grave quadro clínico, caracterizado por cistos ovarianos de grandes dimensões, que podem romper. Uma excessiva resposta ovariana raramente origina uma hiperestimulação significativa, exceto se houver administração de hCG para induzir a ovulação. Portanto, é prudente não administrar hCG nestes casos e recomendar à paciente a abstenção de relações sexuais, ou métodos anticoncepcionais de barreira, durante pelo menos 4 dias. Recomenda-se a monitorização com ecografia, bem como medições do estradiol. Em pacientes submetidas à indução de ovulação, a incidência de gravidez e nascimentos múltiplos é maior, em comparação à concepção natural. Luveris® não deve ser administrado durante a gravidez e a amamentação, em idosos, crianças e outros grupos de risco. Não se conhecem os efeitos da superdosagem com alfalutropina, no entanto, pode-se admitir a ocorrência da síndrome da hiperestimulação ovariana. **Reações adversas:** A alfalutropina é utilizada em associação com alfafolitropina, sendo difícil atribuir efeitos indesejáveis a qualquer das substâncias utilizadas. Foram relatadas reações ligeiras e moderadas no local da injeção (equimose, dor, rubor, prurido ou edema). Não foram relatadas reações graves no local da injeção nem reações alérgicas sistêmicas após a administração de Luveris®. A síndrome de hiperestimulação ovariana foi observada em menos de 6% das pacientes tratadas com Luveris®. Não foi relatada síndrome de hiperestimulação ovariana grave. Podem ocorrer tromboembolia, torsão dos anexos (uma complicação do aumento do volume ovariano) e hemoperitônio. Pode também ocorrer gravidez ectópica, especialmente em mulheres com história de doença tubária anterior. Reações mais comuns: reações no local da injeção, cefaléia, sonolência, náuseas, dor abdominal, dor pélvica, síndrome de hiperestimulação ovariana, cistos ovarianos, dor nas mamas. **Posologia:** O tratamento deve ser adaptado à resposta individual da paciente, avaliada pela medição das dimensões do folículo por meio de ecografia e do nível de estrogênios. Inicia-se com a administração diária de 75 UI de alfalutropina, por até 3 semanas, em associação com 75-150 UI de FSH. Se um aumento da dose de FSH for considerado apropriado, o ajuste da dose deve ser efetuado, de preferência, após intervalos de 7-14 dias e, de preferência, com incrementos de 37,5-75 UI. Pode ser aceitável prolongar a duração da estimulação em qualquer um dos ciclos até 5 semanas. Quando se obtém uma resposta ótima, deve ser administrada uma única injeção de hCG, 24-48 horas após as últimas injeções de Luveris® e de FSH. Recomenda-se que a paciente tenha relações sexuais no dia da administração de hCG, bem como no dia seguinte. Como alternativa, pode ser efetuada uma inseminação intra-uterina. Pode ser necessário um suporte da fase lútea, uma vez que a ausência de substâncias com atividade luteotrópica (LH / hCG) após a ovulação pode conduzir a uma falência prematura do corpo lúteo. Se for obtida uma resposta excessiva, o tratamento deve ser interrompido e o hCG não deve ser administrado. O tratamento deve ser reiniciado no ciclo seguinte, com uma dose de FSH inferior à do ciclo anterior. **Modo de Usar:** Para administração subcutânea única e imediata após abertura e reconstituição. Luveris® pode ser misturado com Gonol-f® monodose em 1 ml de solvente, e co-administrado numa injeção única. Neste caso Luveris® deve ser reconstituído em primeiro lugar e depois utilizado para reconstituir o pó de alfafolitropina. Os produtos não utilizados ou os resíduos devem ser descartados. **Conservação:** Conservar em temperatura abaixo de 25°C. Proteger da luz. Nessas condições o medicamento é estável por 36 meses. VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. SAC Merck Serono: 0800-113320. Reg MS 1.0089.0354

**Referência:** 1. Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, Werlin L, Kelly E. Randomized trial to compare effect of recombinant human FSH (folitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. RBM On-Line 2004, v. 8, n. 2, February. 2. Shoham Z, Balen A, Patel A et al. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified follicle-stimulating hormone in hypogonadotrophic hypogonadism patients. Fertil Steril 1991; 56: 1048-1053.

**Contraindicação:** pacientes com carcinoma do útero, ovário ou mama. **Interação medicamentosa:** Luveris® não deve ser coadministrado a outros medicamentos na mesma seringa, exceto Gonol-f® na apresentação monodose. A PERSISTIREM OS SINTOMAS O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.